

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Šoša

ODNOS EKSPRESIJE KOŠTANOG MORFOGENETSKOG PROTEINA-9 I
TRANSFORMIRAJUĆEG ČIMBENIKA RASTA- β TIJEKOM REGENERATIVNIH
PROCESA JETRE U ČOVJEKA

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2014.

MENTOR RADA: prof.dr.sc. Dragica Bobinac

DOKTORSKI RAD OBRANJEN JE DANA _____ NA MEDICINSKOM

FAKULTETU U RIJECI PRED POVJERENSTVOM U SASTAVU:

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

RAD IMA _____ LISTOVA.

UDK: _____

PREDGOVOR

Privučeni davno zamijećenom regeneracijskom sposobnošću jetre te najnovijim spoznajama o humoralnom nadzoru nad tim procesom; ovim istraživanjem dajemo svoj doprinos u razjašnjavanju uloge koju u regeneraciji imaju BMP-9 i TGF- β 1.

Zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Dragici Bobinac na podijeljenom znanju i iskustvu, te na oblikovanju ideje koja se, u konačnici, materijalizirala u ovom radu. Svojim savjetima, znanjem, velikim entuzijazmom i neizmjernom energijom prof.dr.sc. Bobinac otkrivala mi je svijet znanosti, pružala primjer znanstvenog promišljanja i djelovanja kroz čitav studij i kasnije, te omogućila provedbu ovog istraživanja, na čemu se od srca zahvaljujem.

Iskreno hvala svim djelatnicima Laboratorija Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta u Rijeci koji su svojim nesebičnim angažmanom, stručnošću i strpljenjem omogućili da ovaj rad uspije. Zahvaljujem se voditeljici Laboratorija, doc.dr.sc. Olgi Cvijanović na izradi laboratorijskog protokola koji je korišten u radu, savjetima oko metodologije i pisanja, sve u svemu, savjetima koji su bitno doprinijeli kvaliteti i cjelovitosti ovog rada. Osim na iskustvu koje je kroz savjete nesebično dijelila sa mnom, zahvaljujem joj i na podršci te na vremenu koje je plemenito i bez zadržke posvetila i darovala meni.

Neobično cijenim doprinos, pomoć i savjete svih kolega sa Zavoda za sudsku medicinu i kriminalistiku.

Posebno se zahvaljujem Ivani na pomoći i predanosti mojim zamislima, hvala joj na na zajedničkim trenucima razmišljanja, diskusije i prijedlozima.

Ovaj rad posvećujem onima koji nisu uz mene iz ovih ili onih razloga. Mojim roditeljima, koji su mi ustrajno i s puno ljubavi usadili sve vrijednosti koje me vode kroz život. Iako nisu doživjeli, bili bi neobično ponosni i sretni te ovu Disertaciju posvećujem uspomeni na njih, sa sjećanjima punim ljubavi i zahvalnosti.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Koštani morfogenetski proteini (eng. bone morphogenetic proteins, BMPs) jesu članovi TGF- β nadobitelji i djeluju na mjestima epitelno-mezenhimalne tranzicije, a neki članovi u tom smislu imaju sposobnost potaknuti regeneraciju organa. S obzirom da BMP-9 izaziva proliferaciju stanica ljudskog hepatoma te pokazuje hipoglikemijski učinak sličan inzulinu, moguće je da BMP-9, baš poput inzulina pomaže regeneraciji oštećene jetre. Pretpostavka je da se ekspresija BMP-9 mijenja sukladno oštećenju jetrenog parenhima.

Ispitanici i metode: Ovim istraživanjem analizira se uzorak oštećenog tkiva jetre čovjeka. Uzorci humane jetre dobiveni su iz arhive Zavoda za sudsku medicinu i kriminalistiku Medicinskog fakulteta u Rijeci (N=40). Patohistološkim pregledom je ustanovljena početna ciroza i nodularna ciroza. Uzorke smo analizirali imunohistokemijskom metodom, metodom Western blot i zimografijom gelatinaza. Kontrolnu skupinu čine ispitanici kod kojih na obdukciji i histološkim pregledom nisu nađene patološke promjene u jetri (N=20). Istraživanjem su obuhvaćeni ispitanici stari od 25 do 50 godina, oba spola čiji su uzorci tkiva jetre prikupljeni u razdoblju od 2005.-2012. godine.

Rezultati: Kad govorimo o ekspresiji i lokalizaciji BMP-9 i TGF- β 1, našli smo ih u hepatocitima i u epitelu žučnih kanalića zdrave jetre te u: hepatocitima, epitelu žučnih kanalića i Kupferovim stanicama različitim stupnjem ciroze zahvaćene jetre čovjeka. Kvantitativnom analizom intenziteta obojenja BMP-9 ekspresije utvrđena je statistički značajna razlika između nodularne ciroze i početne ciroze ($P < 0,05$) te između nodularne ciroze i zdrave jetre ($P < 0,05$). Kvantitativnom analizom intenziteta TGF- β 1 ekspresije, utvrđena je statistički značajna razlika između nodularne ciroze i zdrave jetre ($P < 0,05$) te između početne ciroze i zdrave jetre ($P < 0,05$). Western blot analizom utvrđena je najveća razina ekspresije BMP-9 i TGF- β 1 u nodularnoj cirozi. Statistički značajno jači intenzitet ekspresije MMP-2 utvrđen je u nodularnoj cirozi, u odnosu na

zdravu jetru ($P < 0,05$). MMP-9 ima statistički značajno veću ekspresiju u početnoj cirozi, u odnosu na zdravu jetru ($P < 0,05$).

Zaključak: Imunohistokemijskom analizom utvrdili smo ekspresiju i lokalizaciju BMP-9 u zdravoj jetri, početnoj i nodularnoj cirozi. U hepatocitima se ekspresija BMP-9 mijenja sukladno stadijima razvoja ciroze jetre. Najjači intenzitet imunohistokemijskog obojenja BMP-9 ekspresije utvrđen je u nodularnoj cirozi, dočim početna ciroza i zdrava jetra pokazuju podjednak intenzitet ekspresije. Najjači intenzitet imunohistokemijskog obojenja TGF – $\beta 1$ ekspresije utvrđen je također u nodularnoj cirozi, što je podjednako intenzitetu obojenja u početnoj cirozi. Zdrava jetra pokazuje najslabiji intenzitet TGF- $\beta 1$ ekspresije. Western blot analiza potvrđuje nalaz imunohistokemije, što upućuje na finu ravnotežu između BMP-9 i TGF- $\beta 1$ u jetri čovjeka. Naš nalaz ekspresije MMP-2 i MMP-9 govori o tome da stupanj oštećenosti uzorka u različitim stadijima razvoja ciroze humane jetre korelira s ekspresijom enzima gelatinaza.

Ključne riječi: hepatociti; koštani morfogenetski protein-9; preobražavajući čimbenik rasta – $\beta 1$; regeneracija jetre

SUMMARY

Objective: Bone morphogenetic proteins (BMPs) are members of the TGF – β superfamily and play a role in places of epithelial - mesenchymal transition , and some BMPs exhibit the ability to regenerate organs. Since BMP-9 induces proliferation of human hepatoma cells and shows hypoglycemic effect like the one of insulin, it is possible that BMP - 9 helps regeneration of the damaged liver. The assumption was that the expression of BMP - 9 is corresponding to the liver damage.

Patients and Methods: We analyzed, in this study, samples of human damaged liver tissue. Human liver samples were obtained from the Department of Forensic Medicine and Criminalistics, School of Medicine in Rijeka (N = 40). Pathohistologically, all samples were grouped whether they represented initial or nodular cirrhosis. Samples were further processed by immunohistochemistry, Western blot and gelatinase zymography. The control group consisted of subjects in whom the histological examination failed to find pathological changes in the liver (N = 20). Study included subjects 25-50 years old, both sexes whose liver tissue samples were collected during the period from 2005th to 2012th.

Results: In regard of the expression and localization of BMP - 9 and TGF – β 1, we found them in the hepatocytes and bile duct epithelium of the healthy liver and in: hepatocytes, bile duct epithelium and Kupfer cells of varying degrees of the liver cirrhosis in humans. Quantitative analysis of the intensity of staining of BMP-9 expression, showed statistically significant difference between the nodular cirrhosis and initial cirrhosis (P <0,05) and between nodular cirrhosis and healthy liver (P<0,05). Quantitative analysis of the intensity of TGF- β 1 expression, revealed a statistically significant difference between nodular cirrhosis and healthy liver (P <0,05) and between the initial cirrhosis and healthy liver (P<0,05). Western blot analysis revealed the highest level of expression of BMP-9 and TGF- β 1 in nodular cirrhosis. Significantly higher intensity of MMP - 2 expression was found in the

nodular cirrhosis compared to healthy liver ($P<0,05$). MMP-9 has significantly higher expression in the initial cirrhosis, compared to healthy liver ($P<0,05$).

Conclusion: Using immunohistochemistry we determined the expression and localization of BMP - 9 in the healthy liver, initial and nodular cirrhosis. In hepatocytes the expression of BMP - 9 is corroborating the stages of development of liver cirrhosis. The strongest intensity of immunohistochemical staining of BMP-9 expression was found in nodular cirrhosis, whereas the initial and healthy liver cirrhosis show an equal intensity of expression. The strongest intensity of immunohistochemical staining of TGF- β 1 expression was found also in nodular cirrhosis, which is equal to the intensity of staining in initial cirrhosis. A healthy liver showed the weakest intensity of TGF- β 1 expression. Western blot analysis confirmed immunohistochemistry findings, suggesting a fine balance between BMP-9 and TGF- β 1 in the human liver. Our findings of expression of the MMP- 2 and MMP-9 indicate that the degree of damage at different stages of development of cirrhosis of the human liver, correlated with the expression of the enzyme gelatinase.

Key words: bone morphogenetic protein-9; hepatocytes; liver regeneration; transforming growth factor – β 1

POPIS KRATICA

ALK – activin like kinasis

AT – angiotenzin

BMPs – bone morphogenetic proteins

BRE – BMP responsive elements

EGF – epidermal growth factor

ECM – extracellular matrix

ERK – extracellular signal-regulated kinasis

FAS – fatty acid synthase

FGF – fibroblast growth factor

GDNF – glial cell-derived neurotrophic factor

HSCs – hepatic stellate cells

HGF – hepatocyte growth factor

HCC – hepatocellular carcinoma

HISS – hepatic insulin sensitizing substance

IGF – insulin-like growth factor

IF – interferon

IL – interleukin

JNK – c-Jun N-terminal kinase

KCs – Kupfer cells

ME – malic enzyme

MAPK – mitogen-activated protein kinase

MCP – monocyte chemoattractant protein

MIS – Müllerian-inhibiting substance

MMP – matrix metalloproteinase

NASH – nonalcoholic steatohepatitis

PH – partial hepatectomy

Ras – rat sarcoma

SME – Smad DNA binding element

TGF- α – transforming growth factor- α

TGF- β – transforming growth factor- β

TIMP – tissue inhibitors of metalloproteinases

TNF – tumor necrosis factor

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Koštani morfogogenetski proteini	3
1.2. Koštani morfogogenetski protein - 9	5
1.3. Signalni put.....	7
1.4. Jetra, BMP – 9 i metabolizam glukoze.....	9
1.4.2. Uloga koštanih morfogogenetskih proteina u jetri.....	11
1.4.3. BMP-9 u regeneraciji jetre.....	12
1.4.4. Hepatociti i jetrene zvjezdolike stanice	14
1.5. Ciroza jetre	16
1.6. Histopatološka procjena uznapredovalosti ciroze jetre	17
1.7. Humoralno aktivirana regeneracija jetre	20
1.7.1. Reverzibilnost oštećenja jetre	22
1.8. Izvanstanični matriks, matriks-metaloproteinaze i gelatinaze.....	24
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	29
3. ISPITANICI I METODE	31
3.1. Ispitanici	31
3.2. Metode rada	32
a) Histološko bojenje hemalaun eozin	32
b) Imunohistokemijska analiza	32
c) Izolacija proteina i Western blot analiza.....	33
d) Natrij-dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE) – zimografija	34
3.3. Statistička analiza	34
3.4. Etički aspekti istraživanja.....	35
4. REZULTATI	36
4.1. Rezultati histološke analize	36

4.2. Rezultati imunohistokemijske analize.....	38
4.2.1. Ekspresija BMP-9 u jetri čovjeka.....	38
4.2.2. Ekspresija TGF-β1 u jetri čovjeka.....	41
4.2.3. Kvantitativna analiza ekspresije BMP-9 i TGF-β1	44
4.3. Western blot analiza	47
4.3.1. Razina ekspresije BMP-9 i TGF-β1 u jetri čovjeka.....	47
4.4. Zimografija	50
5. RASPRAVA.....	52
5.1. Proupalni i reparacijski citokini u cirozi jetre	53
5.2. Ekspresija BMP-9 i TGF-β1 u jetri čovjeka.....	59
5.3. Razina ekspresije BMP-9 i TGF-β1	63
5.4. Relativna ekspresija MMP-2 i MMP-9	65
6. ZAKLJUČCI.....	69
7. LITERATURA.....	71

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Preobražavajući čimbenik rasta- β (TGF- β) je protein koji postoji u tri izoforme nazvane TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3. TGF- β obitelj je dio TGF- β nadobitelji proteina koja uključuje i koštane morfogenetske proteine (eng. bone morphogenetic proteins, BMPs), čimbenike rasta i diferencijacije (eng. growth differentiation factors, GDFs), inhibine, aktivine, MIS (eng. Müllerian-inhibiting substance) i GDNF (eng. glial cell-derived neurotrophic factor) (1, 2). Svi oni dijele mnoge strukturalne i funkcionalne sličnosti.

Tablica 1. Nadobitelj citokina preobražavajućeg čimbenika rasta - β

TGF- β	BMP		AKTIVINI	OSTALI
TGF- β 1	BMP-2	GDF-1	Aktivin A	MIS
TGF- β 2	BMP-4	GDF-3/Vgr-2	Aktivin B	GD-9
TGF- β 3	Dpp	Dordalin	Aktivin C	Inhibin- α
	BMP-5	BMP-9	Aktivin D	Lefty
	BMP-6/Vgr1	BMP-10	Aktivin E	GDNF
	BMP-7/OP1	CDMP		
	BMP-8A / OP2	BMP-3 / Osteogenin		
	BMP-8B	GDF-10		
	gbb-60A,CDMP-2	Nodal		
	GDF-5,CDMP-1	Xnr-1		
	GDF-6, BMP-13	Xnr-2		
	Radar	Xnr-3		
	GDF-7/BMP-12	GDF-1		
	Vg-1, Univin	GDF-3/Vgr-2		

Homologija između zrelih C-krajeva različitih članova nadobitelji TGF- β varira od 20 do čak 90%, što upućuje da svi članovi TGF- β nadobitelji možda potječu od istih gena-predaka (1-4) (Tablica 1). Članovi nadobitelji TGF- β mogu biti grupirani po sličnosti u sekvencama i imaju bitnu ulogu u gotovo svim aspektima staničnih procesa, od ranog embrionalnog razvoja (5), rasta, diferencijacije (6, 7), pokretljivosti stanica, apoptoze (8), invazije, taloženja izvanstanične tvari i angiogeneze (9, 10).

TGF- β 1-3 su tri izoforme (11, 12), homodimeri od 25 kDa u kojima svaka podjedinica ima približno 112 aminokiselina, a izlučuju se iz gotovo svih tipova stanica u tijelu u fiziološkim (13, 14) i patološkim uvjetima (15). Potiču sintezu izvanstaničnog matriksa (engl. extracellular matrix, ECM), inhibiraju njegovu razgradnju, djeluju kao imunosupresori. U glatkim mišićnim stanicama, fibroblastima i hondrocitima potiču bimodalni, proliferativni odgovor. Stoga, TGF- β u ovim stanicama djeluje kao autokrini čimbenik rasta. Također, TGF- β može djelovati kao negativan regulator staničnog ciklusa.

TGF- β 1 je bio prvi identificirani član obitelji TGF- β . Aminokiselinski slijed između zrele molekule ljudskog TGF- β 1 i - β 2 identičan je 71%, između TGF- β 1 i - β 3 76%, a između TGF- β 2 i - β 3 80% (3). Premda in vitro nema značajne razlike u biološkoj aktivnosti tih triju izoformi, one nipošto nisu funkcionalno suvišne (16).

Novije spoznaje upućuju da je TGF- β 1 jedan od glavnih profibrotičkih citokina. Izlučuju ga Kupferove stanice (KCs) i zvjezdolike stanice jetre (engl. hepatic stellate cells, HSCs), a sekundarno se eksprimira i u hepatocitima (17).

1.1. Koštani morfogenetski proteini

Koštani morfogenetski proteini, BMPs čine veliku obitelj unutar nadobitelji TGF- β . BMPs su multifunkcionalni faktori rasta kojih je do danas u sisavaca otkriveno oko 20 (18). Uloge BMPs u embrionalnom razvoju i staničnim funkcijama nakon rođenja su opsežno izučavane posljednjih nekoliko godina. Što se tiče mnogostrukosti njihova djelovanja - reguliraju rast, diferencijaciju i apoptozu mnogih stanica (18). Studije na transgeničnim miševima i miševima kojima je izbačen gen za BMP (*knock out*) te kod prirodnih mutacija gena za BMPs, pokazale su da BMP signalizacija igra ključnu ulogu u fiziologiji srca, razvoju hrskavice i živčevlja (7, 19, 20).

Djelovanje BMPs je prvi put primijećeno 1965. ali su proteini odgovorni za indukciju rasta kosti ostali nepoznati sve do purifikacije i sekvencioniranja goveđeg BMP-3 (osteogenin) te kloniranja ljudskih BMP-2 i 4 u kasnim 1980-im (21-24). BMPs su izvorno identificirani kao osteogeni proteini obzirom da potiču stvaranje nove kosti. Upravo tako neki, poput: BMP-2/4,-3,-5,-6 i -7 imaju izrazita osteogena i osteoinduktivna svojstva, koja su potvrđena u procesima izgradnje i cijeljenja skeleta. Međutim, novija znanstvena literatura upućuje na različitu funkciju ovih proteina u organima izvan koštanog sustava. Tako primjerice BMP-2 ima važnu ulogu u nastanku kalcifikata stjenke krvne žile (25). Deficit cirkulirajućeg BMP-7 pridonosi progresiji kroničnog oštećenja bubrega (26), a faktor diferencijacije i rasta-15 (eng. growth and differentiation factor-15, GDF-15) važan je u patofiziologiji nastanka kongestivnog zatajenja srca. Navedeno samo naglašava mogućnost uloge BMPs u patogenezi bolesti izvan koštanog sustava čovjeka. Moguć regenerativni učinak nekih BMPs najočitiji je za BMP-7 što je utvrđeno na eksperimentalnom modelu upalne bolesti crijeva (27).

Prema sličnosti njihovih aminokiselinskih sekvenci i funkcijama BMPs su podijeljeni u četiri podskupine. Upravo su po tim kriterijima i mnogi GDFs također uvršteni u BMP obitelj.

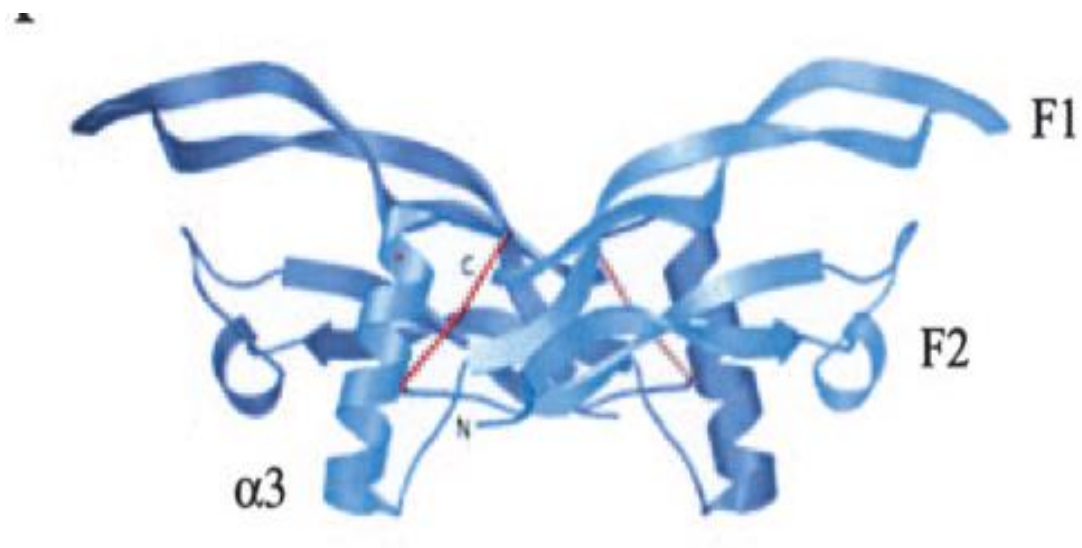
- a) *BMP-2/4 podskupina* - Drosophilin Dpp je blizak homolog BMP-2 i BMP-4. Dpp igra važnu ulogu u formiranju dorsoventralne osi i indukciji endoderma u ranoj embriogenezi Drosophille. Također igra ulogu u formiranju oči i krila u odrasle jedinke. BMP2/4 i Dpp mogu se funkcionalno međusobno zamijeniti.
- b) *BMP-7 podskupina* sastoji se od BMP-5, -6, -7, -8 i Drosophila Gbb.
- c) *GDF-5 podskupina* uključuje GDF-5, -6 i -7.
- d) BMP-9 i BMP-10 su dva člana četvrte podskupine.

Međusobna homologija u sljedovima između pojedinih članova obitelji BMP varira od 42% do 92%. Nakon cijepanja N-terminalne domene prekursora, C-terminalnu domenu BMPs obično čini homodimer u kojem postoje dvije disulfidne veze (osim GDF-3 i GDF-9). Za razliku od TGF- β , C-terminalni domena BMPs obično sadrži N-povezana glikozilacijska mjesta i ne čine latentni kompleks sa N-terminusom svog prekursora.

1.2. Koštani morfogenetski protein - 9

BMP -9, također nazvan i čimbenikom rasta i diferencijacije-2 (GDF-2), prvo je kloniran iz mišje fetalne jetre (28).

Prekursor ljudskog BMP-9 je građen od 429 aminokiselina s molekularnom težinom od 47 kDa. Nakon post-transkripcijske modifikacije, nezreli prekursor je podijeljen u pro- i zreli regiju (13 kDa). Zreli BMP-9 pokazuje tipičan cisteinski čvor u građi i konfiguraciju poput leptira s α heliks epitopom i dva beta naslijeđena lista koja se protežu iz jezgre molekule (F1 i F2), što odstupa od poznatih regija koje su važne za vezanje BMP na receptor.



Slika 1. Tipičan cisteinski čvor u građi molekule BMP-9 te konfiguracija poput leptira s α heliks epitopom i dva beta naslijeđena lista (F1 i F2), što odstupa od poznatih regija koje su važne za vezanje BMP na receptor (29, 30).

Song i sur. su 2010. godine utvrdili kako molekula BMP-9 kao i molekula BMP-6 na mjestu 60 od N-terminalnog kraja ima aminokiselinu lizin (Lys60) (30). Usporedbom s ostalim BMPs utvrđena je rezistencija na inhibiciju noginom kod BMPs koji na 60. poziciji od N-terminalnog kraja imaju lizin što se pokazalo i kao ključna odrednica za povećanu potenciju BMP-6. Identifikacija Lys60 u BMP-6 kao izvora smanjene osjetljivosti na inhibiciju noginom omogućuje stvaranje BMPs vrhunske agonističke aktivnosti obećavajuće za buduću kliničku primjenu (29, 30).

I u obliku zreloj za sekreciju BMP-9 sadrži pro-regiju na N-kraju, što ima za zadatak stabilizirati molekulu (29). To je rezultat potrebe za stabilizacijom molekule nakon sekrecije, a zadržana je domena aktivna. U fiziološkim uvjetima BMP-9 cirkulira u serumu i plazmi u koncentraciji od oko 5 ng/ml pa mu je pripisana i izvjesna uloga u cirkulaciji (31). Raste količina dokaza koji upućuju na to da BMP-9 sudjeluje u raznim fiziološkim procesima, kao što su: cijeljenje kosti, hematopoeza, u homeostazi željeza i glukoze te angiogenezi (32-35). Među brojnim i raznolikim ulogama su i one u hondrogenezi, osteogenezi, hepatogenezi te kolinergijskom usmjeravanju neurona ventralnog telencefalona tijekom embrionalnog razvoja. In vitro i in vivo, BMP-9 potiče kolinergičnu diferencijaciju i sintezu acetilkolina u rostralnom telencefalonu (19, 20).

Herrera i sur. našli su pozitivnu ekspresiju BMP-9 u 25% karcinoma porijeklom iz epitela jajnika. Kod nekih od tih karcinoma, autokrini BMP-9 signalizacija olakšava metastaziranje raka (36). Kod raka prostate, BMP-9 sasvim suprotno suzbija rast stanica raka putem poticanja stanica na apoptozu (37). U stanicama raka dojke inhibira rast, migraciju i invaziju (38).

Song i sur. utvrdili su da BMP-9 uzrokuje proliferaciju stanica hepatocelularnog karcinoma (HCC) u kulturi štakorskih HepG2 stanica (39). BMP-9 mRNA je također

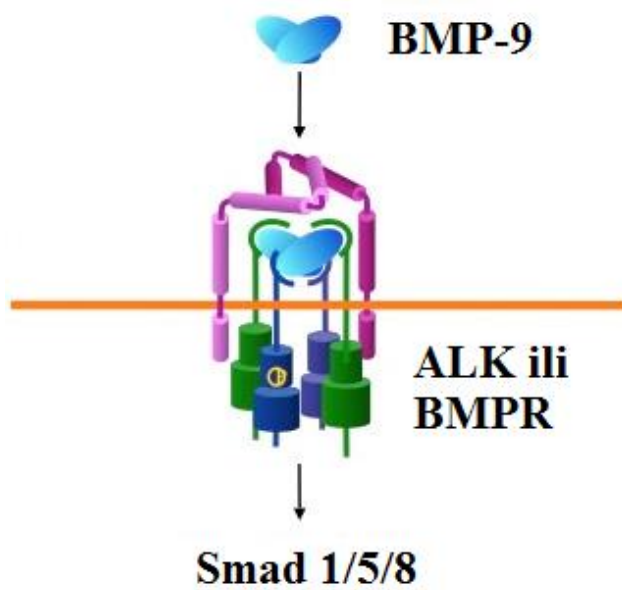
izolirana iz nekih tkiva tijekom embriogeneze miša, dok je u odraslog štakora, BMP-9 izražen u jetri gdje potiče proliferaciju stanica uzgojenih u kulturi.

Uzevši u obzir njegova brojna svojstva i funkcije, BMP-9 bi mogao biti slijedeći pripadnik obitelji BMPs kojemu će se dokazati regenerativna uloga kakvu neki od članova ove obitelji već imaju dokazanu (2, 40).

1.3. Signalni put

Receptori za BMPs su serin/treonin kinazni receptori, građeni od kratke izvanstanične domene sa 10 do 12 cisteinskih ostataka, pojedinačne transmembranske domene i unutarstanične serin/treonin kinazne domene. Na površini stanice dolazi do spajanja BMP liganda s izvanstaničnom domenom BMP receptora čime se stvara signalni kompleks. Postoje tri različita BMP receptora tip I: activin receptor-like kinase (ALK2), ALK 3 (BMPR-IA) i ALK 6 (BMPR-IB) i tri receptora tip II: BMP tip II receptor (BMPR-II), activin tip IIA receptor (ActR-IIA) i activin tip IIB receptor (ActR-IIB) (41-45). Neki od njih služe kao receptori i ostalim članovima nadobitelji TGF-beta. Koji će od receptora tip I stupiti u interakciju s pojedinim BMP određeno je strukturnim obilježjima i liganda i receptora. Aktivacija BMP signalnog puta započinje vezanjem BMP liganda za kompleks receptora tipa I i tipa II nakon čega receptor tipa I procesira BMP signal u stanicu i pokreće signalni put. Unutar TGF- β nadobitelji prijenos signala se većinom odvija putem Smad signalnog puta. Smad proteini se dijele u tri razreda: receptorom regulirani Smad (R-Smad: Smad 1, Smad5, Smad8), kostimulator Smad (co-Smad ili Smad4) i inhibitorni Smad (I-Smad: Smad6 i Smad7) (46-50). Velika većina BMPs neselektivno aktivira Smad 1, 5, i 8, dočim TGF- β aktivira Smad 2 i 3. Aktivirani tip I BMP receptora fosforilira Smad 1, 5 ili 8 koji se spaja sa Smad 4 u jedan heterodimerski kompleks. Fosforilacija Smad 1, 5 ili 8 ovisi o vezanom ligandu. Taj heterodimerski kompleks ulazi u jezgru i veže se za SME (eng. Smad DNA

binding element), odnosno BRE (eng. BMP responsive elements) koji regulira prijepis gena (51-53).



Slika 2. BMP-9 signalni put koristi Smad 1, 5 i 8.

1.4. Jetra, BMP – 9 i metabolizam glukoze

Jetra je endokrina i egzokrina žlijezda. Ona obavlja raznovrsne funkcije, kao što su: deponiranje i filtriranje krvi, neutraliziranje toksina, održavanje normalne razine krvnog šećera, masti u cirkulaciji, u jetri se vrši sinteza kolesterola, sinteza bjelančevina plazme, proizvode žučni pigmenti i soli žučnih kiselina. U jetri se pohranjuju vitamin A, D i B₁₂, a također se stvaraju i proteini procesa zgrušavanja krvi. Jetra je povezana s većinom metaboličkih sustava u tijelu pa je nazivaju *"središnjim kemijskim laboratorijem organizma"*. Tijekom probave, glukoza se iz crijeva dopremi u jetru gdje se pohranjuje kao glikogen. Inzulinski receptori u masnom tkivu, jetri i mišićnim stanicama posreduju u olakšavanju korištenja glukoze. Inzulin, naime, regulira ulazak glukoze u stanicu i potiče stvaranje glikogena.

BMP-9 djeluje općenito na metabolizam stanica. Nedavno je BMP-9 identificiran kao regulator metabolizma glukoze moduliranjem transkripcije nekoliko gena koji su uključeni u metabolizam glukoze i masnih kiselina. Smanjuje proizvodnju glukoze u uzgojenim stanicama, a smanjuje i glikemiju u dijabetičnih miševa. Uz spomenuta hipoglikemijska svojstva, Chen i sur. su utvrdili kako BMP-9 ima učinak i na metabolizam lipida (33). BMP-9 inhibira glukoneogenezu i mijenja izražaj ključnih enzima metabolizma lipida - maličnog enzima (ME) i enzima sintetaze masnih kiselina (eng. fatty acid syntetase, FAS).

Prvi je puta izdvojen iz jetre miša, gdje je dokazano njegovo lučenje iz stanica potpornog tkiva jetre (39). Osim izražaja u jetri miša, BMP-9 je pokazao svojstvo vezanja za stanice ljudskog hepatoma te mišje hepatocite (29, 54). Cvijanović i sur. su 2008. objavili nalaze ekspresije BMP-9 u ljudskoj jetri (55).

Hepatociti su dominantan tip parenhimatoznih stanica u jetri. Oni čine gotovo 90% mase jetre i oko 60% od ukupnog broja jetrenih stanica. Hepatociti su poredani u radijalno

postavljene tračke koji međusobno anastomoziraju, a između njih teku sinusoidne kapilare. Veća skupina hepatocita grupirana oko centralne vene čini jetreni režnjić (lobulus hepatis). Prostor između režnjića (spatium interlobulare) ispunjen je vezivnim tkivom, u kome se nalaze: a. interlobularis, v. interlobularis, ductus biliaris te limfne žile i živci. Između endotela sinusoidnih kapilara i površine jetrenih stanica nalaze se perikapilarni prostori (perisinusoidalni ili Disseovi prostori). Stanice Disseovih prostora jesu: Kupferove stanice, zvjezdolike stanice jetre i endotelne stanice jetre. Dvodimenzionalna citoarhitektura jetre podijeljena je na razini jetrenog režnjića u tri zone. Periportalni hepatociti u aferentnoj i pericentralni hepatociti u eferentnoj zoni jetrenog režnjića pokazuju različite metaboličke kapacitete i substaničnu strukturu. Ovaj koncept rezultirao je pojmom metaboličke zonacije jetre. Funkcionalno, zona I je zadužena za procese oksidacije – glukoneogenezu i β -oksidaciju masnih kiselina. Ta je zona smještena najbliže portalnoj veni, ali i ogranku jetrene arterije. Ta je zona najbolje oksigenirana i najosjetljivija na djelovanje toksina. Druga, središnja zona, obilježena je nešto lošijom oksigenacijom. Treća, centrilobularna zona je najslabije oksigenirana i zadužena je za glikolizu i lipogenezu (56). Periportalni hepatociti u aferentnoj i pericentralni hepatociti u eferentnoj zoni jetrenog režnjića pokazuju različite metaboličke kapacitete i substaničnu strukturu. Ova je podjela najočitija u početnoj fazi ciroze jetre. U citoplazmama hepatocita centrilobularne zone pojavljujuse najčešće velike svijetle vakuole koje potiskuju jezgre na periferiju (makrovezikularna steatoza) ali nerijetko i sitne vakuole po citoplazmi, najizraženije u blizini centralnih vena (djelovi jetrenih režnjića najosjetljivija na ishemijska, metabolička i toksična oštećenja) (57-60). Reverzibilno oštećenje hepatocita očituje se i u bubrenju (balonirane stanice), a daljnje oštećenje manifestira se pojavom Mallory-jevih hijalinih citoplazmatskih tjelešaca. Nazočna je pojedinačna nekroza hepatocita s pojačanom eozinofilnosti citoplazme, piknozom i karioreksom uz upalno reaktivno nakupljanje neutrofilnih granulocita. Može se zamijetiti

početno odlaganje kolagena u blizini centralnih vena, u stjenkama sinusoida i oko pojedinih hepatocita.

Osim ultrastrukturne, citoarhitektura jetre pokazuje i metaboličku heterogenost. Iz navedenog proizlazi da su hepatociti pluripotentni. Njihov položaj unutar pojedine zone, zavisnost o mikrocirkulaciji i sposobnost da migriraju među zonama vjerojatno određuju njihovu trenutačnu metaboličku funkciju i prilagodbu pojedinoj funkcionalnoj zoni.

Kod po život opasnih ozljeda poput onih od lijekova, kemijskih toksina (npr. ugljikovog tetraklorida), resekcije ili kod akutnih virusnih infekcija, obično nedijeleći zreli hepatociti ponovno ulaze u stanični ciklus s ciljem regeneracije jetre (61). Međutim, u slučaju teže ili kronične ozljede, ili kada zreli hepatociti nemaju više kapaciteta za regeneraciju bilo zbog starenja ili nemogućnost ulaska u mitozu iz bilo kojeg razloga, aktivira se druga vrsta mirujućih stanica, onih progenitornih za koje se mislilo da mirno odsjedaju u epitelu intrahepatalnih žučnih kanalića. Te se stanice mogu diferencirati bilo u hepatocite bilo u kolangiocite. Stoga je regeneracija jetre i dalje moguća (62).

1.4.2. Uloga koštanih morfogenetskih proteina u jetri

Molekula BMP-2 izražena je u odrasloj zdravoj jetri i negativno utječe na proliferaciju hepatocita. Na štakorskom modelu uočeno je smanjenje BMP-2 ekspresije nakon parcijalne hepatektomije što ukazuje da je takva supresija bitna radi osiguranja normalne proliferacije hepatocita (63).

BMP-4 i-7 tijekom embrionalnog razvoja reguliraju proliferaciju i diferencijaciju jetrenog pupoljka dovodeći do potpune diferencijacije hepatocita (64, 65, 66). Ekspresija BMP-4 pojačava se u jetri štakora nakon podvezivanja zajedničkog žučovoda, te dovodi do aktivacije zvjezdolikih stanica jetre, na temelju čega je zaključeno da bi on mogao posredovati u razvoju jetrene fibroze kod ovog tipa jetrenog oštećenja. (67). 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 (68). Uloga BMP-6 posebno je istražena u hemokromatozi. 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 (69). BMP-7 smanjuje progresiju fibroze u miševa intoksiciranih s CCl₄ i onemogućava epitelno-mezenhimalnu tranziciju hepatocita. On ubrzava regeneraciju jetre nakon parcijalne hepatektomije u miševa regeneracija je bitno otežana nakon primjene anti-BMP-7 protutijela (65). Međutim postoje i podatci 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 HSCs nakon što su u kulturi stanice inficirane adenovirusom koji kodira BMP-7. U tako stimuliranim HSCs uočena je povećana ekspresija kolagena tipa I i fibronektina iz čega je zaključeno da bi BMP-7 mogao doprinjeti razvoju jetrene fibroze (70).

Iz svega navedenog može se zaključiti da članovi obitelji BMP imaju značajnu ulogu u razvoju i regeneraciji jetre, te kao posrednici u razvoju i inhibiciji procesa fibrogeneze.

1.4.3. BMP-9 u regeneraciji jetre

Djelovanje različitih citokina na mehanizme jetrene regeneracije do sada je ispitivano u mnogim studijama, no specifični učinak BMP-9 kao hepatoregenerativne molekule još uvijek nije istražen. BMP-9 je u velikoj količini eksprimiran u fetalnoj jetri (39) gdje ga produciraju HSCs, KCs i endotelne stanice, te dovodi do proliferacije hepatocita (39, 71). Djelovanje na hepatocite ostvaruje putem ALK-1 receptora izazivajući jaku ekspresiju gena uključenih u proliferaciju hepatocita i fibrogenezu (72).

BMP-9 djeluje kao autorini/parakrini medijator retikuloendotelnog sustava jetre.

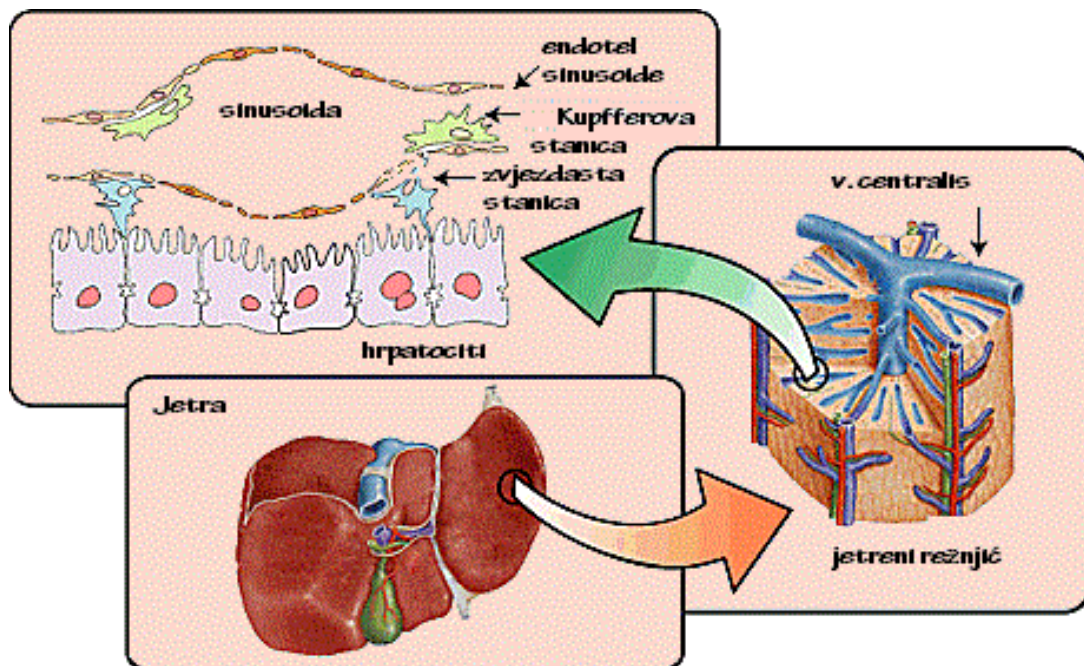
Citokini su proteini male molekulske mase proizvedeni iz mnogih stanica u fiziološkim i patološkim stanjima. Oni se vežu za specifične receptore na staničnoj membrani ciljnih stanica, gdje izazivaju kaskadu unutarstaničnih reakcija koje mogu mijenjati određene funkcije specifične za stanicu, poput: obrane, pokretanja, adhezije i apoptoze. Mnogi citokini mogu djelovati sinergistički bilo vezivanjem za isti stanični receptor na membrani, bilo preklapanjem intracelularnih signalnih molekula. Mnogi citokini imaju plejotropne funkcije koje omogućuju čak i izazivanje antagonističkih učinaka jednog te istog citokina. Citokini su najprije opisani kao imunomodulacijske molekule, a i danas je obrana domaćina jedna od njihovih najzapaženijih funkcija. Jetra slijedi pravila djelovanja citokina pružajući dom stanicama koje su vrlo osjetljive na djelovanje citokina. Hepatociti nose receptore za razne citokine: interleukin-1 alfa (IL-1 α), interleukin 1 beta (IL-1 β), čimbenik nekroze tumora alfa (eng. tumor necrosis factor – α , TNF- α) i interleukin-6 (IL-6). Štoviše, receptori za čimbenike rasta, kao što su inzulinu sličan čimbenik rasta (IGF-I), inzulinu sličan čimbenik rasta II (IGF-II), epidermalni čimbenik rasta (EGF) i preobražavajući čimbenik rasta alfa (TGF- α) mogu kontrolirati proliferaciju hepatocita tijekom embriogeneze ili gubitak hepatocita nakon akutne ozljede jetre. Citokinski receptori na hepatocitima mogu biti uključeni u razvoj bolesti jetre, primjerice u hepatokarcinogenezu. Sliku o jetri kao organu čiju funkciju uvelike nadziru citokini upotpunjuju neparenhimske stanice. Kupfferove stanice su makrofazi, za koje se zna da sintetiziraju pro-inflamatorne citokine poput IL-1, IL-6 i TNF- α . Otpušteni citokini mogu parakrino stimulirati hepatocite i druge ne-parenhimatozne staniceu jetri. . U fibrozi jetre, neparenhimske stanice su važni izvori preobražavajućeg čimbenika rasta beta (TGF- β), ili ključni parakrino/autokrini posrednik povećanog taloženja proteina izvanstanične tvari.

Za razliku od drugih organa, jetra ima jedinstvenu sposobnost vratiti izvornu masu (npr. nakon djelomične hepatektomije ili akutne toksične ozljede) u roku od jednog tjedna. Misli se kako citokini igraju ključnu ulogu u početnoj fazi proliferacije hepatocita, kao i u

obrnutom procesu. *bl*ako mnogi citokini dokazano stimuliraju sintezu DNA hepatocita in vitro, njihova točna uloga in vivo ostaje nerazjašnena. Poznato je kako citokini induciraju čimbenike transkripcije, čime se aktiviraju IL-6 i TNF- α . Serumske razine oba ova citokina rastu ubrzo nakon djelomične hepatektomije.

1.4.4. Hepatociti i jetrene zvjezdolike stanice

Hepatociti su dominantan tip parenhimatoznih stanica u jetri. Oni čine gotovo 90% mase jetre i oko 60% od ukupnog broja jetrenih stanica.



Slika 3. Shematski prikaz jetre, jetrenog režnja i perisinusoidalnih prostora.

Iako se hepatociti ne umnažaju u kulturi, oni imaju vrlo jak potencijal diobe in vivo. Zbog tog potencijala, funkcija i veličina jetre nakon djelomične hepatektomije mogu biti nadoknađeni u u nekoliko dana. U histološki normalnoj jetri, jetrene zvjezdolike stanice nalaze se u Disseovim prostorima te na njih otpada 5-8% ukupnog broja jetrenih stanica. Funkcija mirujućih HSCs je uglavnom nepoznata, izuzmemo li nekoliko studija koje su pokazale da HSCs prezentiraju antigen tijekom imunskog odgovora. (73, 74).

Kod oštećene jetre, TGF- β 1 potiče aktivaciju HSCs, koje mijenjaju fenotip u stanicu poput miofibroblasta, što je ključni korak u razvoju fibroze jetre (75). Nakon prestanka oštećenja jetre, na životinjskom modelu, aktivirane zvjezdolike stanice se uklanjaju apoptozom, a aktivni enzimi razgrađuju izvanstaničnu tvar. Iako ova zapažanja moraju tek biti klinički potvrđena na ljudima, ukazuju na potencijal za iskorištavanje čimbenika koji nadziru kolagenaznu aktivnost s ciljem razvijanja učinkovite antifibrotičke terapije (76, 77).

1.5. Ciroza jetre

Ciroza jetre je kronična bolest jetre tijekom koje se jetreno tkivo zamjenjuje vezivnim tkivom što za krajnju posljedicu ima prestanak funkcije 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. 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 (eng. nonalcoholic 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 je ciroza koju karakterizira velika količina vezivnog tkiva u jetri i smanjenje jetrenih funkcija.

Mikroskopski, cirozu karakterizira prisutnost regeneracijskih čvorića, okruženih fibroznim septima. U ovim čvorićima, regeneracijski hepatociti su poredani bez reda. Vide se i različite promjene: fokalna atrofija, reverzibilna oštećenja, nekroza, žarišta hipertrofije, hiperplazije i displazije kao i maligna alteracija. Portalni prostor, centralne vene i radijarni raspored hepatocita se ne razaznaju. Vezivne pregrade građene su od gustog kolagena, vaskularnih struktura, bilijarnih duktusa, limfocita i drugih upalnih stanica. U rukama kvalificiranih tumača, biopsija je prilično dobra za postavljanje dijagnoze, čime se uzorak kvalitativno analizira te može pružiti potencijalno korisne informacije koje se mogu koristiti za procjenu bolesti, prognozu i kao vodič u liječenju.

U praćenju bilo koje bolesti važna je mjera uznapređovalosti. U većini kroničnih bolesti jetre, završna faza je ciroza s kliničkom dekompenzacijom, dok se u ranijim fazama govori o fibrozi ili cirozi različitog intenziteta. Najprecizniju informaciju o stupnju fibroze jetre dobivamo patohistološkom analizom adekvatnog uzorka u kojemu se procjenjuje uznapređovalost fibroze (stadij bolesti) i stupanj nekroinflamatorne aktivnosti (78). Dva najčešće primjenjivana sustava bodovanja navedenih promjena jesu Ishakova modifikacija Knodellovog indeksa histološke aktivnosti (HAI) i METAVIR klasifikacija (79).

Definicija ciroze treba uključivati najmanje tri važna čimbenika: prvo, poremećaji cirkulacije koji doprinose razvoju portalne hipertenzije, drugo, promjena jetrene funkcije što u konačnici može dovesti do dekompenzirane bolesti jetre, i treće, povećan rizik od maligne transformacije, fenomen relevantan kod ciroze svih etiologija.

Tu, doduše, valja spomenuti da je povećan rizik od hepatocelularnog karcinoma (HCC) povezan s cirozom jetre svih etiologija. Povećana opasnost od HCC u pre-cirotičnih bolesnika dokazana je samo kod nekih bolesti jetre (do 40% bolesnika inficiranih virusom hepatitisa B, odnosno 17% bolesnika inficiranih virusom hepatitisa C u pre-cirozi razvije HCC).

1.6. Histopatološka procjena uznapređovalosti ciroze jetre

U praćenju bilo koje bolesti važna je mjera uznapređovalosti. Ciroza 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 regeneracijskih 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. U većini kroničnih bolesti jetre, završna faza je ciroza s kliničkom dekompenzacijom, dok se u ranijim fazama govori o fibrozi ili cirozi različitog intenziteta. Iako se još uvijek smatra zlatnim standardom za procjenu fibroze, biopsija ima određena ograničenja (80). 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). Isto tako, valja reći da biopsijom 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. (81).

U osnovi, govoreći o bilo kojem sustavu evaluacije uzoraka tkiva jetre bitno je reći kako se radi 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. Već je poznato kako je dugoročna prognoza bolesti određena prije svega stadijem jetrene fibroze. Zapravo se radi o kategorijskim varijablama gdje ne postoji kontinuirani prijelaz između pojedinih kategorija u smislu količine umnoženog veziva. Zato treba naglasiti da je na ovakav način procjene fibroze semikvantitativan, no nudi i mogućnost opisivanja tkivnog uzorka razvoja fibroze, a on se razlikuje ovisno o etiologiji bolesti (79). 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 fibroznih septuma između pojedinih portalnih prostora i porto-centralnih premoštenja. Zahvaćenost jetre ovim promjenama može biti različita, tj. može doći do pojave porto-portalnih vezivnih

septuma u manjem broju jetrenih režnjića 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. Kao primjer navodim histološku klasifikaciju virusnog hepatitisa po Ishaku i sur. (82) koja se uz METAVIR klasifikaciju (83) najčešće primjenjuje u kliničkoj praksi u ovoj indikaciji. Vidljivo je da su razdvojene dvije zasebne kategorije: stupanj upalne aktivnosti što se označava kao stupanj bolesti (eng. grade) i zastupljenost, ili bolje rečeno, tkivni uzorak fibroze, što se označava kao stadij bolesti (eng. stage).

U cirozi je moguć raspon histološke slike od relativno tankih septuma i regeneracijskih makronodula, do vrlo debelih vezivnih septuma koji okružuju male regeneracijske čvoriće hepatocita. Primjerice, 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 (Regev i sur., 2002). 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 se definira količina vezivnog tkiva, te iako stadij i količina fibroze pokazuju dobru korelaciju, ona nije linearna pa bi bilo najispravnije kombinirati obje histološke metode za dobivanje što potpunije slike o stanju bolesti na tkivnoj razini (84).

1.7. Humoralno aktivirana regeneracija jetre

Kada ozljeda tkiva nadide određenu razinu, promjene funkcija pojedinih staničnih populacija, mogu se sažeti u sintagmi „odgovor akutne faze“. U posredovanju odgovora akutne faze citokini su ključni čimbenici. Njih otpuštaju aktivirane stanice (uglavnom mononuklearni fagociti, ali i fibroblasti i miofibroblasti) kao odgovor na ozljedu tkiva, a vežu receptori na ciljnim stanicama. Citokini koji čine odgovor akutne faze imaju plejotropne učinke na mnoge stanice u tijelu. Jedan veliki dio odgovora akutne faze orijentiran je na jetru koja je istaknuti izvor ali i meta citokina.

TNF- α je plejotropan citokin bitan za normalnu regeneraciju jetre. TNF- α antitijela sprječavaju regeneraciju jetre. Isto tako, miševi s isključenim genom (*knock out*) koji kodira TNF- α receptor-1 (TNF- α R1) pokazuju defekt u regeneraciji jetre. Budući da TNF- α vjerojatno nema mitogeni učinak na hepatocite, smatra se da priprema hepatocite za čimbenike rasta kao što su: hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor- α (TGF- α), i epidermal growth factor (EGF). HGF predstavlja plejotropni citokin s jakim stimulacijskim efektom za sintezu DNA hepatocita in vitro. Podsjeća na posrednike akutnog upalnog odgovora, ima morfogene i mitogene učinke, a pokazalo se da u eksperimentalnoj cirozi djeluje antifibrotički.

Sličnog je djelovanja i inzulin, premda nije klasični citokin. U eksperimentalnim uvjetima inzulin je potvrđen kao sredstvo koje potiče proliferaciju hepatocita (39). Ta je uloga inzulina potvrđena i time što, kod pacijenata s porto-kavalnim „shuntom“, jetra isključena iz cirkulacije krvi u kojoj ima inzulina, postupno atrofira.

Osim nakon hepatektomije, regeneracija jetre prati i druga oštećenja, pogotovo ona toksična. Tu se valja posebno osvrnuti na alkoholnu i bilijarnu cirozu. Fibroza je posljedica gotovo svih kroničnih bolesti jetre bilo da se radi o virusnima, alkohol-induciranima,

autoimunima ili metaboličkima. Taj naziv opisuje rezultat poremećenog cijeljenja rane proizišlog iz neravnoteže u stvaranju i razgradnji izvanstaničnog matriksa. Progresivna akumulacija izvanstaničnog matriksa u konačnici dovodi do razvoja ciroze u dijelu pacijenata, a sa sobom nosi i važne kliničke posljedice. Procjena regresije fibroze ne oslanja se samo na identificiranje histoloških promjena u fibrozi, već i na analizu podataka kroz vrijeme.

Regeneracija jetre je svojstvo razvijeno tijekom evolucije. Obnova jetre nakon djelomične hepatektomije (eng. partial hepatectomy, PH) postiže se mobiliziranjem svih zrelih staničnih populacija koje su prisutne u intaktnoj jetri (61, 85, 86). Na razdoblje između PH i početka ubrzane sinteze DNA u ostatku jetre utječe niz čimbenika (85), a vrhunac sinteze DNA primijećen je 20-22 sata nakon PH. Nakon 3 do 4 tjedna, uvelike je dostignuta prvobitna veličina, funkcija i struktura jetre, a 6 mjeseci nakon PH, regeneracija jetre se smatra općenito dovršenom (85), uz neznatna odstupanja od prvobitne veličine (5 do 10%). Proliferacija hepatocita najprije se događa periportalno – na hepatocitima koji su najbliže pritokama portalne vene (56). Unutar idućih 36-48 sati zahvaća pericentralno područje. Stanice drugih populacija unutar jetre kasne za hepatocitima, prosječno 24 sata kad je u pitanju početak intenzivne sinteze DNA. Dinamika kojom druge stanične populacije slijede hepatocite i način na koji čimbenici rasta koje luče hepatociti utječu na proliferaciju hepatocita daju naslutiti kako hepatociti djeluju kao mitogeni poticaj za proliferaciju drugih populacija (61). Tijekom prva tri dana nakon PH, hepatociti intenzivno proliferiraju, pa četvrtog dana nakon zahvata tvore nakupine smještene oko kapilara. Periportalno nastali hepatociti premještaju se duž sinusoide prema centralnoj veni. Iako brzinom od svega 0,32% promjera acinusa, dokazana je njihova pomičnosti među funkcionalnim zonama (87), premda postoji stanovito, argumentima potkrijepljeno, neslaganje (88).

1.7.1. Reverzibilnost oštećenja jetre

Još od antičkih vremena i mita o Prometeju uočena je velika regeneracijska 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. (85). Da bi se to postiglo potrebna je adekvatna kirurška tehnika kojom 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 (85). Međutim, ukoliko se radi o bolesnoj jetri regeneracijska 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 slučaju pojam regeneracije ima šire značenje i podrazumijevao bi „*restitutio ad integrum*“, odnosno nestanak umnoženog veziva, ispravljanje strukturnih promjena u parenhimu i funkcionalnu regeneraciju jetre. Jedno od glavnih pitanja koje se nameće u tom smislu jest može li se primjenom određene terapije postići regresija ili potpuna reverzija fibroze ili čak ciroze (86-88).

Ranije su takva opažanja zabilježena kod alkoholne bolesti jetre, hemokromatoze i autoimunog hepatitisa kod kojih se terapijska intervencija sastojala od prestanka pijenja alkohola, odnosno venepunkcija putem kojih se otklanja suvišak željeza iz krvi te imunosupresivne terapije (89, 90, 91) U novije vrijeme razvojem učinkovite antivirusne terapije za kronični hepatitis B i C isto je uočeno i kod ovih bolesti (92, 93, 94).

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 (92, 95)

Osim toga, postoje i područja isključenja parenhima (eng. parenchymal 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 (96). 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. 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 (92, 95). Glede globalne arhitekture jetre, na eksperimentalnom modelu uočeno je kako se nakon razvoja ciroze i otklanjanja etiološkog čimbenika postiže smanjenje količine veziva, regeneracijski 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 (97).

U tom smislu nameće se i potreba redefiniranja histoloških klasifikacija jer je u svakoj klasifikaciji krajnji stadij ciroza. Kako je već nekoliko puta spomenuto, kategorija ciroze definirana je tkivnim uzorkom (čemu smo pokušali doskočiti), međutim unutar ove kategorije uznapređovalost promjena, počevši od količine veziva (79), 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 (75, 92, 98, 99).

1.8. Izvanstanični matriks, matriks-metaloproteinaze i gelatinaze

U normalnoj jetri izvanstanični matriks (ECM) služi kao stanična podrška. Kod malog oštećenja jetre, kad su normalna struktura i funkcija očuvane, odložen ECM će biti odstranjen u određenom vremenskom razdoblju, a HSCs će najvjerojatnije stupiti u apoptozu. Međutim, kada je ozljeda preteška, aktivacija i proliferacija HSCs postoje stalna, što u konačnici dovodi do fibroze ili čak ciroze jetre (100).

Matriks metaloproteinaze (MMPs) predstavljaju porodicu strukturno sličnih proteinaza koje razgrađuju izvanstanični matriks. ECM je kompleksna mreža strukturalnih i funkcionalnih makromolekula koje imaju važnu ulogu u morfogenezi organa i tkiva te u održavanju stanične i tkivne strukture i funkcije. Vjeruje se da MMPs imaju važnu ulogu u patogenezi akutnih i kroničnih destruktivnih bolesti preko degradacije ECM-a. Tako se, danas, osim utjecaja ECM-a na fiziološke procese, sve više govori i o njegovoj ulozi tijekom patoloških stanja. Bazalna membrana je poseban oblik ECM-a. Značajan dio strukture bazalne membrane u jetri, kao i općenito, čini kompleks kolagena tip IV. Kompleks intaktnog ECM-a ima važnu ulogu u održavanju strukturnog i funkcionalnog integriteta jetrenog reznjića. Promijenjen ili prekinut ECM kao podloga hepatocitima pokreće brojne patofiziološke signale koji rezultiraju različitim staničnim odgovorima. MMPs mogu cijepati različite proteine koji ne pripadaju ECM-u, generirajući biološke procese. Isto tako, MMPs imaju sposobnost oslobađati različite bioaktivne molekule s površine stanice, kao što su TNF- α , L-selektin, IL-6 i druge. Na taj način MMPs mogu biti uključene u kontrolu stanične smrti, upale, infekcije i angiogeneze.

Do sada je otkriveno više od 20 MMPs. One se dijele na osnovi specifičnosti njihovog supstrata i funkcije na gelatinaze (MMP-2, MMP-9), kolagenaze (MMP-1, MMP-8, MMP-13), stromelizine (MMP-3, MMP-10), membranske vrste MMPs (MT-MMP, MT1-MMP, MT1-MMP-3), te druge kao što su matrilizin (MMP-7), stromelizin 3 (MMP-11) i metaloelastaze (MMP-12).

Neravnoteža između ekspresije i inhibicije MMPs generira destrukciju tkiva ili abnormalnu reparaciju tkiva. In vivo MMPs se inaktiviraju uglavnom preko tkivnih inhibitora (eng. tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) koji se vežu s visokim afinitetom na katalitičko mjesto MMP. TIMP produciraju različite vrste stanica, kao što su makrofagi, fibroblasti i polimorfonukleari.

Pojedine MMPs, kao što su gelatinaze (MMP-2, MMP-9) imaju sposobnost prekida kolagena, odnosno degradacije struktura bazalne membrane jer posjeduju supstrat koji je specifičan za kolagen tip IV. Gelatinaze uz Cink (Zn) u katalitičkoj domeni imaju i dodatnu domenu s tri kaskadna spoja koja se ponavljaju i slične fibronektinu tip II, a cijepaju katalitičko područje te stupaju u interakciju s kolagenima i gelatinima. Gelatinaza B (MMP-9) ima regiju koja je homologna kolagenu tip V. Proizvodnja i aktivnost MMPs je visoko regulirana. MMPs secerniraju različite vrste stanica u inaktivnoj formi, a proteolitička im je aktivnost u tkivima regulirana enzimskom aktivacijom i inhibicijom. Nekontrolirana ekspresija MMPs može uzrokovati oštećenja tkiva i dovesti do razvoja brojnih destruktivnih bolesti.

MMP-2 secerniraju u prvom redu fibroblasti i epitelne stanice, dok su neutrofilni glavni izvor MMP-9. Pored toga, MMP-9 proizvode i druge vrste stanica kao što su makrofagi, epitelne stanice i fibroblasti.

Na taj način mogu utjecati na rano remodeliranje tkiva nakon oštećenja parenhima. Isto tako, imaju ključnu ulogu u migaciji brojnih leukocitnih populacija, kao što su T-limfociti

i neutrofili preko bazalne membrane. No, disregulacija produkcije, sekrecije i aktivacije MMPs i njihovih TIMPs može dovesti do brojnih patoloških stanja.

Iako nije poznat mehanizam nastanka, povišene vrijednosti MMP-2 i MMP-9 dokazane su i u nekim bolestima, kao što su angina pectoris, akutna koronarna bolest i arteriovenska malformacija mozga.

Posljednjih godina je značajno izmijenjena predodžba o ireverzibilnosti fibroze. Fibroza, tj. stvaranje ožiljka je podložno vanjskim utjecajima i nije ni statički ni jednosmjernan proces. Aktiviranje zvjezdolikih stanica jetre (Itove stanice) središnji je događaj u fibrozi jetre (73). U svim oblicima ozljede jetre, ove potporne stanice aktivacijom postaju kontraktibilni, proliferativni i fibrotički elementi. U modelima početnog oštećenja jetre u životinja, gomilanje izvanstanične tvari razmjerno je povećanju razgradnje izvanstanične tvari. Ključni posrednici aktiviranja jetrenih zvjezdolikih stanica uključuju niz citokina i njihovih receptora čije stanično porijeklo još uvijek nije posve jasno. Njihovo djelovanje je, međutim, regulirano količinom aktivnog proteina i koncentracijom tkivnih inhibitora metaloproteinaza. Kod prestanka oštećenja jetre na životinjskom modelu, aktivirane zvjezdolike stanice se uklanjaju apoptozom, aktivnost TIMPs se smanjuje, čime se dopušta aktivnim enzimima da razgrade vanstaničnu tvar. Iako ova zapažanja na životinjama moraju tek biti potvrđena na ljudima, ukazuju na potencijal za iskorištavanje čimbenika koji nadziru kolagenaznu aktivnost s ciljem razvijanja učinkovite antifibrotičke terapije.

Veća zastupljenost i brže umnažanje veziva ukazuju na progresivnu bolest. Nekroinflamatorna aktivnost ne korelira dobro s fibrozom, pa time niti sa progresijom bolesti. U većini eksperimentalnih studija s oštećenjem jetre stupanj oštećenja parenhima praćen je mjerenjem aktivnosti matriks-metaloproteinaza. MMPs su endopeptidaze ovisne o cinku. Pripadaju široj obitelji metzicin proteaza. MMPs igraju ključnu ulogu u fiziologiji vezivnog

tkiva, morfogenezi i zacjeljivanju rana, a poremećaj njihove regulacije je dokazan u brojnim bolestima. Gelatinaze (MMP-2 i -9) uz navedeno, cijepaju te stupaju u interakciju s kolagenima i gelatinima. Gelatinaze imaju sposobnost degradirati elastin i kolagen tip IV. Time mogu utjecati na rano remodeliranje tkiva nakon oštećenja parenhima. MMP-2 secerniraju u prvom redu fibroblasti i epitelne stanice, dok su neutrofili glavni izvor MMP-9. Logičnim se čini razmišljanje da će smanjena aktivnost MMPs rezultirati bržom akumulacijom kolagena i ostalih komponenti izvanstaničnog matriksa.

ECM predstavlja kompleksnu mrežu strukturalnih i funkcionalnih makromolekula koje imaju važnu ulogu u morfogenezi organa i tkiva te u održavanju stanične i tkivne strukture i funkcije (101). Međutim, osim utjecaja ECM-a na fiziološke procese, sve se više pojavljuju i pokazatelji o njegovoj ulozi tijekom patoloških stanja, osobito prilikom odgovora domaćina na infekcije. Matriks metaloproteinaze predstavljaju porodicu strukturno sličnih proteinaza koje razgrađuju ECM. (102, 103).

Gelatinaze (MMP-2, MMP-9) uz homologiju s ostalim metaloproteinazama imaju i dodatnu domenu s tri kaskadna spoja koja se ponavljaju i slične fibronektinu tip II, a cijepaju katalitičko područje te stupaju u interakciju s kolagenima i gelatinima (104).

U normalnim okolnostima, tkiva ne pohranjuju MMPs i njihova konstitutivna ekspresija je minimalna. Dakle, proizvodnja i aktivnost MMPs je visoko regulirana, osim neutrofilne kolagenaze i MMP-9, koje su smještene u sekundarnim i tercijarnim granulama da bi se mogle brzo osloboditi. Ekspresija MMPs je regulirana faktorima rasta, citokinima, kemijskim agensima, fizikalnim stresom i ECM-om. MMPs secerniraju različite vrste stanica u inaktivnoj formi, a proteolitička im je aktivnost u tkivima regulirana enzimskom aktivacijom i inhibicijom (102). Budući da imaju sposobnost katalizirati degradaciju strukturalnih proteina ECM-a, pretpostavlja se da je njihova glavna uloga u fiziološkom remodeliranju tkiva za vrijeme razvoja, rasta, uterinog ciklusa, postpartalne involucije i

reparacije ozljeda (102,105,106).

Nekontrolirana ekspresija MMPs može uzrokovati oštećenja tkiva i dovesti do razvoja brojnih destruktivnih bolesti, kao što su artritis, ruptura aterosklerotskog plaka, aneurizma aorte i progresija tumora. Stanice u kontaktu s intaktnim ECM-om normalno funkcioniraju, dok pregradnja i razgradnja ECM-a mogu dodatno utjecati na strukturnu nestabilnost (102). Kontakt s promijenjenim ili razgrađenim ECM-om pokreće brojne patofiziološke signale koji rezultiraju različitim staničnim odgovorima. MMPs mogu cijepati različite proteine koji ne pripadaju ECM-u generirajući biološke procese.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

BMPs jesu signalne molekule na mjestima epitelno-mezenhimalne tranzicije, a neki BMP članovi u tom smislu pokazuju sposobnost regeneracije organa. Pretpostavka je da se ekspresija BMP-9 mijenja sukladno oštećenju jetrenog parenhima. S obzirom da BMP-9 izaziva proliferaciju stanica ljudskog hepatoma te pokazuje hipoglikemijski učinak sličan inzulinu, moguće je da BMP-9, baš poput inzulina pomaže regeneraciji oštećene jetre. Uzimajući u obzir činjenicu da regeneracijske promjene u jetri započinju periportalno, za očekivati je da ekspresija BMP-9 u jetri bude intenzivnija u tamošnjim regeneracijskim, nego u hepatocitima zdrave jetre, iste lokalizacije. U nodularnoj fibrozi je zbog porto-kavalnog shunta smanjen dotok inzulina, zbog čega očekujemo posljedičnu veću produkciju BMP-9 u hepatocitima regeneracijskih čvorića.

Prema tome, ciljevi predloženog istraživanja jesu:

1. Utvrditi ekspresiju i lokalizaciju BMP-9 i TGF- β 1 u tkivu zdrave jetre i različitim stupnjem, cirozom zahvaćene jetre u čovjeka (početna ciroza i nodularna ciroza).
2. Istražiti postoji li različita ekspresija BMP-9 i TGF- β 1 u hepatocitima jetrenog režnjića, prema podijeli jetrenog režnjića u centralnu zonu oko vene centralis, središnji dio režnjića te periferni dio uz interlobularni prostor (periportalni prostor).
3. Istražiti da li se ekspresija BMP-9 u hepatocitima razlikuje između zdravog tkiva i tkiva oštećenog različitim stadijima razvoja ciroze jetre.
4. Analizirati stupanj oštećenosti uzorka tkiva humane jetre u cirozi mjerenjem aktivnosti enzima matriks-metaloproteinaza -2 i -9 (MMP-2 i MMP-9).
5. Odrediti razinu ekspresije proteina BMP-9 i TGF- β 1 u odnosu na beta-aktin te kvantificirati intenzitet proteinskih signala u tkivu zdrave jetre i jetre koja je zahvaćena određenim stadijem ciroze (početna ciroza i nodularna ciroza).

6. Budući da je TGF- β 1 čimbenik koji potiče fibrozu, cilj je pratiti međusobni odnos razine proteina BMP-9 i TGF- β 1 u oštećenom tkivu jetre (početna ciroza i nodularna ciroza).

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Ovim istraživanjem analizira se uzorak oštećenog tkiva jetre čovjeka. Uzorci humane jetre dobiveni su iz arhive Zavoda za sudsku medicinu i kriminalistiku Medicinskog fakulteta u Rijeci (N=40). Patohistološkim pregledom je ustanovljena početna ciroza i nodularna ciroza. Prvu skupinu čine uzorci tkiva koji se histološki klasificiraju kao početna ciroza, sa slikom subendotelne i pericentralne fibroze (N=20). Drugu skupinu čine uzorci jetre u kojima se histološkim pregledom utvrdi neuređena nodularna struktura (N=20).

Za potrebu Western blot analize prikupljeni su svježi uzorci humane jetre koji su nakon patohistološkog pregleda klasificirani u nodularnu cirozu (N=20) i početnu cirozu (N=20). Kontrolnu skupinu čine uzorci svežeg tkiva jetre (N=20) i uzorci tkiva jetre iz arhive (N=20), onih ispitanika kod kojih na obdukciji i histološkim pregledom nisu nađene patološke promjene u jetri.

Istraživanjem su obuhvaćeni ispitanici stari od 25 do 50 godina, oba spola čiji su uzorci tkiva jetre prikupljeni u razdoblju od 2005.-2012. godine.

3.2. Metode rada

a) Histološko bojenje hemalaun eozin

Histološki rezovi se deparafiniziraju, rehidriraju u seriji alkohola padajućih koncentracija (100%, 96%, 75%) i dovedu se do vode. Slijedi bojenje tkivnih rezova hematoksilinom 10 min., ispiranje u vodi te uranjanje svega nekoliko sekundi u HCl kako bi se izvukao višak boje. Nakon ispiranja stakalca se boje u eozinu 5 min. Rezultat bojenja je crvena citoplazma i plava jezgra u stanicama.

b) Imunohistokemijska analiza

Imunohistokemijska analiza učinjena je standardnim postupkom imunodetekcije s imunoperoksidazom. Za imunohistokemijsku analizu tkivo humane jetre fiksirano je u 4% paraformaldehidu (PFA), nakon čega ide u postupak pripreme parafinskog bloka. Uklopljeno tkivo rezano je na debljinu od 3-5 μ m na Leica rotirajućem mikrotomu. Rezovi su postavljeni na silanizirana stakalca, osušeni na zraku i pohranjeni na +4 °C do analize. Slijedi deparafinizacija, uranjanjem u ksilol, a zatim rehidracija kroz padajuće koncentracije etanola do destilirane vode. Nadalje preparati su se inkubirani preko noći na +4°C s primarnim poliklonalnim zečjim anti-BMP-9 protutijelom i primarnim poliklonalnim zečjim anti-TGF- β 1 protutijelom (Abcam PLC, Cambridge, UK) u razrjeđenju 1:200. Nakon toga, preparat je ispran u PBS-u (eng. Phosphate Buffer Saline) i inkubiran sa sekundarnim biotiniziranim protutijelom u trajanju od 30 minuta. Uzorci su zatim izloženi streptavidinu konjugiranom na peroksidazu (LSAB + Kit, DakoCytomation, Denmark) te DAB-u (DakoCytomation, Denmark), koji služi za vizualizaciju. Kontrasno bojanje jezgara je s hematoksilinom. Preparat se uklapa u entelan i može se mikroskopirati. Rezultirajuća pozitivna reakcija je smeđe obojenje citoplazme, dočim su jezgre plave boje. Negativna kontrola je učinjena bez inkubacije u primarnom protutijelu. Uzorci su

analizirani uz pomoć Olympus BX50 optičkog mikroskopa (Olympus, Tokyo, Japan) te su učinjene mikrografije koristeći Olympus OM-4Ti digitalnu kameru (Olympus, Tokyo, Japan). Intenzitet obojenja imunohistokemijske reakcije je analiziran u programu NIH Image J software.

c) Izolacija proteina i Western blot analiza

Za Western blot analizu koristi se homogenat svježeg tkiva jetre čovjeka. Homogenati su dobiveni pulverizacijom uzorka tkiva jetre uz pomoć tekućeg dušika i lizirajućeg pufera. Koncentracija proteina je izmjerena metodom po Bradfordu u biofotometru (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

Za imunoblot analizu korišteno je 50µg proteina po uzorku. U postupku su korištena i 2 kontrolna standarda: standardni polipeptidni marker za određivanje imunoreaktivnog proteina (Precision Protein Standards, Bio-Rad) i protein koji je fiziološki izražen u humanoj jetri (β -actin). Potom je uslijedilo odvajanje proteina elektroforezom na 10 % SDS poliakrilamidnom gelu uz struju od 200V u trajanju 1h. Proteini se prenose na nitroceluloznu membranu kroz 45 min., uz struju od 100V. Uslijedi saturacija membrane u 5% mlijeku, nakon čega se membrana inkubira preko noći na +4°C s primarnim poliklonalnim zečjim anti-BMP-9 protutijelom i s primarnim poliklonalnim zečjim anti-TGF- β 1 protutijelom (Abcam PLC, Cambridge, UK) u razrjeđenju 1:200. Nakon ispiranja aplicira se protu-zečje protutijelo konjugirano s HRP (horseradish peroxidase) (Abcam, PLC, Cambridge, UK) u razrjeđenju 1:2000. Imunoreaktivni protein se vizualizira na membrani dodavanjem kemiluminiscentnog reagensa (Pierce Protein Research Products, Rockford, USA). Intenzitet signala proteinskog produkta je kvantificiran pomoću denzitometra (Kodak Image Station 440, LabImage, Halle, Germany).

d) Natrij-dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE) – zimografija

Gelatinolitička aktivnost MMP- 2 i -9 mjerena je se zimografijom gelatinaza. U analizi je korišteno 50 µg proteina po uzorku. Elektroforezom na 10% natrij-dodecil sulfat poliakrilamidnom gelu koji sadrži 0,1% želatine se oni onda razdvajaju. Nakon elektroforeze pri 4°C i struji napona 150 V, gel se ispiru kroz 30 min u 2.5% Triton X-100. Nakon toga ispiru se još kratko i reakcijskim puferom koji je priređen od 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM CaCl₂, 1 µM ZnCl₂ i 0.02% NaN₃. Isprani gel inkubira se kroz 42h na 37°C. Gelatinolitička aktivnost je vizualizirana bojanjem gela 0.1% otopinom boje Coomassie blue R-350 u trajanju od 90 min. Višak boje je uklonjen smjesom metanol-octene kiseline i vode (30:10:60 v/v) koja se izmjenjuje nova, 4 puta svakih 30 min. Nakon procesa elektroforeze i bojanja, intenzitet obojenosti zimograma mjeren je računalnim programom za obradu slike (NIH Image J software). Područja bez obojenosti na pozadini obojenoj plavo ukazuju na gelatinolitičku aktivnost.

3.3 Statistička analiza

Statistička analiza provedena je uz pomoć računalnog programa Statistica 8.1 (StatSoft). Deskriptivna statistika korištena je za prikaz svih ispitivanih varijabli. Najprije je izmjerenim vrijednostima određena normalnost raspodjele pomoću Kolmogorov- Smirnovljeva testa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Također se odabir statističkih testova za usporedbu razlike izmjerenih vrijednosti između ispitivane i kontrolne skupine uvodio u ovisnosti o normalnosti raspodjele. Kako je utvrđena normalna raspodjela rezultata od parametrijskih testova korištena je jednosmjerna analiza varijanci (one-way ANOVA) ili t-test za nezavisne uzorke. Statistički značajnima smatrane su razlike za $P < 0,05$.

3.4. Etički aspekti istraživanja

Istraživanje je provedeno uz pridržavanje etičkih principa i dobre kliničke prakse. Uzorci tkiva su prikupljeni u skladu s etičkim i bioetičkim principima te je osigurana privatnost (medicinska tajna) ispitanika/bolesnika uključenih u istraživanje i zaštita tajnosti podataka. Istraživanjem je obuhvaćeno rukovanje humanim tkivom, te je zajamčena anonimnost ispitanika, neškodljivost postupka po ispitanika te pravednost i dobročinstvo istraživanja u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije.

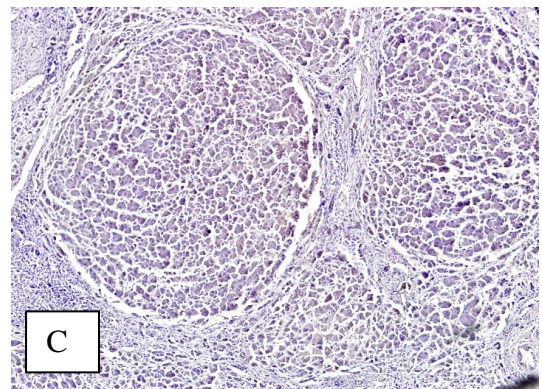
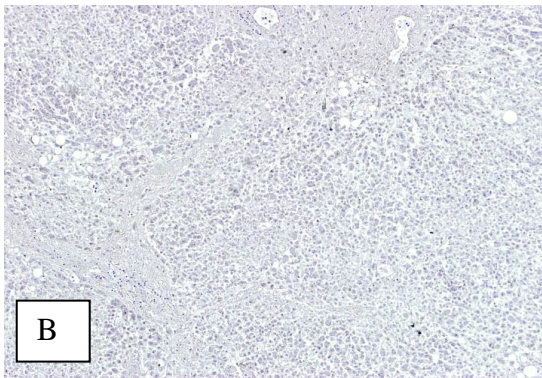
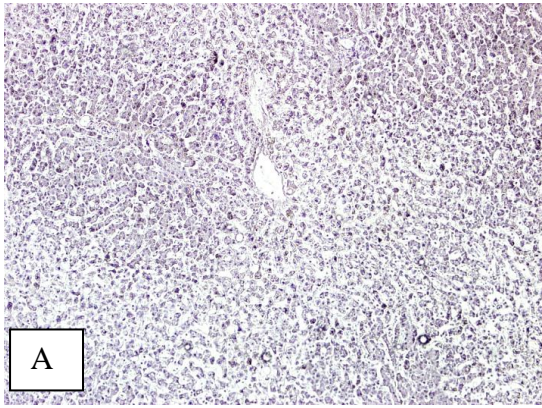
4. REZULTATI

4.1. Rezultati histološke analize

Tkivni presjeci jetre čovjeka obojani su hemalaun eozin bojilom te je na taj način dobiven uvid u stanične promjene tijekom razvoja jetrene ciroze.

U zdravoj jetri histološkom slikom vidi se građa od slabo ograničenih poligonalnih polja - režnjića (lobula) sastavljenih od radijalno raspoređenih gredica hepatocita oko centralne vene, a na periferiji režnjića, na mjestu gdje se sastaju više režnjića nalaze se Kiernanovi interlobularni ili periportalni prostori koji uz veću količinu veziva sadrže ogranke interlobularne vene, interlobularne arterije i žučnog kanalića. Gredice sadrže jedan do dva reda hepatocita, a odvojene su radijalno položenim fenestriranim krvnim kapilarama (sinusoidama). Između sinusoida i hepatocita nalazi se uski perisinusoidalni ili Disseov prostor u kojem je moguće pronaći Itove stanice s nakupinom lipida te brojne upalne stanice (slika 4A). U početnoj cirozi dolazi do promjene fiziološke strukture jetre. Većina hepatocita sadrži u citoplazmi masne vakuole koje potiskuju jezgru na periferiju stanice, a intersticijski kolagen se nalazi ne samo u interlobularnim prostorima, već i unutar režnjića, u Disseovim prostorima i oko centralne vene (slika 4B).

U razvijenom obliku jetrene ciroze histološkom slikom dominira umnoženo fibrozno tkivo. Ono razdvaja čvoriće zdravog jetrenog parenhima (slika 4C). Ponegdje je arhitektura režnjića potpuno poremećena stvaranjem snopova kolagenog veziva prožetog upalnim mononuklearima. U tim područjima vide se umnoženi žučni kanalići koji dodatno narušavaju normalnu strukturu. Hepatociti su izmijenjeni te uz anizonukleozu i hiperkromaziju pokazuju vakuolizirane jezgre i citoplazme, uz razne ireverzibilne stadije (slika 4C).



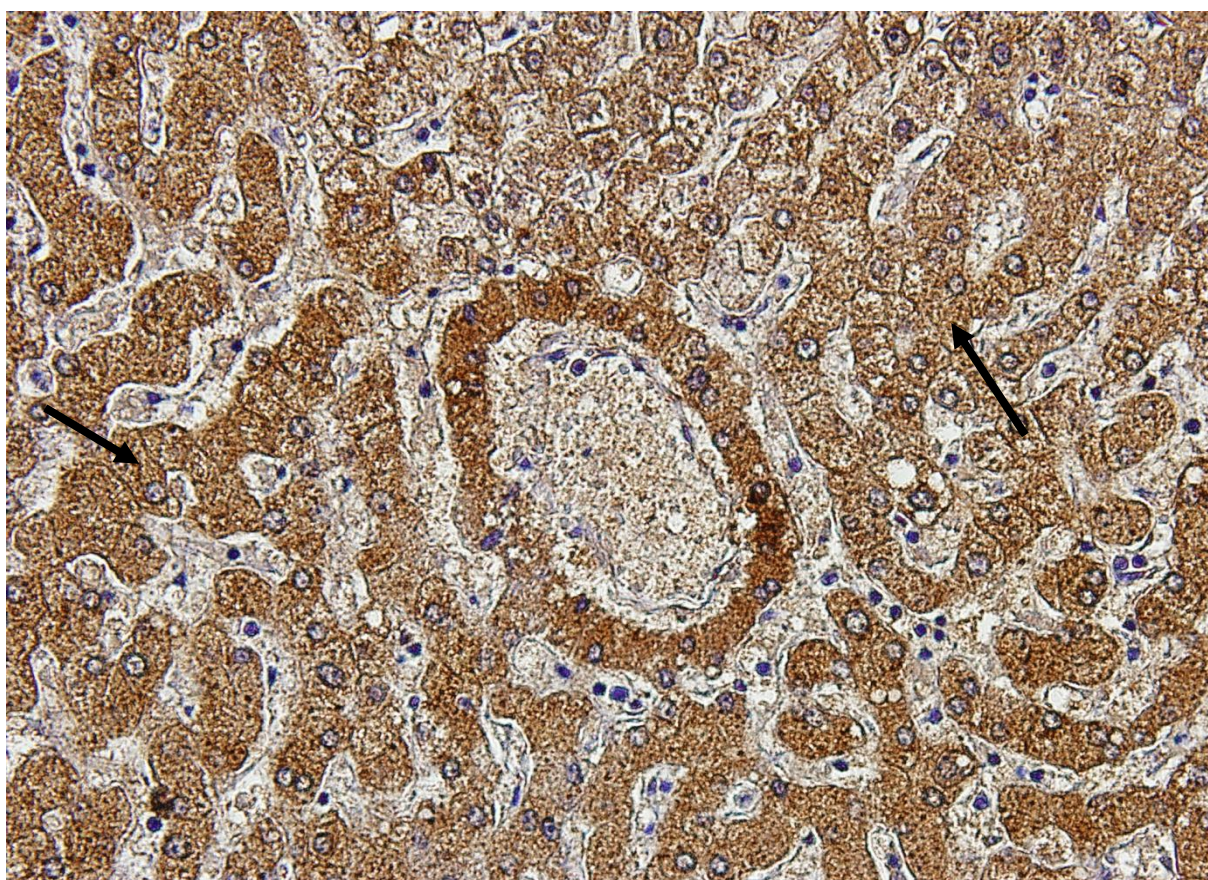
Slika 4. Mikrografije histoloških rezova jetre čovjeka obojanih hemalaun eozinom. (A) zdrava jetra; (B) početna ciroza; (C) nodularna ciroza. Izvorno povećanje x 100.

4.2. Rezultati imunohistokemijske analize

Imunohistokemijskom analizom utvrđena je prisutnost i lokalizacija BMP-9 i TGF- β 1 u tkivu jetre čovjeka.

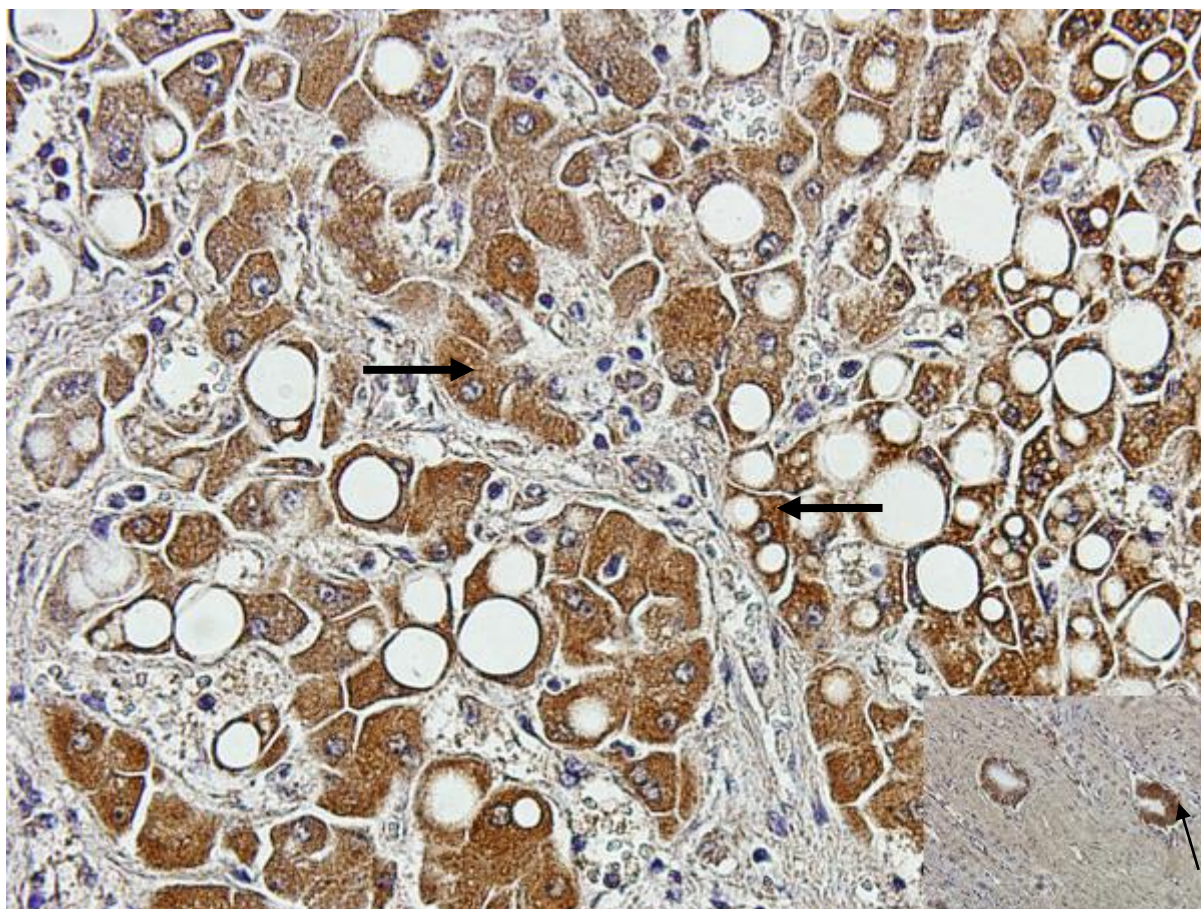
4.2.1. Ekspresija BMP-9 u jetri čovjeka

U tkivu zdrave jetre čovjeka BMP-9 je pozitivan u većini hepatocita. Uz hepatocite imunopozitivne su i epitelne stanice žučnih kanalića (slika 5).



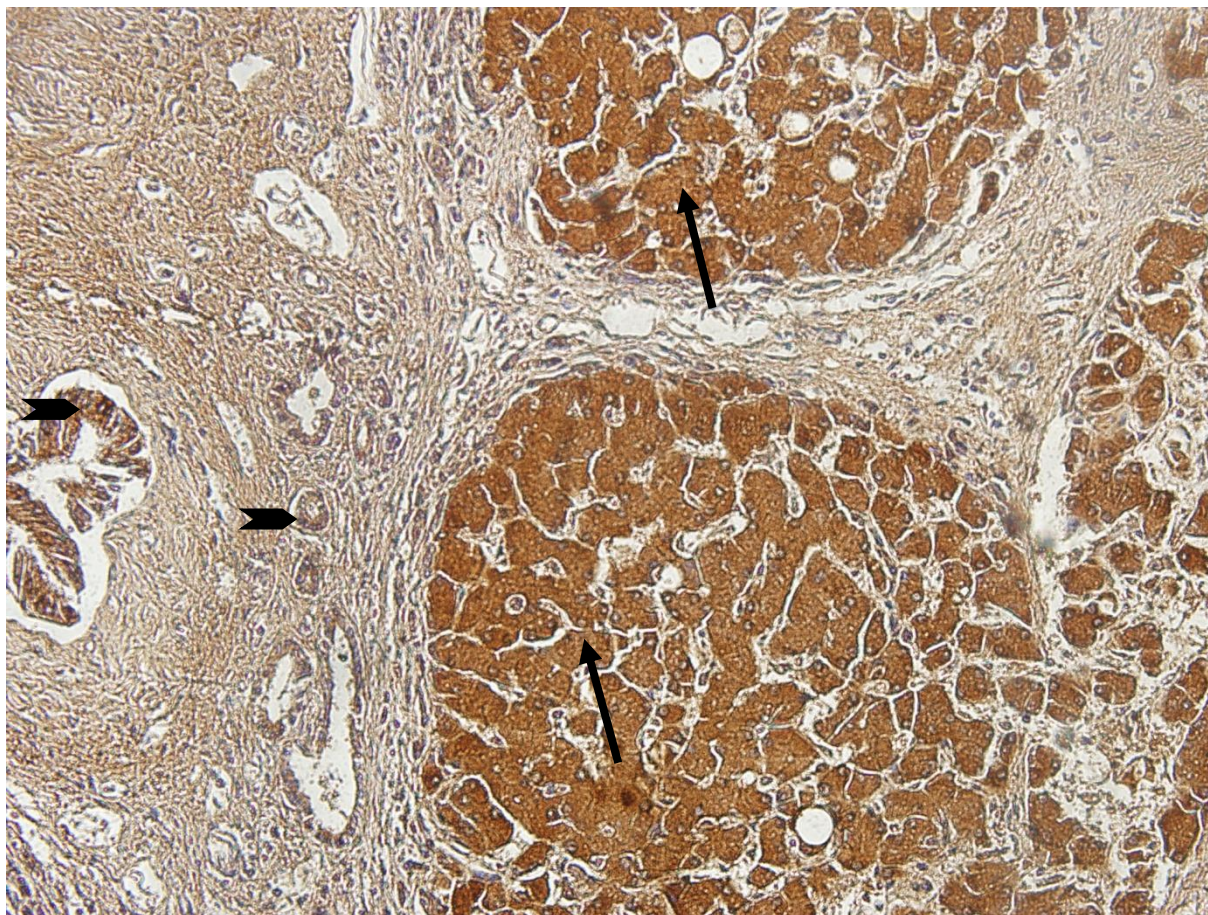
Slika 5. Ekspresija BMP-9 u zdravoj jetri čovjeka. Izvorno povećanje x 200. Pozitivna reakcija je smeđe obojenje u citoplazmi stanica. Strelice (\longrightarrow)pokazuju BMP-9 pozitivne hepatocite.

U tkivu jetre zahvaćene početnom cirozom, BMP-9 pozitivna reakcija je vidljiva u hepatocitima, nešto više na rubnim mjestima, prema perisinusoidalnim i periportalnim prostorima gdje počinje umnažanje kolagenih vlakana. Pozitivnu BMP-9 reakciju pokazuju i epitelne stanice žučnih kanalića te pokoja Kupferova stanica (Slika 6).



Slika 6. Ekspresija BMP-9 u početnoj cirozi jetre. Izvorno povećanje x 400. Pozitivna reakcija je smeđe obojenje u citoplazmi stanica. Strelice (—→) pokazuju BMP-9 pozitivne hepatocite.

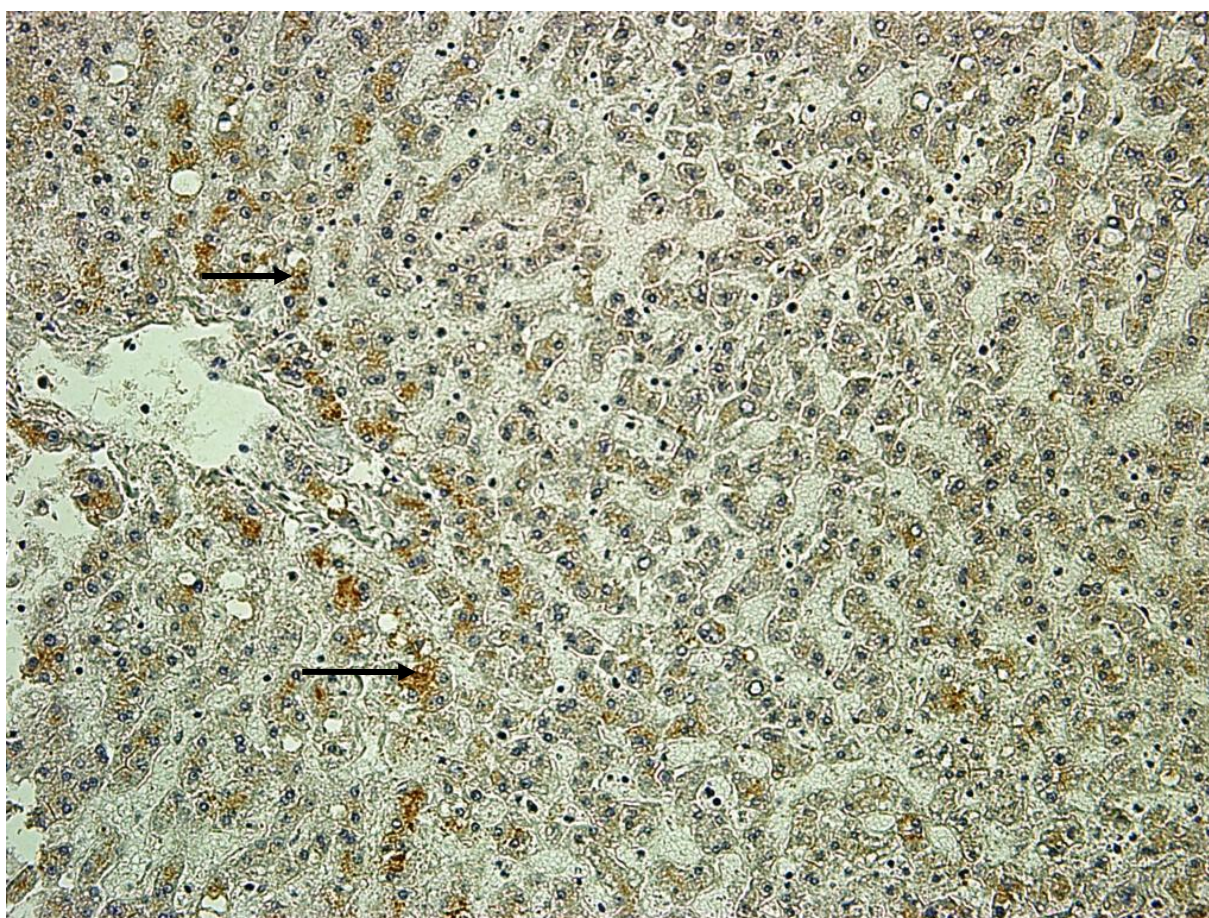
U tkivu jetre zahvaćene nodularnom cirozom vidljiva je izrazita BMP-9 pozitivna reakcija u regenerativnim čvorićima jetrenog parenhima te u epitelu žučnih kanalića (Slika 7).



Slika 7. Ekspresija BMP-9 u nodularnoj cirozi jetre. Izvorno povećanje x 100. Pozitivna reakcija je smeđe obojenje u citoplazmi stanica. Strelice (—→) pokazuju BMP-9 pozitivne hepatocite. Strelice (➤) pokazuju BMP-9 pozitivne epitelne stanice žučnih kanalića.

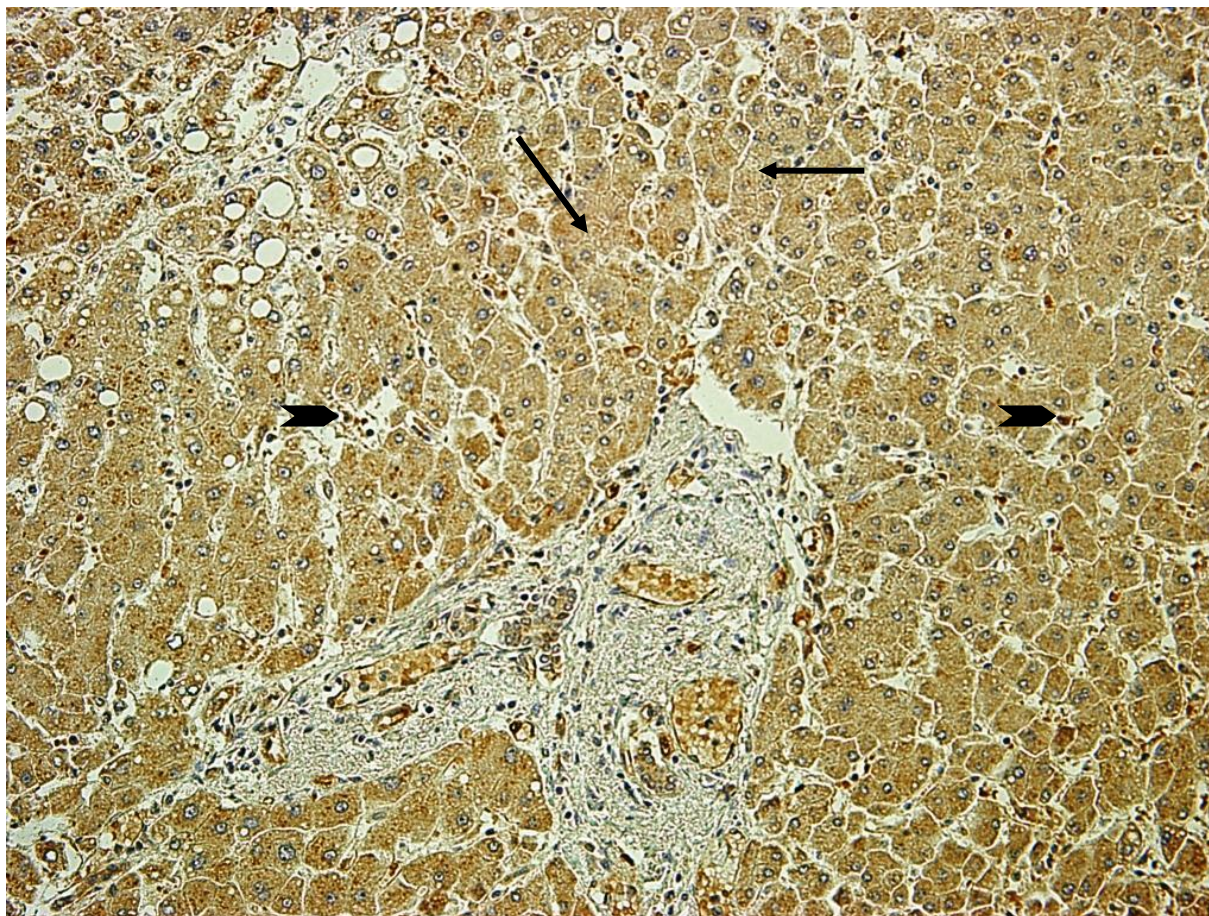
4.2.2. Ekspresija TGF- β 1 u jetri čovjeka

U tkivu zdrave jetre vidljiva je održana struktura hepatocita. TGF- β 1 pozitivna reakcija je prisutna u manjem broju hepatocita, uglavnom onih koji se nalaze oko v. centralis (Slika 8).



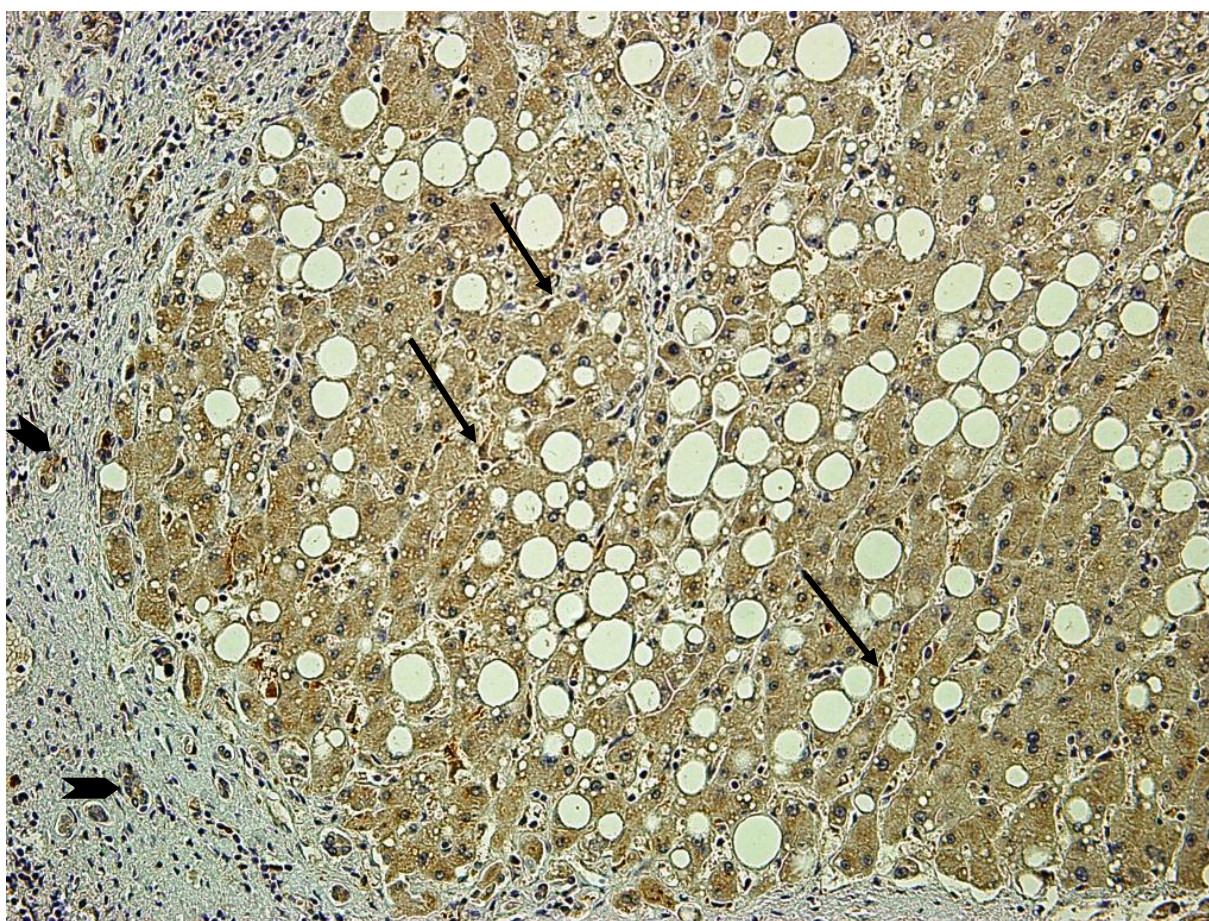
Slika 8. Ekspresija TGF- β 1 u zdravoj jetri čovjeka. Izvorno povećanje x 200. Pozitivna reakcija je smeđe obojenje u citoplazmi stanica. Strelice (\longrightarrow) pokazuju TGF- β 1 pozitivne hepatocite.

U tkivu jetre zahvaćene početnom cirozom ekspresija TGF- β 1 prisutna je u gotovo svim hepatocitima i u epitelnim stanicama žučnih kanalića, okruženih vezivnim tkivom koje se umnožava. U periportalnim i perisinusoidalnim prostorima su pozitivne Kupferove stanice (Slika 9).



Slika 9. Ekspresija TGF- β 1 u početnoj cirozi. Izvorno povećanje x 200. Pozitivna reakcija je smeđe obojenje u citoplazmi stanica. Strelice (—→) pokazuju TGF- β 1 pozitivne hepatocite. Strelice (▶) pokazuje TGF- β 1 pozitivne Kupferove stanice

U uznapredovaloj cirozi TGF- β 1 je eksprimiran u hepatocitima unutar čvorića zdravog parenhima jetre. Vezivne pregrade sadržavaju pokoji žučni kanalić pozitivnih epitelnih stanica. U perisinusoidalnim prostorima vidljive su brojne pozitivne Kupferove stanice (Slika 10).

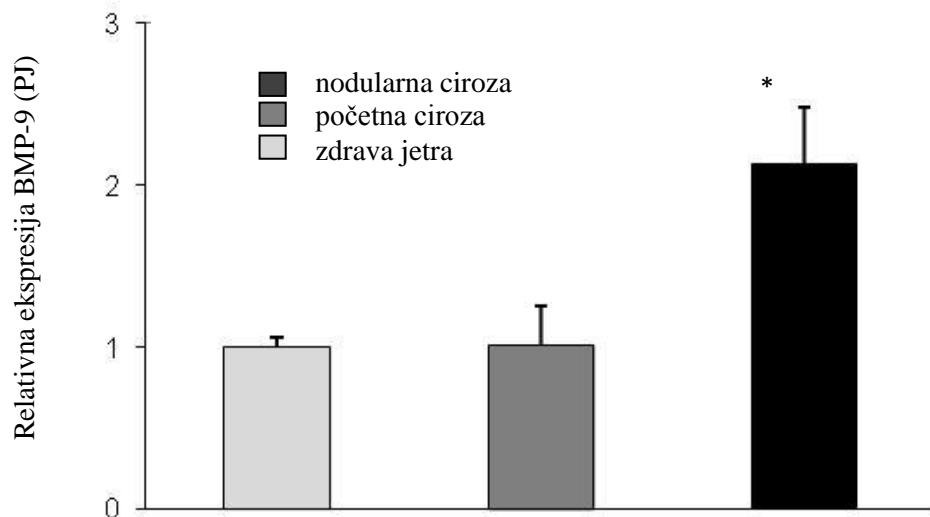
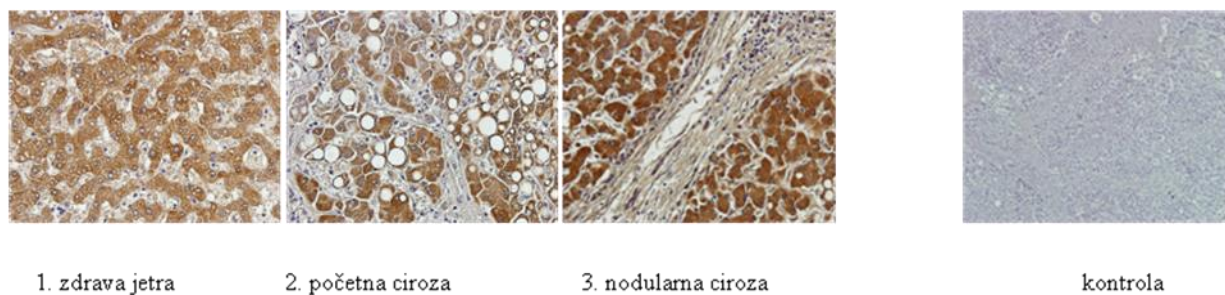


Slika 10. Ekspresija TGF- β 1 u nodularnoj cirozi. Izvorno povećanje x 200. Pozitivna reakcija je smeđe obojenje u citoplazmi stanica. Strelice (→) pokazuju TGF- β 1 pozitivne Kupferove stanice. Strelica (➤) pokazuje TGF- β 1 pozitivne epitelne stanice žučnih kanalića.

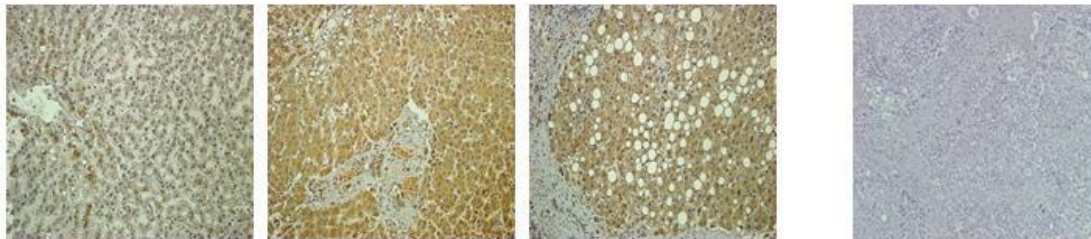
4.2.3. Kvantitativna analiza ekspresije BMP-9 i TGF- β 1

S programom Image J uspoređen je intenzitet obojenja BMP-9 ekspresije u zdravoj jetri, početnoj cirozi i nodularnoj cirozi, u odnosu na negativnu kontrolu. Utvrđena je statistički značajna razlika između nodularne ciroze i početne ciroze ($P < 0,05$) te između nodularne ciroze i zdrave jetre ($P < 0,05$). Najjači intenzitet imunohistokemijskog obojenja utvrđen je u nodularnoj cirozi, dočim početna ciroza i zdrava jetra pokazuju podjednak intenzitet ekspresije BMP-9 (Slika 11).

Kvantitativnom analizom intenziteta obojenja TGF- β 1 ekspresije, utvrđena je statistički značajna razlika između nodularne ciroze i zdrave jetre ($P < 0,05$) te između početne ciroze i zdrave jetre ($P < 0,05$). Najjači intenzitet imunohistokemijskog obojenja utvrđen je u nodularnoj cirozi, što je podjednako intenzitetu obojenja u početnoj cirozi. Zdrava jetra pokazuje najslabiji intenzitet TGF- β 1 ekspresije (Slika 12).



Slika 11. Slika pokazuje razlike u intenzitetu obojenja imunohistokemijske reakcije anti-BMP-9 protutijelima u zdravoj jetri, početnoj cirozi i nodularnoj cirozi u odnosu na negativnu kontrolu. * $P < 0,05$; statistički značajna razlika između nodularne ciroze i početne ciroze te između nodularne ciroze i zdrave jetre.

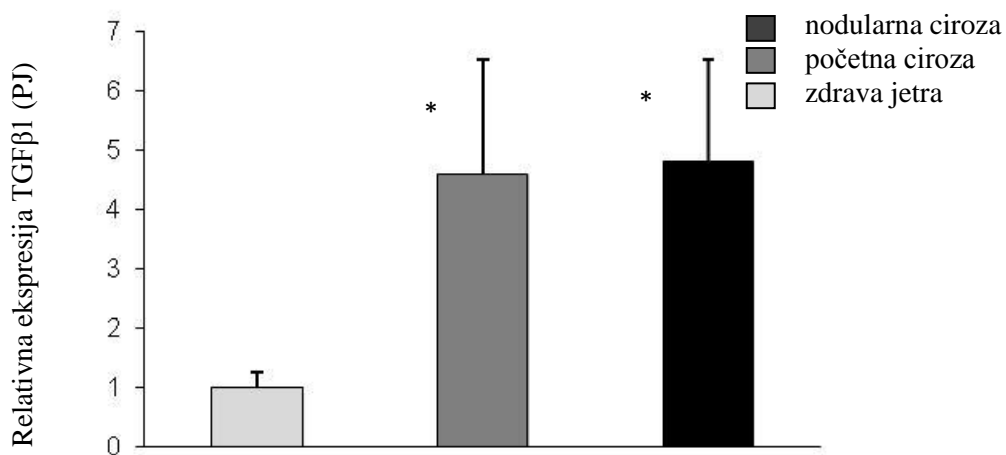


1. zdrava jetra

2. početna ciroza

3. nodularna ciroza

kontrola



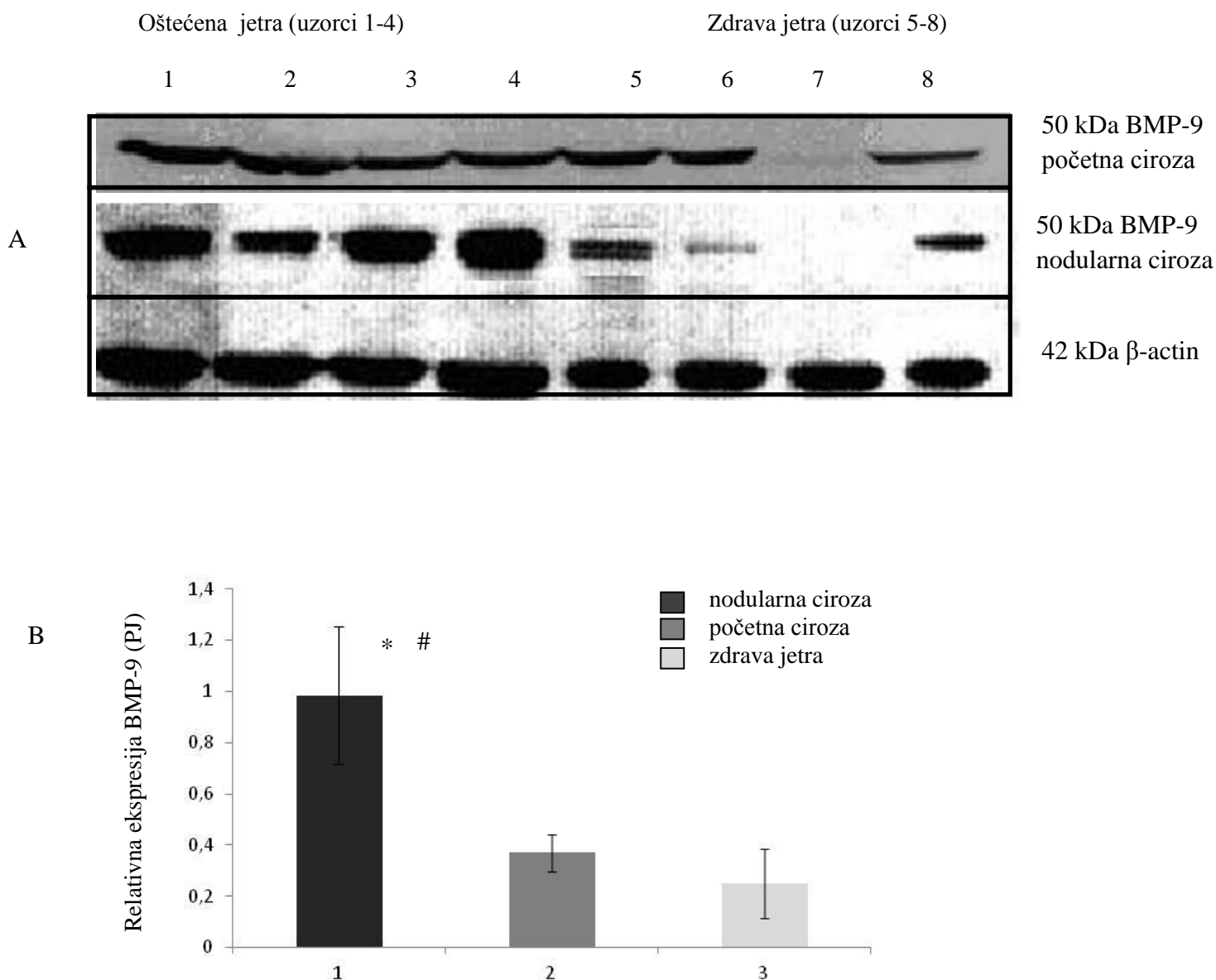
Slika 12. Slika pokazuje razlike u intenzitetu obojenja imunohistokemijske reakcije anti-TGF- β 1 protutijelima u zdravoj jetri, početnoj cirozi i nodularnoj cirozi u odnosu na negativnu kontrolu. * $P < 0,05$; statistički značajna razlika između nodularne ciroze i zdrave jetre te između početne ciroze i zdrave jetre.

4.3. Western blot analiza

Ovim smo istraživanjem Western blot metodom analizirali razinu ekspresiju BMP-9 i TGF- β 1 u odnosu na β -actin u cirozom promijenjenoj i zdravoj jetri čovjeka. Koristili smo homogenat tkiva humane jetre s održanom citoplazmatskom funkcijom koju smo postigli procesuiranjem svježeg tkiva. Imunoreaktivni protein je vizualiziran na membrani dodavanjem kemiluminiscentnog reagensa. Intenzitet signala proteinskog produkta kvantificiran je pomoću denzitometra.

4.3.1. Razina ekspresije BMP-9 i TGF- β 1 u jetri čovjeka

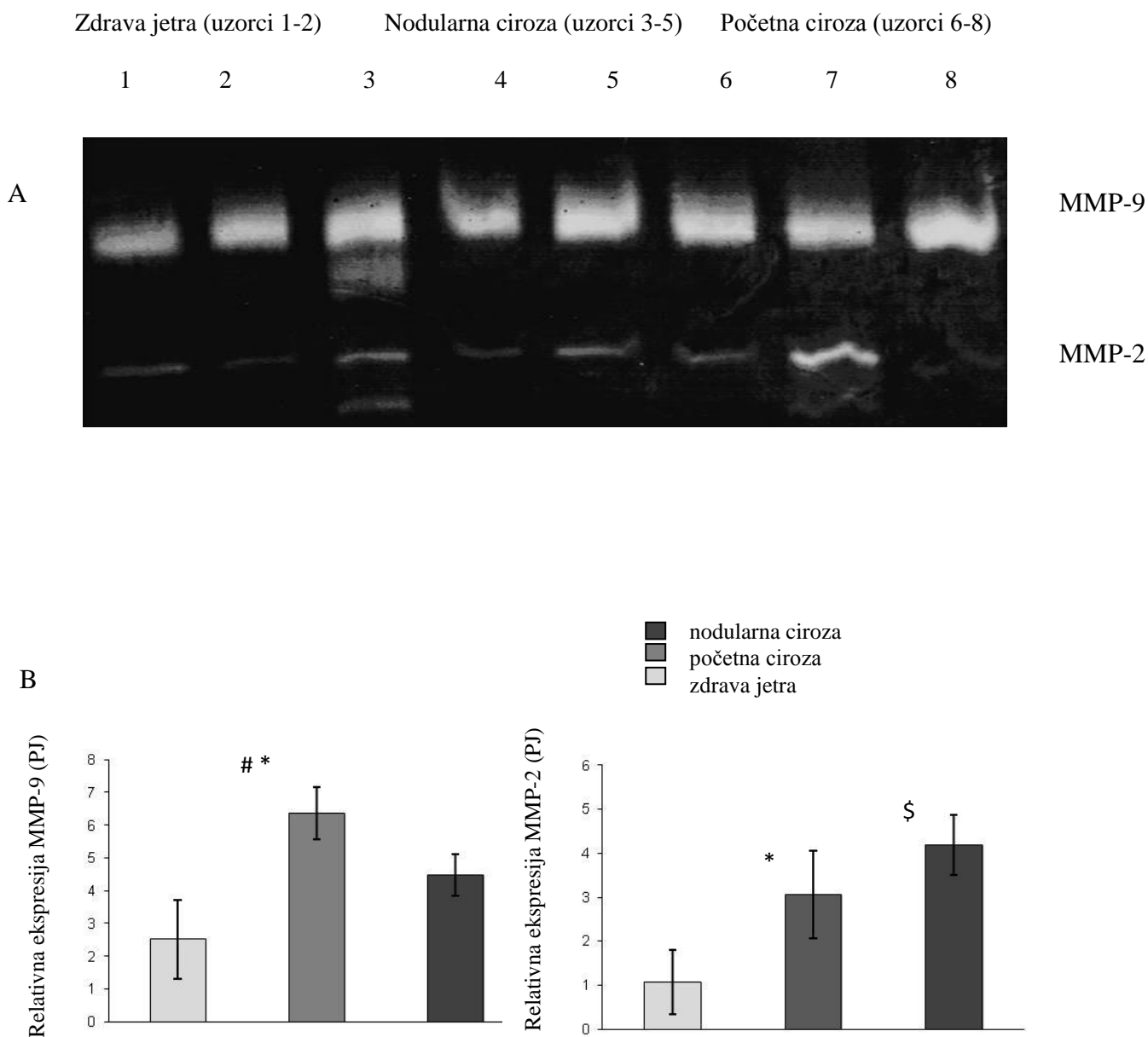
Najveću razinu ekspresije BMP-9 pokazuje nodularna ciroza, što je statistički značajno različito od početne ciroze ($P < 0,05$) i zdrave jetre ($P < 0,01$) (slika 13). Slično ekspresiji BMP-9 u humanoj jetri i TGF- β 1 pokazuje najveću razinu ekspresije u uzorcima nodularne ciroze što je statistički značajno različito u odnosu na zdravu jetru ($P < 0,01$). Zdrava jetra ima statistički značajno manju razinu ekspresije TGF- β 1 u odnosu na početnu cirozu ($P < 0,05$) (Slika 14).



Slika 13. Prikazani su reprezentativni uzorci blotova s ekspresijom BMP-9 i β -actina u nodularnoj cirozi, početnoj cirozi i zdravoj jetri (A). Razina ekspresije BMP-9 predstavlja relativnu ekspresiju u odnosu na β -actin. Densitometrijska analiza blotova prikazana je kao srednja vrijednost proizvoljne jedinice (PJ) \pm SD (N=8) (B). *P<0,01; statistički značajna razlika između nodularne ciroze i zdrave jetre. #P<0,05; statistički značajna razlika između nodularne ciroze i početne ciroze.

4.4. Zimografija

Matriks-metaloproteinaza-9 (MMP-9) ima najveću relativnu ekspresiju u uzorcima jetre zahvaćene početnom cirozom, što je statistički značajno različito u odnosu na nodularnu cirozu i zdravu jetru ($P < 0,05$) (Slika 15). Matriks-metaloproteinaza-2 (MMP-2) međutim, pokazuje najveću relativnu ekspresiju u uzorcima jetre s nodularnom cirozom, što je statistički značajno različito u odnosu na zdravu jetru ($P < 0,05$). Kako je relativna ekspresija MMP-2 podjednaka u uzorcima nodularne ciroze i uzorcima početne ciroze, tako je i ekspresija MMP-2 u početnoj cirozi također statistički značajno veća u odnosu na zdravu jetru ($P < 0,05$) (Slika 15).



Slika 15. Prikazani su reprezentativni uzorci zimograma MMP-9 i MMP-2 u nodularnoj cirozi, početnoj cirozi i u zdravoj jetri (A). Densitometrijska analiza zimograma prikazana je kao srednja vrijednost proizvoljne jedinice (PJ) \pm SD (N=8) *P<0,05; statistički značajna razlika između početne ciroze i zdrave jetre. #P<0,05; statistički značajna razlika između početne ciroze i nodularne ciroze. \$P<0,05; statistički značajna razlika između nodularne ciroze i zdrave jetre.

5. RASPRAVA

Ovim istraživanjem smo utvrdili da su BMP-9 i TGF- β 1 eksprimirani u uzorcima zdrave jetre, kao i u uzorcima početne i nodularne ciroze.

Kad govorimo o ekspresiji i lokalizaciji BMP-9 i TGF- β 1, našli smo ih u hepatocitima i u epitelu žučnih kanalića zdrave jetre te u: hepatocitima, epitelu žučnih kanalića i Kupferovim stanicama različitim stupnjem ciroze zahvaćene jetre čovjeka. Kvantificiran je i uspoređen intenzitet obojenja imunohistokemijske reakcije s anti-BMP-9 protutijelima i anti-TGF- β 1 protutijelima u zdravoj jetri, početnoj cirozi i nodularnoj cirozi. Najjači intenzitet BMP-9 ekspresije utvrđen je u nodularnoj cirozi, dočim početna ciroza i zdrava jetra pokazuju podjednak intenzitet obojenja imunohistokemijske reakcije (Slika 11). Najjači intenzitet TGF- β 1 ekspresije utvrđen je u nodularnoj cirozi, što je podjednako intenzitetu obojenja imunohistokemijske reakcije u početnoj cirozi. Zdrava jetra pokazuje najslabiji intenzitet ekspresije TGF- β 1 (Slika 12). Western blot analiza potvrđuje nalaz imunohistokemije, tako da je najveća razina ekspresije BMP-9 i TGF- β 1 utvrđena i ovdje u nodularnoj cirozi (Slika 13 i 14). Zimografijom gelatinaza utvrđena je najveća relativna ekspresija MMP-9 u početnoj cirozi, a MMP-2 u nodularnoj cirozi (Slika 15).

5.1. Proupalni i reparacijski citokini u cirozi jetre

Jetru, kao organ koji smo promatrali u našem istraživanju, izabrali smo zbog uloge u metabolizmu te uloge u djelovanju inzulina i drugih hormona. Iz istih razloga proučavali smo i BMP-9. On naime djeluje općenito na metabolizam stanica, a zbog povezanosti s jetrom predložen je kao hipotetička tvar iz jetre odgovorana za osjetljivost na inzulin (eng. hepatic insulin sensitizing substance, HISS) (107, 108) hipoteza koju su 2008. podržali i Caperuto i sur. (109).

Citokini su proteini male molekulske mase, proizvedeni iz mnogih stanica u fiziološkim i patološkim stanjima. Oni se vežu za specifične receptore na staničnoj membrani gdje izazivaju kaskadu unutarstaničnih reakcija koje mogu mijenjati određene funkcije specifične za stanicu, poput: obrane, pokretanja, adhezije i apoptoze. Citokini su najprije opisani kao imunomodulirajuće molekule, a i danas je obrana domaćina jedna od njihovih najzapaženijih funkcija. Mnogi citokini imaju plejotropne funkcije koje omogućuju čak i izazivanje antagonističkih učinaka jednog te istog citokina. Jetra slijedi pravila djelovanja citokina pružajući dom stanicama koje su vrlo osjetljive na djelovanje citokina.

Hepatociti nose receptore za razne citokine. Štoviše, receptori za čimbenike rasta i diferencijacije, kao što su BMPs, mogu kontrolirati proliferaciju hepatocita tijekom embriogeneze ili gubitka hepatocita nakon akutne ozljede jetre. Djelovanje različitih citokina na mehanizme jetrene regeneracije do sada je ispitivano u mnogim studijama (61, 85, 110, 111), no specifični učinak BMP-9 kao hepatoregenerativne molekule još uvijek nije istražen. BMP-9 je u velikoj količini eksprimiran u fetalnoj jetri gdje ga produciraju zvjezdolike stanice jetre (HSCs), Kupferove stanice (KCs) i endotelne stanice te dovodi do proliferacije hepatocita (39, 112). Utjecaj na hepatocite BMP-9 ostvaruje putem ALK-1 receptora izazivajući jaku ekspresiju gena uključenih u proliferaciju hepatocita (72).

Sliku o jetri kao organu čiju funkciju uvelike nadziru citokini, upotpunjuju neparenhimske stanice. Za Kupfferove stanice, rezidencijalne makrofage, se zna da sintetiziraju proinflammatorne citokine. Otpušteni citokini mogu stimulirati hepatocite i druge neparenhimske stanice. Endotelne stanice jetrenih sinusoida mete su na kojima proinflammatorni citokini mogu potaknuti ekspresiju molekula adhezije stanica i potaknuti vlastitu proizvodnju. U fibrozi jetre, neparenhimske stanice su važni izvori TGF- β 1, ili ključni parakrino/autokrini posrednik povećanog taloženja proteina izvanstanične tvari. Mjestom koje citokini zauzimaju tijekom rane embriogeneze jetre podsjećaju na patofiziološke procese koji obilježavaju akutna oštećenja jetre i njenu regeneraciju.

Diferencijacija jetrenog endoderma može ovisiti i o faktorima koji su inače uključeni u angiogenezu, a njihova važnost u cirozi jetre podudarna je s ulogom u cijeljenju rane. Takvi su, primjerice, čimbenik rasta fibroblasta -1 (FGF-1) i -2 (FGF-2) (113), a proliferacija hepatoblasta znatno ovisi i o čimbeniku rasta hepatocita (HGF) (114). Daljnja diferencijacija hepatocita vjerojatno će ovisiti o aktivnosti drugih citokina. Ovi podatci sugeriraju da su molekularni događaji tijekom embrionalnog razvoja jetre slični patofiziologiji odrasle jetre.

Regeneracija jetre je svojstvo razvijeno tijekom evolucije. Za razliku od drugih organa, jetra ima jedinstvenu sposobnost vratiti izvornu masu (npr. nakon djelomične hepatektomije ili akutne toksične ozljede) u razmjerno kratkom vremenu (85). Obnova jetre nakon djelomične hepatektomije (PH), postiže se mobiliziranjem svih zrelih staničnih populacija koje su prisutne u intaktnoj jetri (61). Proliferacija hepatocita najprije se događa periportalno – na hepatocitima koji su najbliže pritokama portalne vene. Unutar idućih 36-48 sati zahvaća pericentralno područje. Stanice drugih populacija unutar jetre kasne za hepatocitima, prosječno 24 sata kad je u pitanju početak intenzivne sinteze DNA. Dinamika kojom druge stanične populacije slijede hepatocite i način na koji faktori rasta koje luče hepatociti utječu na proliferaciju hepatocita daju naslutiti kako hepatociti djeluju kao mitogeni

poticaj za proliferaciju drugih populacija. Tijekom prva tri dana nakon PH-e, hepatociti intenzivno proliferiraju, pa četvrtog dana nakon zahvata tvore nakupine smještene oko kapilara.

Na razdoblje između PH-e i početka ubrzane sinteze DNA u ostatku jetre utječe niz čimbenika (85), a vrhunac sinteze DNA primijećen je 20-22 sata nakon PH-e. Nakon 3 do 4 tjedna, uvelike je dostignuta prvobitna veličina, funkcija i struktura jetre, a 6 mjeseci nakon PH-e, regeneracija jetre se smatra općenito dovršenom, uz neznatna odstupanja od prvobitne veličine (5 do 10%). Djelovanje različitih citokina na mehanizme jetrene regeneracije do sada je ispitivano u mnogim studijama (61, 85, 110) i vjerojatno citokini upravljaju pomicanjem hepatocita među funkcionalnim zonama. Hepatociti nastali periportalno (zona I), na mjestima najintenzivnijeg stvaranja veziva, premještau se duž sinusoide prema centralnoj veni (56). Iako brzinom od svega 0,32% promjera lobulusa, dokazana je njihova pomičnosti među funkcionalnim zonama (87, 115) premda postoji stanovito, argumentima potkrijepljeno, neslaganje (88).

Usprkos očekivanjima, specifični učinak BMP-9 kao hepatoregenerativne molekule još uvijek nije istražen. Cvijanović i sur. su 2008. objavili nalaze ekspresije BMP-9 u u hepatocitima i epitelnim stanicama žučnih kanalića jetre čovjeka i u jetri štakora (54, 55). BMP-9 je u velikoj količini eksprimiran u fetalnoj jetri gdje ga produciraju HSCs, KCs i endotelne stanice (39). Osim izražaja u jetri štakora, anti-BMP-9 protutijela pokazala su svojstvo vezanja za stanice ljudskog hepatoma te mišje hepatocite (29, 54). Od humoralnih čimbenika aktivnih u regeneraciji jetre, čimbenik rasta hepatocita (HGF), najjači je stimulator umnažanja DNA (61). HGF je plejotropni citokin s jakim stimulacijskim efektom za sintezu DNA hepatocita. In vitro ima morfogene (116) i mitogene učinke (117), a pokazalo se da u eksperimentalnoj cirozi djeluje antifibrotički (118).

Njegovo djelovanje na sintezu DNA hepatocita još je izraženije udruženo s čimbenikom nekroze tumora – α (TNF- α) (111, 119, 120). Upravo inhibicija regeneracije jetre primjenom anti-TNF- α protutijela govori o važnosti TNF- α u poticanju hepatocita na proliferaciju (121). U eksperimentalnim uvjetima i inzulin je potvrđen kao sredstvo koje potiče proliferaciju hepatocita (39). Ta je uloga inzulina potvrđena i time što, kod pacijenata s porto-kavalnim „shuntom“, jetra isključena iz cirkulacije krvi u kojoj ima inzulina, postupno atrofira.

Kod ozljeda stečenih tijekom života, u pravilu, mirujući zreli hepatociti ponovno ulaze u stanični ciklus s ciljem regeneracije (61, 110). Međutim, u slučaju teže ili kronične ozljede, ili kada zreli hepatociti nemaju više kapaciteta za regeneraciju iz bilo kojeg razloga, aktivira se druga vrsta mirujućih stanica, koje se mogu diferencirati bilo u hepatocite bilo u kolangiocyte. Stoga je regeneracija jetre i dalje moguća (62).

Misli se kako citokini igraju ključnu ulogu u početnoj fazi proliferacije hepatocita. Iako je za mnoge citokine dokazano da stimuliraju sintezu DNA hepatocita in vitro, njihova točna uloga in vivo ostaje nerazjašnjena (61, 85).

Što se tiče jetre, TGF- β 1 se pripisuju ključne uloge u regeneraciji zbog inhibitornih učinaka koje ima na proliferaciju hepatocita i nadzorom nad pro-fibrotičnom aktivnošću jetrenih zvjezdolikih stanica (HSCs). TGF- β 1 i njegova signalizacija preko Smad3 molekule, glavni je poticaj sinteze kolagena i on je vjerojatno najjači profibrotički citokin prisutan u jetri (122, 123). Ovo podsjeća na svojstva koja nastaju interakcijom TGF- β i BMP-7, a opažena su u pacijenata na peritonealnoj dijalizi, koji razviju peritonealnu fibrozu (124).

Citokini čija je povezanost s jetrom manje razjašnjena su i monocitni kemotaktični protein tip 1 (MCP-1) (125) i RANTES (eng. regulated on activation, normal T cell

expressed and secreted) (126). Oni stimuliraju, a IL-10 i interferon- γ (IFN)- γ inhibiraju fibrogenezu (127, 128).

I brojni receptori za čimbenike rasta, kao što su inzulinu sličan čimbenik rasta I (IGF-I), inzulinu sličan čimbenik rasta II (IGF-II), epidermalni čimbenik rasta (EGF) i preobražavajući čimbenik rasta alfa (TGF- α) mogu kontrolirati proliferaciju hepatocita tijekom embriogeneze ili gubitak hepatocita nakon akutne ozljede jetre (61).

U novije vrijeme uočeno je da vrlo veliku ulogu u procesu fibrogenezu u jetri ima čimbenik rasta vezivnog tkiva (eng. connective tissue growth factor, CTGF), koji pojačava djelovanje TGF- β 1, modulirajući intracelularni prijenos signala s njegovog receptora (129). Ovakav scenarij, posredno, preko TGF- β 1 odvija se u hepatocitima, međutim u zvjezdolikim stanicama jetre opisan je i izravni, TGF- β 1 neovisni način djelovanja CTGF-a.

Angiogeni faktori poput čimbenika rasta endotela krvnih žila (eng. vascular endothelial growth factor, VEGF) imaju ulogu u neoangiogenezi i razvoju fibroze. Putem svojih receptora VEGF stimulira proliferaciju, migraciju i produkciju kolagena u HSCs (130).

I neke vazoaktivne tvari također imaju utjecaja na fibrogenezu. Vazodilatatori (dušični oksid, relaksin, prostaglandin E2, adrenomedulin, atrijski natriuretski peptid) imaju antifibrozo djelovanje, dok vazokonstriktori (noradrenalin, angiotenzin II i endotelin-1) stimuliraju fibrogenezu (131). Angiotenzin II je jedan od najpotentnijih medijatora u procesu fibrogenezu, koji u tkivima potiče sintezu TGF- β 1 i na taj način ostvaruje svoje fibrogeno djelovanje. Angiotenzinogen je jedina komponenta ovog sustava koja se stvara u zdravoj jetri i to u hepatocitima (132, 133). Angiotenzin II se veže za angiotenzin II receptor tip 1 (AT-1) na miofibroblastima potičući ih na lučenje kemotaksijskih signala, sintezu izvanstanočnog matriksa (ECM) i inhibiciju razgradnje kolagena. Potičući kontraktilnost miofibroblasta koji se nalaze u sinusoidama i unutar ECM-a, angiotenzin II povećava otpor struji krvi pogoršavajući portalnu hipertenziju, te dovodi do skvrčavanja veziva. Ovi učinci antagoniziraju se djelovanjem

na angiotenzin II receptor tip 2 (AT-2). Brojne eksperimentalne studije pokazale su da je moguće učinkovito zaustaviti napredovanje fibroze inhibicijom stvaranja angiotenzina II ili blokadom AT-1 receptora (134).

Endogeni i egzogeni kanabinoidi također imaju utjecaja na proces fibrogeneze, djelujući putem svojih receptora CB-1 i CB-2 (135, 136). Aktivacija CB-1 receptora na HSCs stimulira fibrogenezu, dok je CB-2 antagonizira.

Općenito govoreći, možemo konstatirati kako brojni citokini imaju značajnu ulogu u moduliranju tkivnog odgovora na svako štetno zbivanje, pa i na ono vezano uz jetru. Ovamo ubrajamo razne kemokine, interleukine, interferone, faktore rasta, angiogene faktore, vazoaktivne substance, topljive receptore i proteaze.

5.2. Ekspresija BMP-9 i TGF- β 1 u jetri čovjeka

U tkivu zdrave jetre čovjeka BMP-9 je pozitivan u većini hepatocita. Osim toga intenzivnija pozitivna reakcija vidljiva je u epitelnim stanicama žučnih kanalića (Slika 5). Sličnu lokalizaciju ekspresije BMP-9 pokazuje i cirozom promijenjena jetra, s time da je u početnoj cirozi rijetko pozitivne i Kupferove stanice (Slika 6). Analizom intenziteta obojenja imunohistokemijske reakcije, utvrđen je najjači intenzitet BMP-9 ekspresije u nodularnoj cirozi, dočim početna ciroza i zdrava jetra pokazuju podjednak intenzitet obojenja imunohistokemijske reakcije (Slika 11).

Bidartova je, ispitujući izraženost mRNA za BMP-9 u raznim tkivima, našla ekspresiju jetri, i to nekoliko stotina puta jaču u hepatocitima nego u Kupferovim stanicama i endotelu sinusoida (137). Mi smo, u jetri zahvaćenoj nodularnom cirozom našli izrazitu ekspresiju BMP-9 u regeneracijskim čvorićima (Slika 7), a u početnoj cirozi, anti-BMP-9 antitijela su se nešto jače vezala za hepatocitima smještene uz perisinusoidalne i periportalne prostore, na mjestima gdje se događa najintenzivnije umnažanje kolagenih vlakana (iz I zone po Gebhardtu) (56).

BMP-9 definitivno nije jedini BMP povezan s jetrom (138). Ostali članovi BMPs unutar nadobitelji TGF- β čija je aktivnost dokazana u jetri su BMP-2,-4, -6 i -7. Kawasaki i sur. (139). i Tsai i sur. (140) uspješno su povezali ekspresiju molekule BMP-2 s ozljedom tkiva i ranom reparacijom jetre, pluća i bubrega. Molekula BMP-2 izražena je u odrasloj zdravoj jetri i negativno utječe na proliferaciju hepatocita. Na štakorskom modelu njegova ekspresija se vidno smanjenjuje nakon PH prema čemu je zaključeno kako je takva supresija bitna radi osiguranja normalne proliferacije hepatocita (63).

BMP4 i BMP-7 tijekom embrionalnog razvoja reguliraju proliferaciju i diferencijaciju jetrenog pupoljka dovodeći do potpune diferencijacije hepatocita (64-66). Ekspresija BMP-4

pojačava se u jetri štakora nakon podvezivanja zajedničkog žučovoda, te dovodi do aktivacije HSCs, na temelju čega je zaključeno da bi on mogao posredovati u razvoju jetrene fibroze kod ovog tipa jetrenog oštećenja (67). Osim u razvoju fibroze, BMP-4 i transdukcijski put koji uključuje Smad-5 od presudne su važnosti u patološkoj ekstramedularnoj eritropoezi koja se odvija u jetri odraslog čovjeka (141). BMP-7 nastaje u kostima i bubrezima (142). U mišjoj jetri ga nema, ili se stvara u vrlo maloj količini, ali postoje njegovi receptori na hepatocitima (65, 69). BMP-7 smanjuje progresiju fibroze u miševa intoksiciranih s ugljikovim tetrakloridom (CCl₄) i onemogućava epitelno-mezenhimalnu tranziciju hepatocita. On ubrzava regeneraciju jetre nakon djelomične hepatektomije u miševa, a regeneracija je bitno otežana nakon primjene anti-BMP-7 protutijela (65). Što se BMP-6 tiče, ekspresija je nađena u štakorskoj jetri gdje ga produciraju HSCs i KCs (143). Knittel i sur. dalje zaključuju kako BMP-6, ukoliko je prisutan u suvišku, potiče fibrozu tkiva i neoangiogenezu. U kulturi HSCs uočena je njegova povećana ekspresija na poticaj TGF- β 1, te je zaključeno da bi BMP-6 mogao imati ulogu u regeneraciji jetre (68). I premda je utvrđeno kako TGF- β 1 potiče ekspresiju BMP-6, dokumentirano je smanjenje ekspresije BMP-6 pod utjecajem interferona- γ , klasičnog citokina s protuupalnim djelovanjem. Uloga BMP-6 posebno je istražena u hemokromatozi (144).

Iz svega navedenog može se zaključiti da članovi obitelji BMP imaju značajnu ulogu u razvoju i regeneraciji jetre te kao posrednici u razvoju i inhibiciji procesa fibrogeneze. U tom kontestu Song i sur. dokazali su da BMP-9 uzrokuje proliferaciju humanih hepatoma stanica u kulturi te potiče proliferaciju mišjih hepatocita (39).

Među brojnim i raznolikim ulogama u čovjeka, BMP-9 ima važno mjesto u hondrogenezi, osteogenezi, hepatogenezi te kolinergijskom usmjeravanju neurona ventralnog telencefalona tijekom embrionalnog razvoja. Upravo ga je njegovo hipoglikemijsko svojstvo dovelo prvi put u vezu s jetrom. Temeljem tog svojstva predložen je kao hipotetička tvar iz

jetre odgovorana za osjetljivost na inzulin (HISS) (107-109). Njegova sličnost s inzulinom potvrđena je kasnije, kada su Chen i sur. korištenjem kombinacije algoritama i bioinformatičkih testova u sklopu programa funkcionalne genomike identificirali polipeptide izlučene iz jetre dijabetičnih štakora za koje se predviđa mjesto u terapiji dijabetesa (33). Potonji su istraživači utvrdili kako inzulin i BMP-9 imaju sličan učinak na netabolizam glukoze, uz iznimku što inzulin neusporedivo jače inhibira glukoneogenezu. Osim učinka na homeostazu glukoze, Chen i sur. su utvrdili kako BMP-9 ima učinak i na metabolizam lipida (33). BMP-9 inhibira glukoneogenezu i mijenja izražaj ključnih enzima metabolizma lipida - maličnog enzima (ME) i enzima sintetaze masnih kiselina (FAS). Pravi fiziološki učinak BMP-9 u jetri čovjeka zapravo radom Chena i sur. nije razjašnjen. Prema hipotezi o HISS-u, povećanje sinteze inzulina trebalo bi rezultirati oslobađanjem HISS-a pod kontrolom parasimpatikusa. Premda je BMP-9 lociran u kolinergičnim neuronima (19, 20) te u jetri (137), nema sigurnih dokaza da je upravo on HISS (107, 109).

Naveli smo dosadašnje spoznaje koje ukazuju da BMP-9 sintetiziraju hepatociti (137) te da ovaj morfogen potiče njihovu proliferaciju (39). Slično kao i inzulin, moguće je da BMP-9 ima regenerativnu ulogu u jetri. U našem istraživanju analizirana je ekspresija BMP-9 u jetri čovjeka, temeljem pozitivnog imunohistokemijskog nalaza dobivenog na jetri štakora (54) te u stanicama humanog hepatoma (28), kao i najnovijih spoznaja o tome da se BMP-9 nalazi u cirkulaciji (145, 146).

Nakamura i sur. su još 1985. ustanovili kako je TGF- β 1 snažan inhibitor replikacije DNA hepatocita u kulturi (147). U prilog plejotropnosti ovog citokina idu i dokazana mu imunosupresivna svojstva, svojstvo stimulacije odlaganja izvanstaničnog matriksa, koči rast epitelnih i endotelnih stanica te eritrocitopoezu, zaustavljajući prijelaz iz G1 u S fazu mitoze. Garcia-Lazaro i sur. su 2002. pokazali da visoke razine serumskog ili tkivnog TGF- β 1 odgađaju regeneraciju jetre (148). Prema De Bleser i sur., upravo je TGF- β 1 najzastupljenija od triju izoformi ovog proteina u jetri (17). Našim smo rezultatima utvrdili najjači intenzitet obojenja TGF- β 1 ekspresije u nodularnoj cirozi, što je podjednako intenzitetu obojenja imunohistokemijske reakcije u početnoj cirozi (Slika 12). Zdrava jetra pokazuje najslabiji intenzitet obojenja TGF- β 1 ekspresije (Slika 12). Pošto je TGF- β 1 jedan od ključnih medijatora fibrogeneze (98, 149), ovakav nalaz ekspresije u fazi u kojoj postoji najintenzivnija pregradnja veziva (nodularna ciroza), dodatno potvrđuje njegova profibrotička svojstva.

5.3. Razina ekspresije BMP-9 i TGF- β 1

Cilj je bio odrediti razinu ekspresije proteina BMP-9 i TGF- β 1 u odnosu na β -actin u tkivu zdrave jetre i u tkivu jetre koja je zahvaćene određenim stadijem ciroze. Zhong i sur. su Western blotom utvrđivali razinu ekspresije TGF- β 1 u jetri štakora (150), dok su Xiao i sur. 2012. to isto radili na hepatocitima u kulturi stanica u kontekstu aktivacije HSCs (151). Breitkopf i sur., 2005 ističu TGF- β 1 kao najjači aktivator HSCs (152), a Li u svojoj Disertaciji govori o najjače intenzitetu izražaja TGF- β 1 jedan dan nakon kemijskog oštećenja jetre (153).

Naš rezultat dobiven Western blot metodom potvrđuje nalaz intenziteta obojenja imunohistokemijske reakcije. I ovdje smo utvrdili najveću razinu ekspresije BMP-9 i TGF- β 1 u nodularnoj cirozi (Slika 14). Slično nodularnoj cirozi, TGF- β 1 pokazuje visoku razinu ekspresije i u početnoj cirozi, što je očekivano s obzirom da su obje faze okarakterizirane bilo sa stvaranjem ili intenzivnim umnažanjem vezivnog tkiva. Ovakav nalaz ekspresije TGF- β 1 u cirozom promijenjenoj jetri, dodatno potvrđuju brojne TGF- β 1 pozitivne Kupferove stanice (Slika 10), za koje znamo da izlučuju TNF- α . Povećano stvaranje TNF- α potiče oslobađanje inhibitora metaloproteinaza-1 (TIMPs-1) iz aktiviranih zvjezdolikih stanica. Na ovaj način je spriječena apoptoza zvjezdolikih stanica jetre, čime je dodatno potaknuta fibrogenaza u Disseovim prostorima.

S obzirom na činjenicu da je nedavno kvantificirana mRNA za BMP-9, metodom obrnute lančane reakcije transkripcije polimerazom (eng. reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) (137), pretpostavili smo da BMP-9 produciraju ljudski hepatociti. Metabolička heterogenost jetre (56) kao i pronalazak ovog morfogena u stanicama strome jetre, govori u prilog njegovog autokrino/parakrinog djelovanja (71).

Razinu ekspresije proteina BMP-9 u pulveriziranom tkivu jetre istraživala je Caperuto sa sur., koja je promatrala razinu ekspresije ove molekule u kontekstu metabolizma glukoze i njegove podložnosti utjecaju inzulina te glukokortikosteroida, u smislu njegove moguće uloge HISS-a (109). Oni su u eksperimentalnom dijelu svojeg rada, Western blot metodom detektirali dvije molekule koje imunoreaktivnošću odgovaraju BMP-9. Ovo je dodatno razjašnjeno nalazima Bidart i sur., koji su identificirali neaktivni (zimogeni) i aktivni oblik molekule BMP-9 (137). U svojoj doktorskoj Disertaciji Li je objavio rezultate u kojima je, kvantificirajući razinu ekspresije BMP-9 u jetri štakora, pronašao da izražaj BMP-9 dostiže maksimum treći dan nakon intoksikacije s CCl₄, kada jetra pokazuje vrhunac svoga reparacijskog kapaciteta. Ovaj nalaz Lia upućuje na činjenicu da bi BMP-9 mogao imati ulogu u cijeljenju akutno oštećene jetre (153).

Ovim smo istraživanjem utvrdili statistički značajno veću razinu ekspresije BMP-9 u nodularnoj cirozi u odnosu na zdravu jetru ($P < 0,01$) i početnu cirozu ($P < 0,05$) (Slika 13), što treba sagledati u kontekstu rezultata imunohistokemijske reakcije. Najintenzivniju ekspresiju BMP-9 našli smo u regenerativnim čvorićima nodularne ciroze (Slika 7) te u rubnim, periportalnim i perisinusoidalnim hepatocitima početne ciroze (Slika 6). S obzirom da su periportalni prostori najaktivnije mjesto stvaranja kolagena i veziva, moguće je da rubni hepatociti reagiraju na oštećenje, tako što pokazuju jaču ekspresiju, a moguće je time i veću produkciju BMP-9. Iako utjecaj BMP-9 na zvjezdolike stanice jetre do danas nije rasvijetljen, znamo da on potiče proliferaciju hepatocita. Ovim smo samo djelomično potvrdili pretpostavku Lia, o mogućoj reparacijskoj ulozi BMP-9 u jetri čovjeka (153).

Uz to što BMP-9 stimulira proliferaciju stanica ljudskog hepatoma, on pokazuje i učinak sličan inzulinu. Obzirom da inzulin, dokazano regenerira masno promijenjenu jetru i BMP-9 bi mogao, poput neki drugih članova BMP obitelji (BMP-7 u upalnoj bolesti crijeva)

spriječiti epitelno-mezenhimalnu tranziciju i potaknuti regenerativne procese u jetri čovjeka (154).

5.4. Relativna ekspresija MMP-2 i MMP-9

Analizirali smo stupanj oštećenosti uzorka tkiva ljudske jetre u različitim stadijima razvoja ciroze i u zdravoj jetri, mjereći aktivnost enzima matriks-metaloproteinaza (MMPs), koji razgrađuju izvanstanični matriks. Utvrdili smo da MMP-9 ima najveću relativnu ekspresiju u uzorcima jetre zahvaćene početnom cirozom, a MMP-2 pokazuje najveću relativnu ekspresiju u uzorcima jetre s nodularnom cirozom (Slika 15).

Stanice u kontaktu s intaktnim ECM-om normalno funkcioniraju, dok pregradnja i razgradnja ECM-a mogu dodatno utjecati na strukturnu nestabilnost (102). Kontakt s promijenjenim ili razgrađenim ECM-om pokreće brojne patofiziološke signale koji rezultiraju različitim staničnim odgovorima. Nekontrolirana ekspresija MMPs može uzrokovati oštećenja tkiva i dovesti do razvoja brojnih bolesti.

Ciroza je kompleksan klinički entitet kojim dominira abnormalna citoarhitektura jetre. Histološki cirozu karakterizira značajna promjena tkivne arhitekture kao posljedica obilno umnoženog vezivnog tkiva koje zaokružuje pojedine dijelove jetrenog parenhima. Unutar njih dolazi do stvaranja regenerativnih čvorića. Aktiviranje zvjezdolikih stanica jetre središnji je događaj u fibrozi jetre (73, 155). U svim oblicima ozljede jetre, ove potporne stanice aktivacijom postaju kontraktibilni, proliferativni i fibrotički elementi. U modelima početnog oštećenja jetre u životinja, gomilanje izvanstanične tvari razmjerano je povećanju razgradnje izvanstanične tvari. Ključni posrednici aktiviranja jetrenih zvjezdolikih stanica uključuju niz citokina i njihovih receptora čije stanično porijeklo još uvijek nije posve jasno (156). Njihovo djelovanje je, međutim, regulirano količinom aktivnog proteina i koncentracijom specifičnih inhibicijskih molekula koje se nazivaju tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMPs), koji se

vežu s visokim afinitetom na katalitičko mjesto MMPs (157). TIMP produciraju različite vrste stanica, kao što su makrofagi, fibroblasti i polimorfonukleari (158, 159). Postoje, doduše, i nespecifični inhibitori MMPs, najvažniji je α 2-makroglobulin (160, 161). Kod prestanka oštećenja jetre na životinjskom modelu, aktivirane HSCs se uklanjaju apoptozom, aktivnost TIMPs se smanjuje, čime se dopušta aktivnim enzimima da razgrade izvanstaničnu tvar. Iako ova zapažanja na životinjama moraju tek biti potvrđena na ljudima, ukazuju na potencijal za iskorištavanje čimbenika koji nadziru kolagenaznu aktivnost s ciljem razvijanja učinkovite antifibrotičke terapije (76).

Mi smo stupanj oštećenosti uzorka tkiva jetre čovjeka analizirali mjerenjem aktivnosti gelatinaza (MMP-2 i MMP-9), za koje je rečeno kako imaju sposobnost degradirati elastin i kolagen tip IV. Time mogu utjecati na rano remodeliranje tkiva nakon oštećenja parenhima, kako se vidi u početnoj cirozi. Osim toga, MMPs općenito mogu cijepati različite proteine koji ne pripadaju ECM-u generirajući biološke procese. Isto tako, MMPs imaju sposobnost potaknuti oslobađanje različitih bioaktivnih molekula s površine stanice, kao što su: TNF- α , L-selektin, IL-6 i druge. Na taj način MMPs mogu biti uključene u kontrolu staničnih procesa, uključujući i upalu te angiogenezu (162).

Kleiner i sur. 1994. zagovaraju primjenu mjerenja aktivnosti gelatinaza kao jednostavne zimografske tehnike, zbog njene visoke osjetljivosti (163, 164). Nakon bojanja elektroforetskog gela bojom Coomassie blue R-350, područja bez obojenosti na pozadini obojenoj plavo ukazuju na gelatinolitičku aktivnost.

Matriks-metaloproteinaze (MMPs) razgrađuju ECM čime mogu utjecati na rano remodeliranje tkiva nakon oštećenja parenhima (102, 103). Na osnovi specifičnosti njihova supstrata i funkcije MMP dijelimo na: gelatinaze (MMP-2, MMP-9), kolagenaze (MMP-1, MMP-8, MMP-13), stromelizine (MMP-3, MMP-10), membranske vrste MMP (MT-MMP,

MT1-MMP, MT1-MMP-3), te druge kao što su matrilizin (MMP-7), stromelizin 3 (MMP-11) i metaloelastaze (MMP-12) (103). MMP-2 secerniraju u prvom redu fibroblasti i epitelne stanice, dok su neutrofili glavni izvor MMP-9. Logičnim se čini razmišljanje da će smanjena aktivnost MMPs rezultirati bržom akumulacijom kolagena i ostalih komponenti ECM (76, 102). U većini eksperimentalnih studija s oštećenjem jetre stupanj oštećenja parenhima praćen je mjerenjem aktivnosti MMP -2 i MMP-9 (165). Gelatinaze, nazvane po specifičnom supstratu, uz homolgiju s ostalim metaloproteinazama imaju i dodatnu domenu s tri kaskadna spoja koja se ponavljaju i slične fibronektinu tip II. Cijepaju katalitičko područje te stupaju u interakciju s kolagenima i gelatinima (104).

Osim vezano za jetru, povišene vrijednosti MMP-2 i -9 dokazane su i u nekim bolestima, kao što su: angina pectoris, akutna koronarna bolest i arteriovenska malformacija mozga (166, 167). Wilson je sa sur. 2004. pronašao povišenu razinu ekspresije gelatinaza i MMP -7 u lateralnom lobulu prostate štakora koji boluju od nebakterijskog prostatitisa (168). I u drugim organima, primjerice u plućima, u idiopatskoj plućnoj fibrozi MMP-2 i MMP-9 utječu na rano remodeliranje alveola (169). Prekid bazalne membrane kojeg naprave omogućuje ulazak upalnih i intersticijskih stanica u alveolarni prostor dovodeći do destrukcije tkiva i intraalveolarne fibroze. Brojna istraživanja kojima je utvrđen izražaj gelatinaza u stanicama karcinoma (170-172) idu u prilog specifičnosti MMP2 i MMP-9 prema kolagenu tip IV, odnosno, značajno doprinose invazivnosti i metastaziranju tumora razgrađujući bazalnu membranu.

U našem istraživanju smo utvrdili najveću relativnu ekspresiju MMP-9 u početnoj cirozi, dok MMP-2 ima najveću relativnu ekspresiju u nodularnoj cirozi (Slika 15). MMP-2 secerniraju fibroblasti i epitelne stanice te je njegova velika ekspresija očekivana u nodularnoj cirozi, obzirom da je to faza intenzivnog umnažanje vezivnog tkiva. Neutrofilni leukociti su međutim glavni izvor MMP-9. Kako se radi o upalnim stanicama,

koje su u velikom broju prisutne u početnoj cirozi, koja ima upalnu komponentu, za očekivati je da će s povećanim brojem upalnih stanica i ekspresija MMP-9 biti velika.

Matriks-metaloproteinaze secerniraju različite vrste stanica u inaktivnoj formi, a proteolitička im je aktivnost u tkivima regulirana enzimskom aktivacijom i inhibicijom (102). Budući da imaju sposobnost katalizirati degradaciju strukturnih proteina ECM, pretpostavlja se da je njihova glavna uloga u fiziološkom remodeliranju tkiva za vrijeme razvoja, rasta, uterinog ciklusa, postpartalne involucije i reparacije ozljeda (102, 105, 106)

Naš rezultat ekspresije MMP-2 i MMP-9 govori o tome da stupanj oštećenosti uzorka tkiva jetre čovjeka u različitim stadijima razvoja ciroze jetre, korelira s ekspresijom enzima gelatinaza.

5. ZAKLJUČCI

1. Imunohistokemijskom analizom utvrdili smo ekspresiju i lokalizaciju BMP-9 u: zdravoj jetri, početnoj cirozi i nodularnoj cirozi. U hepatocitima se ekspresija BMP-9 mijenja sukladno stadijima razvoja ciroze jetre. U tkivu zdrave jetre, početne ciroze i nodularne ciroze BMP-9 je pozitivan u većini hepatocita i u epitelu žučnih kanalića. U početnoj cirozi nešto izrazitija ekspresija BMP-9 opažena je u rubnim hepatocitima, koji leže uz periportalne i perisinusoidalne prostore, gdje se može naći i pokoja pozitivna Kupferova stanica. U tkivu jetre zahvaćene nodularnom cirozom vidljiva je izrazita ekspresija BMP-9 unutar regenerativnih čvorića jetrenog parenhima.
2. Kvantitativnom analizom intenziteta imunohistokemijske reakcije utvrđen je najjači intenzitet obojenja BMP-9 ekspresije u nodularnoj cirozi. Uzimajući u obzir činjenicu da BMP-9 ima od prije utvrđena mitogena svojstva i uz pretpostavku da pomaže u cijeljenju akutno oštećene jetre, naš nalaz najjače ekspresije BMP-9 u regeneracijskim čvorićima nodularne ciroze i u rubnim – periportalnim i perisinusoidalnim hepatocitima početne ciroze, upućuje na moguću regenerativnu ulogu BMP-9 u jetri čovjeka.
3. Imunohistokemijskom analizom utvrdili smo ekspresiju TGF- β 1 u hepatocitima: zdrave jetre, početne ciroze i nodularne ciroze te smo pronašli da se ona mijenja sukladno stadijima razvoja ciroze jetre. Izrazitija TGF- β 1 ekspresija opažena je u hepatocitima pericentralne zone zdrave jetre, a u tkivu jetre zahvaćene početnom cirozom i nodularnom cirozom, TGF- β 1 je eksprimiran ne samo u hepatocitima, nego i u epitelu žučnih kanalića i Kupferovim stanicama. Kvantitativnom analizom intenziteta imunohistokemijske reakcije utvrđen je najjači intenzitet obojenja TGF- β 1 ekspresije u nodularnoj cirozi.

4. Nalaz Western blot analize potvrdio je rezultat intenziteta imunohistokemijskog obojenja, ekspresije BMP-9 i TGF- β 1 u jetri čovjeka. S obzirom da oba morfogena imaju najjaču razinu ekspresije u nodularnoj cirozi, ovakav rezultat upućuje na finu ravnotežu između BMP-9 i TGF- β 1, kojih je ekspresija najjača u fazi u kojoj postoji najintenzivnija pregradnja vezivnog tkiva.

5. Oštećenost uzorka tkiva jetre čovjeka analizirali smo u različitim stadijima razvoja ciroze jetre, mjerenjem aktivnosti enzima matriks-metaloproteinaza -2 i -9 (MMP-2 i MMP-9). Utvrdili smo da MMP-2 ima najveću relativnu ekspresiju u nodularnoj cirozi, a MMP-9 ima najveću relativnu ekspresiju u početnoj cirozi. Ovaj rezultat potvrđuje da stupanj oštećenosti tkiva u različitim stadijima razvoja ciroze, korelira s ekspresijom enzima gelatinaza u jetri čovjeka.

7. LITERATURA

1. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753-91.
2. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996;10:1580-94.
3. Yue J, Mulder KM. Transforming growth factor-beta signal transduction in epithelial cells. *Pharmacol Ther* 2001;91:1-34.
4. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994;8:133-46.
5. Duneas N, Crooks J, Ripamonti U. Transforming growth factor-beta 1: Induction of bone morphogenetic protein genes expression during endochondral bone formation in the baboon, and synergistic interaction with osteogenic protein-1 (BMP-7). *Growth Factors* 1998;15:259-77.
6. Chiu YN, Norris RA, Mahler G, Recknagel A, Butcher JT. Transforming Growth Factor beta, Bone Morphogenetic Protein, and Vascular Endothelial Growth Factor Mediate Phenotype Maturation and Tissue Remodeling by Embryonic Valve Progenitor Cells: Relevance for Heart Valve Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A*. 2010;16:3375-83.
7. Nakagawa T, Lee SY, Reddi AH. Induction of Chondrogenesis From Human Embryonic Stem Cells Without Embryoid Body Formation by Bone Morphogenetic Protein 7 and Transforming Growth Factor beta 1. *Arthritis Rheum* 2009;60:3686-92.

8. Lee CG, Kang HR, Homer RJ, Chupp G, Elias JA. Transgenic modeling of transforming growth factor-beta(1): role of apoptosis in fibrosis and alveolar remodeling. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:418-23.
9. Merwin JR, Anderson JM, Kocher O, Van Itallie CM, Madri JA. Transforming growth factor beta 1 modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during in vitro angiogenesis. *J Cell Physiol* 1990;142:117-28.
10. Liu MA, Oliff A. Transforming growth factor-beta--mullerian inhibiting substance family of growth regulators. *Cancer Invest* 1991;9:325-36.
11. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993;260:1130-2.
12. Schiott A, Sjogren HO, Lindvall M. The three isoforms of transforming growth factor-beta co-stimulate rat T cells and inhibit lymphocyte apoptosis. *Scand J Immunol* 1998;48:371-8.
13. Donnet-Hughes A, Duc N, Serrant P, Vidal K, Schiffrin EJ. Bioactive molecules in milk and their role in health and disease: the role of transforming growth factor-beta. *Immunol Cell Biol* 2000;78:74-9.
14. Poon VY, Choi S, Park M. Growth factors in synaptic function. *Front Synaptic Neurosci* 2013;5:6.
15. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with

- transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 1998;66:1014-20.
16. Bottinger EP, Letterio JJ, Roberts AB. Biology of TGF-beta in knockout and transgenic mouse models. *Kidney Int* 1997;51:1355-60.
 17. De Bleser PJ, Niki T, Rogiers V, Geerts A. Transforming growth factor-beta gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol* 1997;26:886-93.
 18. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004;22:233-41.
 19. Lopez-Coviella I, Berse B, Krauss R, Thies RS, Blusztajn JK. Induction and maintenance of the neuronal cholinergic phenotype in the central nervous system by BMP-9. *Science* 2000;289:313-6.
 20. Schnitzler AC, Mellott TJ, Lopez-Coviella I i sur. BMP9 (bone morphogenetic protein 9) induces NGF as an autocrine/paracrine cholinergic trophic factor in developing basal forebrain neurons. *J Neurosci* 2010;30:8221-8.
 21. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-9.
 22. Luyten FP, Cunningham NS, Ma S i sur. Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem* 1989;264:13377-80.
 23. Wozney JM. Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res* 1989;1:267-80.
 24. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ i sur. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-34.

25. Sweatt A, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. *J Thromb Haemost* 2003;1:178-85.
26. Davis BJ, Johnston CI, Burrell LM i sur. Renoprotective effects of vasopectidase inhibition in an experimental model of diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2003;46:961-71.
27. Marić I, Poljak L, Zoričić S i sur. Bone morphogenetic protein-7 reduces the severity of colon tissue damage and accelerates the healing of inflammatory bowel disease in rats. *J Cell Physiol* 2003;196:258-64.
28. Celeste AJ SJ, Cox K, Rosen V, Wozney JM. . Bone morphogenetic protein-9, a new member of the TGF- β superfamily. 16th Annual Meeting of The American Society for Bone and Mineral Research 1994; 9 Suppl.1: 136.
29. Brown MA, Zhao Q, Baker KA i sur. Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J Biol Chem* 2005;280:25111-8.
30. Song K, Krause C, Shi S i sur. Identification of a key residue mediating bone morphogenetic protein (BMP)-6 resistance to noggin inhibition allows for engineered BMPs with superior agonist activity. *J Biol Chem* 2010;285:12169-80.
31. Herrera B, Inman GJ. A rapid and sensitive bioassay for the simultaneous measurement of multiple bone morphogenetic proteins. Identification and quantification of BMP4, BMP6 and BMP9 in bovine and human serum. *BMC Cell Biol* 2009;10:20.

32. Bessa PC, Cerqueira MT, Rada T i sur. Expression, purification and osteogenic bioactivity of recombinant human BMP-4, -9, -10, -11 and -14. *Protein Expr Purif* 2009;63:89-94.
33. Chen C, Grzegorzewski KJ, Barash S i sur. An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat Biotechnol* 2003;21:294-301.
34. Suzuki Y, Ohga N, Morishita Y, Hida K, Miyazono K, Watabe T. BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *J Cell Sci* 2010;123:1684-92.
35. Truksa J, Peng H, Lee P, Beutler E. Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:10289-93.
36. Herrera B, van Dinther M, Ten Dijke P, Inman GJ. Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Res* 2009;69:9254-62.
37. Ye L, Kynaston H, Jiang WG. Bone morphogenetic protein-9 induces apoptosis in prostate cancer cells, the role of prostate apoptosis response-4. *Mol Cancer Res* 2008;6:1594-606.
38. Wang C, Hu F, Guo S i sur. BMP-6 inhibits MMP-9 expression by regulating heme oxygenase-1 in MCF-7 breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137:985-95.

39. 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.
40. Smith DM, Cooper GM, Afifi AM i sur. Regenerative surgery in cranioplasty revisited: the role of adipose-derived stem cells and BMP-2. *Plast Reconstr Surg* 2011;128:1053-60.
41. Derynck R, Feng XH. TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta*1997;1333:F105-50.
42. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 2010;147:35-51.
43. Smadja DM, Bieche I, Silvestre JS i sur. Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:2137-43.
44. David L, Mallet C, Keramidas M i sur. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res* 2008;102:914-22.
45. Roelen BA, van Rooijen MA, Mummery CL. Expression of ALK-1, a type 1 serine/threonine kinase receptor, coincides with sites of vasculogenesis and angiogenesis in early mouse development. *Dev Dyn* 1997;209:418-30.
46. Lamouille S, Mallet C, Feige JJ, Bailly S. Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood* 2002;100:4495-501.

47. Lux A, Attisano L, Marchuk DA. Assignment of transforming growth factor beta1 and beta3 and a third new ligand to the type I receptor ALK-1. *J Biol Chem* 1999;274:9984-92.
48. Lopez-Coviella I, Mellott TM, Kovacheva VP i sur. Developmental pattern of expression of BMP receptors and Smads and activation of Smad1 and Smad5 by BMP9 in mouse basal forebrain. *Brain Res* 2006;1088:49-56.
49. Yue J, Mulder KM. Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a Smad-dependent pathway. *J Biol Chem* 2000;275:30765-73.
50. Yoshimatsu Y, Lee YG, Akatsu Y i sur. Bone morphogenetic protein-9 inhibits lymphatic vessel formation via activin receptor-like kinase 1 during development and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(47):18940-5.
51. Fu Y, O'Connor LM, Shepherd TG, Nachtigal MW. The p38 MAPK inhibitor, PD169316, inhibits transforming growth factor beta-induced Smad signaling in human ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:391-7.
52. Hocevar BA, Brown TL, Howe PH. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J* 1999;18:1345-56.
53. Sirard C, Kim S, Mirtsos C i sur. Targeted disruption in murine cells reveals variable requirement for Smad4 in transforming growth factor beta-related signaling. *J Biol Chem* 2000;275:2063-70.

54. Cvijanović O, Čelić T, Peternel S i sur. Immunoassaying of bone morphogenetic protein-9 and its receptors in liver and pancreas of diabetic Wistar rats. Abstracts of the 35th European Symposium on Calcified Tissues; u: Calcified Tissue International. New York: Springer Science; Business Media, 2008; 82 (Suppl1): S13-S254.
55. Cvijanović O, Čelić T, Peternel S i sur. Expression of bone morphogenetic protein-9 in adult human liver. Abstracts of the 35th European Symposium on Calcified Tissues; u: Calcified Tissue International. New York: Springer Science; Business Media, 2008;82 (Suppl2): S83-S83.
56. Gebhardt R. Metabolic zonation of the liver: Regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther* 1992;53:275-354.
57. Lieber CS. Alcohol, liver, and nutrition. *J Am Coll Nutr* 1991;10:602-32.
58. Lieber CS. Alcoholic liver disease: a public health issue in need of a public health approach. *Semin Liver Dis* 1993;13:105-7.
59. Lieber CS, DeCarli LM. Hepatotoxicity of ethanol. *J Hepatol* 1991;12:394-401.
60. Maddrey WC. Alcoholic hepatitis: pathogenesis and approaches to treatment. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1990;175:118-30.
61. Fausto N, Laird AD, Webber EM. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J* 1995;9:1527-36.
62. Pintilie DG, Shupe TD, Oh SH, Salganik SV, Darwiche H, Petersen BE. Hepatic stellate cells' involvement in progenitor-mediated liver regeneration. *Lab Invest* 2010;90:1199-208.

63. 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.
64. Duncan SA, Watt AJ. BMPs on the road to hepatogenesis. *Genes Dev* 2001;15:1879-84.
65. Sugimoto H, Yang CQ, LeBleu VS i sur. BMP-7 functions as a novel hormone to facilitate liver regeneration. *FASEB J* 2007;21:256-64.
66. Zaret KS. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet* 2002;3:499-512.
67. Fan J, Shen H, Sun Y i sur. Bone morphogenetic protein 4 mediates bile duct ligation induced liver fibrosis through activation of Smad1 and ERK1/2 in rat hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 2006;207:499-505.
68. Knittel T, Fellmer P, Muller L, Ramadori G. Bone morphogenetic protein-6 is expressed in nonparenchymal liver cells and upregulated by transforming growth factor-beta 1. *Exp Cell Res* 1997;232:263-69.
69. Zeisberg M, Yang C, Martino M i sur. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007;282:23337-47.
70. Tacke F, Gabele E, Bataille F i sur. 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.
71. Miller AF, Harvey SA, Thies RS, Olson MS. Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J Biol Chem* 2000;275:17937-45.

72. Breitkopf K, Li Q, Muller A i sur. Impact of the smad-1/5/8 tgf-beta pathway on liver damage and hepatic regeneration. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34:60a-60a.
73. Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R i sur. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* 2007;26:117-29.
74. Winau F, Quack C, Darmoise A, Kaufmann SH. Starring stellate cells in liver immunology. *Curr Opin Immunol* 2008;20:68-74.
75. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008;134:1655-69.
76. Bonis PA, Friedman SL, Kaplan MM. Is liver fibrosis reversible? *N Engl J Med* 2001;344:452-4.
77. Parsons CJ, Bradford BU, Pan CQ i sur. Antifibrotic effects of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 antibody on established liver fibrosis in rats. *Hepatology* 2004;40:1106-15.
78. Chevallier M, Guerret S, Chossegros P, Gerard F, Grimaud JA. A histological semiquantitative scoring system for evaluation of hepatic fibrosis in needle liver biopsy specimens: comparison with morphometric studies. *Hepatology* 1994;20:349-55.
79. Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2007;47:598-607.
80. Strassburg CP, Manns MP. Approaches to liver biopsy techniques--revisited. *Semin Liver Dis* 2006;26:318-27.

81. Cholongitas E, Senzolo M, Standish R i sur. A systematic review of the quality of liver biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 2006;125:710-21.
82. Ishak K, Baptista A, Bianchi L i sur. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-9.
83. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289-93.
84. Standish RA, Cholongitas E, Dhillon A, Burroughs AK, Dhillon AP. An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis. *Gut* 2006;55:569-78.
85. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-6.
86. Francavilla A, Vujanović NL, Polimeno L i sur. The in vivo effect of hepatotrophic factors augments liver regeneration, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factor-II on liver natural killer cell functions. *Hepatology* 1997;25:411-5.
87. Zajicek G, Oren R, Weinreb M, Jr. The streaming liver. *Liver* 1985;5:293-300.
88. Bralet MP, Branchereau S, Brechot C, Ferry N. Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. Evidence against the streaming of hepatocytes in normal liver. *Am J Pathol* 1994;144:896-905.
89. Falize L, Guillygomarc'h A, Perrin M i sur. Reversibility of hepatic fibrosis in treated genetic hemochromatosis: a study of 36 cases. *Hepatology* 2006;44:472-7.
90. Wakim-Fleming J, Mullen KD. Long-term management of alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis* 2005;9:135-49.

91. Dufour JF, DeLellis R, Kaplan MM. Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1997;127:981-5.
92. Pinzani M, Vizzutti F. Fibrosis and cirrhosis reversibility: clinical features and implications. *Clin Liver Dis* 2008;12:901-13.
93. Bortolotti F, Guido M, Cadrobbi P i sur. Spontaneous regression of hepatitis B virus-associated cirrhosis developed in childhood. *Dig Liver Dis* 2005;37:964-7.
94. Poynard T, Regimbeau C, Myers RP i sur. Interferon for acute hepatitis C. *Cochrane Database Syst Rev* 2002 (1):CD000369.
95. Desmet VJ, Roskams T. Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *J Hepatol* 2004;40:860-7.
96. Rappaport AM, MacPhee PJ, Fisher MM, Phillips MJ. The scarring of the liver acini (Cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory considerations. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1983;402:107-37.
97. Di Vinicius I, Baptista AP, Barbosa AA, Andrade ZA. Morphological signs of cirrhosis regression. Experimental observations on carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis of rats. *Pathol Res Pract* 2005;201:449-56.
98. Friedman SL. Hepatic fibrosis -- overview. *Toxicology* 2008;254:120-9.
99. 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.

100. Lafdil F, Chobert MN, Couchie D i sur. Induction of Gas6 protein in CCl4-induced rat liver injury and anti-apoptotic effect on hepatic stellate cells. *Hepatology* 2006;44:228-39.
101. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* 2004;199:174-80.
102. Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:602-8.
103. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491-4.
104. Steffensen B, Wallon UM, Overall CM. Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. *J Biol Chem* 1995;270:11555-66.
105. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990;6:121-5.
106. Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 1994;7:2062-72.
107. Lutt WW. The HISS story overview: a novel hepatic neurohumoral regulation of peripheral insulin sensitivity in health and diabetes. *Can J Physiol Pharmacol* 1999;77:553-62.

108. Alam T, Sollinger HW. Glucose-regulated insulin production in hepatocytes. *Transplantation* 2002;74:1781-7.
109. Caperuto LC, Anhe GF, Cambiaghi TD i sur. Modulation of bone morphogenetic protein-9 expression and processing by insulin, glucose, and glucocorticoids: possible candidate for hepatic insulin-sensitizing substance. *Endocrinology* 2008;149:6326-35.
110. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000;32:19-31.
111. Kirillova I, Chaisson M, Fausto N. Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation. *Cell Growth Differ* 1999;10:819-28.
112. 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.
113. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2001;2:Reviews3005.
114. Clotman F, Jacquemin P, Plumb-Rudewiez N i sur. Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors. *Genes Dev* 2005;19:1849-54.
115. Zajicek G. Do livers "stream"? *Am J Pathol* 1995;146:772-6.
116. van der Wee K, Hofmann MC. An in vitro tubule assay identifies HGF as a morphogen for the formation of seminiferous tubules in the postnatal mouse testis. *Exp Cell Res* 1999;252:175-85.

117. Keyhanian K, Edalat R, Oghalaei A i sur. Effect of hepatocyte growth factor (HGF) on the level of Survivin & XIAP expression in several human cancer cell lines, after treating with DNA damaging agent. *Mol Cell Biochem* 2007;304:199-205.
118. Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. HGF as a renotropic and anti-fibrotic regulator in chronic renal disease. *Front Biosci* 2008;13:7072-86.
119. Akerman P, Cote P, Yang SQ i sur. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol* 1992;263:G579-85.
120. Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1441-6.
121. Leist M, Gantner F, Kunstle G i sur. The 55-kD tumor necrosis factor receptor and CD95 independently signal murine hepatocyte apoptosis and subsequent liver failure. *Mol Med* 1996;2:109-24.
122. Roberts AB, Russo A, Felici A, Flanders KC. Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta. *Ann N Y Acad Sci* 2003;995:1-10.
123. Uemura M, Swenson ES, Gaca MD, Giordano FJ, Reiss M, Wells RG. Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization. *Mol Biol Cell* 2005;16:4214-24.
124. Weiskirchen R, Meurer SK. BMP-7 counteracting TGF-beta1 activities in organ fibrosis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2013;18:1407-34.

125. Czaja MJ, Geerts A, Xu J, Schmiedeberg P, Ju Y. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) expression occurs in toxic rat liver injury and human liver disease. *J Leukoc Biol* 1994;55:120-6.
126. Schroppe B, Fischereder M, Lin M i sur. Analysis of gene polymorphisms in the regulatory region of MCP-1, RANTES, and CCR5 in liver transplant recipients. *J Clin Immunol* 2002;22:381-5.
127. Grandaliano G, Valente AJ, Rozek MM, Abboud HE. Gamma interferon stimulates monocyte chemotactic protein (MCP-1) in human mesangial cells. *J Lab Clin Med* 1994;123:282-9.
128. Sakai N, Wada T, Furuichi K i sur. MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes. *J Leukoc Biol* 2006;79:555-63.
129. Rachfal AW, Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 2003;26:1-9.
130. Novo E, Cannito S, Zamara E i sur. Proangiogenic cytokines as hypoxia-dependent factors stimulating migration of human hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2007;170:1942-53.
131. Rockey DC. Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology* 2003;37:4-12.
132. Li X, Meng Y, Yang XS, Mi LF, Cai SX. ACEI attenuates the progression of CCl₄-induced rat hepatic fibrogenesis by inhibiting TGF-beta1, PDGF-BB, NF-kappaB and MMP-2,9. *World J Gastroenterol* 2005;11:4807-11.
133. Ruiz M, Jimenez E, Montiel M, Narvaez JA, Diego AM, Morell M. Effect of various components of the renin-angiotensin-aldosterone system on angiotensinogen

- production in a monolayer culture of adult rat hepatocytes. *Horm Metab Res* 1987;19:411-4.
134. Moreno M, Bataller R. Cytokines and renin-angiotensin system signaling in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008;12:825-52.
 135. Pandey R, Hegde VL, Singh NP i sur. Use of cannabinoids as a novel therapeutic modality against autoimmune hepatitis. *Vitam Horm* 2009;81:487-504.
 136. 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:G357-62.
 137. Bidart M, Ricard N, Levet S i sur. BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2012;69:313-24.
 138. Grgurević L, Maček B, Healy DR i sur. Circulating bone morphogenetic protein 1-3 isoform increases renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:681-92.
 139. Kawasaki T, Niki Y, Miyamoto T i sur. The effect of timing in the administration of hepatocyte growth factor to modulate BMP-2-induced osteoblast differentiation. *Biomaterials* 2010;31:1191-8.
 140. Tsai SY, Huang YL, Yang WH, Tang CH. Hepatocyte growth factor-induced BMP-2 expression is mediated by c-Met receptor, FAK, JNK, Runx2, and p300 pathways in human osteoblasts. *Int Immunopharmacol* 2012;13:156-62.
 141. Lenox LE, Shi L, Hegde S, Paulson RF. Extramedullary erythropoiesis in the adult liver requires BMP-4/Smad5-dependent signaling. *Exp Hematol* 2009;37:549-58.

142. Vaccaro AR, Whang PG, Patel T i sur. The safety and efficacy of OP-1 (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis: minimum 4-year follow-up of a pilot study. *Spine J* 2008;8:457-65.
143. Knittel T, Fellmer P, Muller L, Ramadori G. Expression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in rat liver. *Hepatology* 1996;24:1326-26.
144. Meynard JL, Lacombe K, Poirier JM, Legrand J, Morand-Joubert L, Girard PM. Influence of liver fibrosis stage on plasma levels of efavirenz in HIV-infected patients with chronic hepatitis B or C. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:579-84.
145. Upton PD, Morrell NW. The transforming growth factor--bone morphogenetic protein type signalling pathway in pulmonary vascular homeostasis and disease. *Exp Physiol* 2013;98:1262-66.
146. Park JES, Upton PD, de Souza PM i sur. Bone Morphogenetic Protein 9 Increases Endothelin-1 Release by Human Pulmonary Artery Endothelial Cells Via a Mapk-Dependent Pathway. *Thorax* 2009;64:A56-A57.
147. Nakamura T, Tomita Y, Hirai R, Yamaoka K, Kaji K, Ichihara A. Inhibitory effect of transforming growth factor-beta on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;133:1042-50.
148. Garcia-Lazaro JF, Meyer E, Brauer S i sur. The role of TGF-beta in liver regeneration: Studies with CRP/TGF-beta transgenic mice. *J Hepatol* 2002;36:79-79.
149. Gressner OA, Lahme B, Siluschek M i sur. Activation of TGF-beta within cultured hepatocytes and in liver injury leads to intracrine signaling with expression of connective tissue growth factor. *J Cell Mol Med* 2008;12:2717-30.

150. Zhong Z, Tsukada S, Theruvath T, Rippe RA, Breener DA, Lemasters JJ. TGF-beta suppresses regeneration of small-for-size liver grafts by activating Smad and P21(CIP1) pathways. *Hepatology* 2006;44:218a-18a.
151. Xiao X, Gang Y, Gu Y i sur. Osteopontin contributes to TGF-beta1 mediated hepatic stellate cell activation. *Dig Dis Sci* 2012;57:2883-91.
152. Breitkopf K, Sawitza I, Westhoff JH, Wickert L, Dooley S, Gressner AM. Thrombospondin 1 acts as a strong promoter of transforming growth factor beta effects via two distinct mechanisms in hepatic stellate cells. *Gut* 2005;54:673-8
153. Li Q. Functional roles of bone morphogenetic protein-9 in liver pathology. Heidelberg: University of Heidelberg; 2011.
154. Šoša I, Cvijanović O, Čelić T i sur. Hepatoregenerative role of bone morphogenetic protein-9. *Med Sci Monit.* 2011;17(12):HY33-5.
155. Hellerbrand C, Stefanović B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA. The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J Hepatol* 1999;30:77-87.
156. Azman J, Starcevic Klasan G, Ivanac D i sur. Reg IV protein and mRNA expression in different rat organs. *Acta Histochem* 2011;113:793-7.
157. Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs* 1997;15:61-75.
158. Bachmeier BE, Nerlich AG, Boukamp P i sur. Human keratinocyte cell lines differ in the expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases-1,-8, and-13 and of TIMP-1. *Biol Chem* 2000;381:509-16.

159. Strup-Perrot C, Mathe D, Linard C i sur. Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G875-85.
160. Opdenakker G. On the roles of extracellular matrix remodeling by gelatinase B. *Verh K Acad Geneeskd Belg* 1997;59:489-514.
161. Lichtinghagen R, Musholt PB, Lein M i sur. Different mRNA and protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in benign and malignant prostate tissue. *Eur Urol* 2002;42:398-406.
162. Goodman ZD, Becker RL, Jr., Pockros PJ, Afdhal NH. Progression of fibrosis in advanced chronic hepatitis C: evaluation by morphometric image analysis. *Hepatology* 2007;45:886-94.
163. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994;218:325-9.
164. Leber TM, Balkwill FR. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal Biochem* 1997;249:24-8.
165. Domitrovic R, Jakovac H, Tomac J, Sain I. Liver fibrosis in mice induced by carbon tetrachloride and its reversion by luteolin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;241:311-21.
166. Zeng B, Prasan A, Fung KC i sur. Elevated circulating levels of matrix metalloproteinase-9 and -2 in patients with symptomatic coronary artery disease. *Intern Med J* 2005;35:331-5.

167. Hashimoto T, Wen G, Lawton MT i sur. Abnormal expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in brain arteriovenous malformations. *Stroke* 2003;34:925-31.
168. Wilson MJ, Woodson M, Wiehr C, Reddy A, Sinha AA. Matrix metalloproteinases in the pathogenesis of estradiol-induced nonbacterial prostatitis in the lateral prostate lobe of the Wistar rat. *Exp Mol Pathol* 2004;77:7-17.
169. Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV i sur. Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1996;149:1241-56.
170. Jones JL, Glynn P, Walker RA. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol* 1999;189:161-8.
171. Schmalfeldt B, Prechtel D, Härting K i sur. Increased Expression of Matrix Metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the Urokinase-Type Plasminogen Activator Is Associated with Progression from Benign to Advanced Ovarian Cancer. *Clin Cancer Research* 2001;7:2396-404.
172. Yan L, Lin B, Gao L i sur. Lewis (y) Antigen Overexpression Increases the Expression of MMP-2 and MMP-9 and Invasion of Human Ovarian Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 2010;11:4441-52.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE

Ivan Šoša

 Rijeka, 51000

 +38651672 713  +385916996969

 Rikarda Benčića 11, Rijeka, 51000

 ivan.Šoša@medri.uniri.hr

Spol Muški | Datum rođenja 19/07/1980 | Državljanstvo Hrvatsko i Slovensko

RADNO ISKUSTVO

Zamijenite datumima (od - do)

01/02/2008 - Asistent-znanstveni novak na Zavodu za sudsku medicinu i kriminalistiku

OBRAZOVANJE OSPOSOBLJAVANJE

Zamijenite datumima (od - do)

Doktor medicine

studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci

Poslijediplomski znanstveni studij „biomedicina!“

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik Hrvatski

Ostali jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski jezik	C2	C1	C1	C1	C1
Francuski jezik	B2	B2	A2	A2	A2
Talijanski jezik	B1	B1	B2	B2	B2

Supnjevi: A1/2: Početnik - B1/2: Samostalni korisnik - C1/2 Iskusni korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Publikacije i sudjelovanja na znanstvenim skupovima:

Darko Ledić, Ivan Šoša: Does the Mild Traumatic Brain Injury (mTBI) Research Need to be Internationalized Right Now? J Rehabil Med. 2013 Nov 21. doi: 10.2340/16501977-1265. [Epub ahead of print]

Ivan Šoša, Valter Stemberga: Role of subconcussion and repetitive TBI. J Neurosurg. 2014 Mar; 120(3):789-90. doi: 10.3171/2013.10.JNS132097. Epub 2014 Jan 17.

Valter Stemberga, Dražen Cuculić, Anja Petaros, Ivan Šoša: Kayaking Fatalities: Could More Appropriate Helmets Prevent Fatal Consequences? Sports Med. 2013 Nov; 43(11):1201-2. doi: 10.1007/s40279-013-0109-y.

Marin Marinović, Bore Bakota, Josip Španjol, Ivan Šoša, Nikola Gržalja, Gordan Gulan, Aldo Ivančić, Tedi Cicvarić: High pressure injection injury of the foot: a role of negative pressure wound therapy. Injury. 2013 Sep; 44 Suppl 3:S7-10. doi: 10.1016/S0020-1383(13)70189-X.

Ivan Šoša, Ines Strenja-Linic: Letter to the Editor - Inconsistency on Frequencies of the Human Apolipoprotein E Gene Expression. Central European Journal of Medicine IN PRESS.

Ivan Šoša, Alan Bosnar: Concussion. Neurosurg Focus. 2013 May; 34(5):E16. doi: 10.3171/2013.1.FOCUS1331.

Valter Stemberga, Anja Petaros, Veronika Rašić, Josip Ažman, Ivan Šoša, Miran Čoklo, Ivone Uhač, Alan Bosnar: Dive-related fatalities among tourist and local divers in the northern Croatian littoral (1980-2010). J Travel Med. 2013 Mar-Apr;20(2):101-6. doi: 10.1111/jtm.12011. Epub 2013 Jan 31.

Valter Stemberga, Anja Petaros, Anita Barišić, Miran Čoklo, Ivan Šoša, Alan Bosnar: Car-to-pedestrian accident with a unique decollement injury. Forensic Sci Int. 2013 May 10; 228(1-3):e67-70. doi: 10.1016/j.forsciint.2013.02.007. Epub 2013 Mar 1.

Anja Petaros, Mario Šlaus, Miran Čoklo, Ivan Šoša, Morana Cengija, Alan Bosnar: Retrospective analysis of free-fall fractures with regard to height and cause of fall. Forensic Sci Int. 2013 Mar 10; 226(1-3):290-5. doi: 10.1016/j.forsciint.2013.01.044. Epub 2013 Feb 17.

Ivan Šoša, Ines Strenja Linić: Is Encephalopathic Brain Genetically More Prone to Dementia?. Central European Journal of Medicine IN PRESS.

- Ivan Šoša, Alan Bosnar: Sport-related Brain Injury: a Terminological Update. *Med Hypotheses*. 2013 Feb; 80(2):213-4. doi: 10.1016/j.mehy.2012.11.018. Epub 2012 Dec 8.
- Ines Strenja Linić, Ivan Šoša, Miljenko Kovačević, Aldo Ivančić, Zlatko Trobonjaca, Darko Ledić, Aron Grubešić, Štefica Dvornik, Sanja Štifter: Predicting carotid re-stenosis by comparison of plaque MCP-1 mRNA expression and serum levels. *Med Hypotheses*. 2013 Jan; 80(1):26-8. doi: 10.1016/j.mehy.2012.09.022. Epub 2012 Oct 23.
- Ivan Šoša, Aron Grubešić, Alan Bosnar: Minimal traumatic brain injuries and their sequelae. I: The need for screening *J Rehabil Med*. 2012 Nov 5; 44(11):988. doi: 10.2340/16501977-1061.
- Nikola Ivaniš, Aron Grubešić, Ivan Šoša, Viktor Ivaniš, Ramadan Šuke, Miljenko Kovačević: Significance of Mini Radial Endoscope Ultrasound (MREUS) in Diagnosis and Therapy of Colorectal Neoplasia. *Coll Antropol*. 2012 Sep; 36(3):873-7.
- Morana Čengija, Dražen Cuculić, Anja Petaros, Ivan Šoša, Alan Bosnar: Homicide-suicide events in Southwestern Croatia, 1986-2009. *Med Sci Law*. 2012 Oct; 52(4):217-22. doi: 10.1258/msl.2012.012006. Epub 2012 Aug 8.
- Elena Albu, Cristiana Filip, Nina Zamosteanu, Irina Maria Jaba, Ines Strenja Linić, Ivan Šoša: Hyperhomocysteinemia is an indicator of oxidant stress. *Med Hypotheses*. 2012 Apr; 78(4):554-5. doi: 10.1016/j.mehy.2012.01.007. Epub 2012 Jan 30.
- Tanja Šepić, Radan Starčević, Ivan Šoša, Ines Strenja-Linić, Aron Grubešić: High resolution close-up laryngoscopy in diagnosis of vocal folds defects. *Medicina (Croatia)*. 01/2012; 48(2):233-237.
- Darko Ledić, Ivan Šoša, Ines Strenja Linić, Olga Cvijanović, Miljenko Kovačević, Andrej Desnica, Ivanka Baniček: Vomiting as a reliable sign of concussion. *Med Hypotheses*. 2012 Jan; 78(1):23-5. doi: 10.1016/j.mehy.2011.09.032. Epub 2011 Oct 7.
- Ivan Šoša, Ines Strenja Linić, Snježana Bajek, Dražen Cuculić, Željka Crnčević-Orlić, A Grubešić, Olga Cvijanović, Alan Bosnar: Corticosteroids provoke acute endothelial injury - An ideal ground for thrombosis in multiple *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012 Jan-Mar; 26(1):131-4. Erratum in: *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012 Apr-Jun; 26(2):3
- Ivan Šoša, Aron Grubešić, Viktor Peršić, Ines Strenja-Linić, Alan Bosnar: Virchow's tetrad?. *Blood*. 01/2012.

Ivan Šoša, Olga Cvijanović, Tanja Čelić, Dražen Cuculić, Željka Crnčević-Orlić, Lucian Vukelić, Sanja Zoričić Cvek, Luka Dudarić, Alan Bosnar, Dragica Bobinac: Hepatoregenerative role of bone morphogenetic protein-9. *Med Sci Monit.* 2011 Dec; 17(12):HY33-5

Lucian Vukelić, Ivan Šoša, Olga Cvijanović, Tomislav Mađarević, Zdravko Jotanović, Alenka Vukelić Sarunić, Sanja Štifter, Sanja Zoričić Cvek, Luka Dudarić, Branko Šestan, Dragica Bobinac: Correlation of endothelin-1 mRNA expression and bone structure in advanced osteoarthritis.. *Med Hypotheses.* 2011 Nov;77(5):927-9. doi: 10.1016/j.mehy.2011.08.015. Epub 2011 Sep 3.

Ivan Šoša, Ines Strenja Linic, Anja Petaros, Andrej Desnica, Alan Bosnar: The potential value of early screening for neurological deficits in participants in certain sports. *Med Hypotheses.* 2011 Oct; 77(4):633-7. doi: 10.1016/j.mehy.2011.07.002. Epub 2011 Jul 30.

Dražen Cuculić, Valter Stemberga, Miran Čoklo, Ivan Šoša, Sanja Štifter, Alan Bosnar: Trauma related fat embolism syndrome in forensic practice. *Coll Antropol.* 2010 Jun; 34(2):723-6.

Žarko Bakran, Ivanka Baniček, Martina Varjačić, Ivan Šoša: Usporedba učinkovitosti fizioterapije i kombinacije fizioterapije s botulin toksinom. *Physiotherapia Croatica.* 01/2010; 11(2):27-30.

Miran Čoklo, Valter Stemberga, Dražen Cuculić, Ivan Šoša, Alan Bosnar: Toxicology and methods of committing suicide other than overdose. *Med Hypotheses.* 2009 Nov;73(5):809-10. doi: 10.1016/j.mehy.2009.03.047. Epub 2009 May 17

Miran Čoklo, Valter Stemberga, Dražen Cuculić, Ivan Šoša, Romana Jerković, Alan Bosnar: The methods of committing and alcohol intoxication of suicides in Southwestern Croatia from 1996 to 2005. *Coll Antropol.* 2008 Oct; 32 Suppl 2:123-5.

Zdenko Ostojić, Olga Cvijanović, Dragica Bobinac, Sanja Zoričić, Ivan Šoša, Ivana Marić, Zeljka Crnčević-Orlić, Radovan Mihelić, Ljerka Ostojić, Pavao Petrović: Age-related and gender-related differences between human vertebral and iliac crest bone--a histomorphometric study on the population of the Mediterranean Coast of Croatia. *Coll Antropol.* 2006 Mar; 30(1):49-54.

Ines Strenja-Linić, Miljenko Kovačević, Slavica Kovačić, Ivan Šoša, Zlatko Trobonjača, Štefica Dvornik: *Prognostic Significance Of Monocyte Chemotactic Protein -1 in Screening Of Patients With Early Postoperative Carotid Restenosis*. VI Hrvatski Neurološki Kongres, Split, Hotel Le Meridien Lav; 11/2013

Ines Strenja-Linić, Ivan Šoša: *Prognostic significance of MCP-1 and intensive ultrasound follow up in early postoperative carotid restenosis*. 37. Dreiländertreffen der DEGUM/ SGUM/ÖGUM / 25th EUROSON, Stuttgart; 10/2013

Anja Petaros, Dijana Begonja, Morana Cengija, Ivan Šoša, Alan Bosnar: *Human decomposition in five different conditions in western Croatia- a retrospective study with special emphasis on mummification and skeletonization*. 22nd IALM Congress; 08/2012

Olga Cvijanović, Zeljka Crncevic-Orlic, Nenad Bicanic, Tanja Celic, Ivan Šoša, Dragica Bobinac, Sanja Klobucar: *Duration effect of statin therapy on bone metabolism in dyslipidemic patients*. ISCEM 2011 International Scientific Conference on Endocrinology and Metabolism 2011.; 09/2011

Anja Petaros, Morana Cengija, Ivan Šoša, Miran Čoklo: *Freefall trauma: analysis of fractures with regard to height and cause of fall*. 19th IAFS World Meeting, 9th WPMO Triennial Meeting, 5th MAFS Meetings; 09/2011