

# Utjecaj BMP1-3 na ekspresiju Col1A1, TGFβ i dekorina u ožiljkastom tkivu štakora

---

Crnek, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:732132>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Ema Crnek**

**Utjecaj BMP1-3 na ekspresiju Col1A1, TGF $\beta$  i  
dekorina u ožiljkastom tkivu štakora**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i izrađen u Laboratoriju za mineralizirana tkiva, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dunje Rogić i suvoditeljstvom dr. sc. Tatjane Bordukalo Nikšić.

Zahvaljujem mentorima prof. dr. sc. Dunji Rogić i dr. sc. Tatjani Bordukalo Nikšić na pruženoj prilici, nesebičnoj podršci i strpljenju, te dr. sc. Veri Kufner na pomoći u izradi eksperimentalnog dijela rada.

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Zacjeljenje rana i fibroza.....	1
1.2. Izvanstanični matriks .....	2
1.3. Koštani morfogenetски proteini .....	2
1.4. Kolagen .....	4
1.5. Transformirajući faktor rasta beta .....	5
1.6. Dekorin .....	6
1.7. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu.....	7
2. Obrazloženje teme .....	9
3. Materijali i metode.....	10
3.1. Materijali.....	10
3.2. Metode .....	10
3.2.1. Protokol prije izolacije RNA.....	10
3.2.2. Izolacija RNA.....	11
3.2.3. Reverzna transkripcija.....	12
3.2.4. PCR u stvarnom vremenu .....	12
3.2.5. Obrada rezultata za PCR u stvarnom vremenu.....	13
3.2.6. Statistička obrada rezultata .....	14
4. Rezultati.....	15
5. Rasprava .....	21
6. Zaključak.....	23
7. Literatura .....	24
8. Sažetak.....	31
9. Summary .....	32
10. Popis kratica .....	33

# 1. Uvod

## 1.1. Zacjeljenje rana i fibroza

Koža je najveći organ u ljudskom tijelu. Čini učinkovitu barijeru između tijela i vanjskog okoliša te štiti tijelo od dehidracije i štetnih utjecaja iz okoliša. Koža se u osnovi sastoji od stanica (uglavnom fibroblasta, endotelnih stanica i keratinocita) i izvanstaničnog matriksa (engl. extracellular matrix, ECM). Kada dođe do ozljede kože, odmah počinje niz dinamičkih događaja. Zacjeljenje kožne rane može se podijeliti u niz preklapajućih faza, uključujući upalni odgovor, formiranje granulacijskog tkiva, što uključuje reepitelizaciju i angiogenezu, te remodeliranje matriksa (Li i sur., 2007). Prvi odgovor na ranu je suženje ozlijeđenih krvnih žila i aktivacija trombocita čime se stvara fibrinski ugrušak (Clark, 2003). Ugrušak fibrina zaustavlja protok krvi i osigurava podlogu za ulazne upalne stanice. Neutrofili se hvataju za ugrušak kao prva linija obrane od bakterija (Wilgus i sur., 2013). Monociti se aktiviraju unutar 48-96 sati nakon ozljede i transformiraju se u makrofage aktivirane tkivom na mjestu rane, što zaustavlja krvarenje i osigurava podlogu za pričvršćivanje i proliferaciju stanica. Ozljeđivanje ujedno predstavlja i početnu fazu upale, kada aktivacija kaskade koagulacije uzrokuje oslobađanje citokina koji stimuliraju kemotaksiju neutrofila praćenih makrofazima. Nakon 2-3 dana, upalni proces prelazi u proliferativnu fazu. Fibroblasti se privlače u ranu kako bi sintetizirali granulacijsko tkivo. Granulacijsko tkivo sastoji se od prokolagena, elastina, proteoglikana i hijaluronske kiseline (HA) i omogućuje urastanje novih krvnih žila koje osiguravaju prehranu i kisik rastućem tkivu i omogućuju leukocitima da dođu na mjesto rane. Keratinociti predstavljaju glavnu staničnu komponentu krajnje vanjske barijere za okoliš i služe za obnavljanje barijere funkcije kože. Nakon što je rana zatvorena, nezreli ožiljak može prijeći na završnu fazu remodeliranja u trajanju do godinu dana, ovisno o težini rane, koja se s vremenom postupno skuplja kako bi povratila svoj integritet (Schilling, 1976). Ponovno stečena čvrstoća vlakana u rani može se približiti najviše do 80% izvorne čvrstoće, ali nikada se neće postići stupanj koji je postojao u izvornom stanju. (Schilling, 1976). Fibroza je prekomjerno taloženje proteina izvanstaničnog matriksa u tkivima i predstavlja ujednačen odgovor tkiva na kroničnu ozljedu koja dovodi do stvaranja ožiljaka s naknadnim progresivnim gubitkom funkcije organa i poremećajem normalne arhitekture tkiva (Rockey i sur., 2015).

## 1.2. Izvanstanični matriks

Izvanstanični matriks je trodimenzionalna makromolekularna mreža sastavljena od kolagena, proteoglikana/glikozaminoglikana, elastina, fibronektina, laminina i drugih glikoproteina. Receptori smješteni na površini stanica prenose signale iz ECM-a u stanice, a ti signali reguliraju različite stanične funkcije (Theocharis i sur., 2016). ECM ima mnoge funkcije, uključujući određivanje strukture, organizacije i orijentacije stanica i tkiva; kontroliranje morfogeneze i staničnog metabolizma, sudjelovanje u staničnoj migraciji, proliferaciji, apoptozi, diferencijaciji i adheziji; a regulira i staničnu aktivnost i funkciju putem izravnog vezanja na integrine i druge stanične receptore (Grgurevic i sur., 2011). Proteini ECM poput fibronektina, kolagena, proteoglikana, heparina i heparin sulfata, vežu mnoge faktore rasta, kao što su faktori rasta fibroblasta (engl. Fibroblast growth factors, FGF), transformirajući faktor rasta  $\beta$  (engl. Transforming growth factor  $\beta$ , TGF $\beta$ ), vaskularni endotelni faktor rasta (engl. Vascular endothelial growth factor, VEGF), epidermalni faktor rasta (engl. Epidermal growth factor receptor, EGFR) i koštani morfogenetski proteini (engl. Bone morphogenetic proteins, BMPs) (Brizzi i sur., 2012). Razgradnja proteina ECM proteolitičkim enzimima kao odgovor na oštećenje tkiva može potaknuti lokalno oslobađanje ovih faktora rasta, čime se modulira proces cijeljenja rane (Brizzi i sur., 2012).

## 1.3. Koštani morfogenetski proteini

Koštani morfogenetski proteini (BMP) su glikoproteini u koje ubrajamo oko 20 različitih članova TGF $\beta$  nadobitelji, a djeluju u regulaciji embriogeneze i indukcije, održavanja i popravka kostiju i hrskavice (Carreira i sur., 2014). Za razliku od ostalih proteina iz te skupine, koštani morfogenetski protein 1 (BMP1), poznat kao prokolagen C-proteinaza (PCP) (Tabas i sur., 1991), ne pripada nadobitelji faktora rasta TGF- $\beta$  već obitelji BMP peptidaze M12A (Bai i sur., 2019), budući da ima svojstvo metalne proteinaze (matriks metaloproteinaze) koja cijepa karboksilni kraj prokolagena tipa I, II i III (Bai i sur., 2019). Kod pojave rana na koži, dermalni fibroblasti reagiraju aktivacijom TGF $\beta$ 1 te oslobađanjem topljivih prokolagena i prokolagen C-proteinaze (Fish i sur., 2007). Proteolitičko cijepanje C-terminalnog propeptida prokolagena tipova I, II i III od strane PCP-a na Gly-Asp i Arg-Asp mjestima daje kolagen, koji se podvrgava samosastavljanju u fibrile, nakon čega slijedi umrežavanje kako bi se dobio netopivi kolagenski matriks (Fish i sur., 2007). Ovo cijepanje je bitno za pravilno sklapanje netopivog kolagena unutar ECM-a i stvaranje ožiljaka (Vukicevic i sur., 2022). Proces umrežavanja prvenstveno je potaknut hidroksilacijom molekula kolagena bogatih prolinom posredovanom prolil

hidroksilazom (Fish i sur., 2007). Osim obrade prokolagena, PCP također može cijepati latentnu prolil oksidazu do njezinog aktivnog oblika i stoga može dodatno pridonijeti stvaranju ECM (Panchenko i sur., 1996). BMP1 također utječe na male proteoglikane bogate leucinom (dekorin), biglikan, laminin, kolagen VII, perlekan u bazalnoj membrani, BMP antagonist kordin i pro-lizil oksidaze, koje dodatno posreduju u umrežavanju kolagena (Uzel i sur., 2001).

Utvrđeno je da postoji šest izoformi BMP1 koje nastaju različitim izrezivanjem introna nakon transkripcije. Izoforme BMP1 su alternativno spojeni proizvodi gena *Bmp1*, te pretvaraju razne ECM prekursore u zrele funkcionalne proteine (Takahara i sur., 1994). Strukturno sadrže N-terminalnu prodomenu nakon čega slijedi katalitička domena proteaza, CUB (komponente C1r/C1s komplementa- protein morskog ježa Uegf-BMP1) i EGF (epidermalnom faktoru rasta slična) domena (Takahara i sur., 1994) (Slika 1). EGF i CUB domene su nekatalitičke te promoviraju protein-protein interakcije (Bordukalo-Nikšić & Kufner, 2021). Domena CUB1 sudjeluje u lučenju BMP1, dok je CUB2 domena zajedno s domenom proteaze važna za aktivnost C-proteinaze (Hartigan i sur., 2003). Osim BMP1 i mTLD, postoje dva genetski različita proteina nazvana TLL-1 (engl. tolloid like) i TLL-2 (Bordukalo-Nikšić & Kufner, 2021). Zajedno s BMP1 i mTLD pripadaju obitelji BMP1/TLD-sličnih proteaza sisavaca i dijele zajedničke strukture domene, ali se razlikuju u C-terminalnoj aminokiselinskoj sekvenci (Scott i sur., 1999, Bordukalo-Nikšić & Kufner, 2021).



Slika 1. Domenske strukture izoformi BMP1. (CUB - komponente C1r/C1s komplementa-

protein morskog ježa Uegf-BMP1, EGF - epidermalnom faktoru rasta slična domena). Preuzeto iz (Bordukalo-Nikšić & Kufner, 2021).

Izoforma BMP1-3 (također nazvana tolloid mTLD sisavaca) jedina je otkrivena kao topljivi protein u krvi zdravih osoba i pacijenata (Grgurevic i sur., 2011). Opća, ali još nedokazana hipoteza pretpostavlja da svaka izoforma BMP1 može modulirati fibrozne događaje u različitim organima (Cvjeticanin i sur., 2014). Na primjer, koristeći štakorski model kronične bubrežne bolesti (CKD), dokazani su profibrotski učinci BMP1-3 kroz povećanu ekspresiju i taloženje ECM-a, dok je terapijska primjena specifičnih poliklonskih antitijela (Ab) inhibirala aktivnost izoforme BMP1-3 u cirkulaciji i rezultirala je značajnim smanjenjem bubrežne fibroze, poboljšanjem funkcije bubrega i produljenim preživljenjem štakora (Grgurevic i sur., 2017).

#### 1.4. Kolagen

Najzastupljeniji proteini u ECM-u su kolageni odnosno velika obitelj trostrukih spiralnih proteina koji su sveprisutni u višestaničnim životinjama (Boot-Handford & Tuckwell, 2003). Svi članovi obitelji kolagena sastoje se od tri polipeptidna  $\alpha$  lanca koji su spojeni međulančanim vodikovim vezama. Postoji najmanje 28 različitih kolagena koji se javljaju u kralježnjacima (Myllyharju & Kivirikko, 2001). Imaju širok raspon funkcija, uključujući staničnu adheziju, migraciju stanica, morfogenezu, građu i obnavljanje tkiva. Kolageni su prisutni u dermisu kao fibrilarni proteini i ne samo da daju strukturnu potporu rezidentnim stanicama, već i reguliraju njihovu funkciju i funkciju upalnih stanica (Xue & Jackson, 2015). Kolagen tipa I je glavna komponenta izvanstaničnog matriksa i najzastupljeniji oblik kolagena u tijelu te najčešće mjerena kolagenska komponenta proteina ožiljaka (Seet i sur., 2017). Sastoji se od dva pro- $\alpha$ 1(I) lanca kao proizvod gena *Colla1* i jednog pro- $\alpha$ 2(I) kodiran genom *Colla2*. Gen *Colla1* nalazi se na 17. kromosomu (<https://medlineplus.gov/genetics/gene/colla1/>).

Fibroza, ili ožiljci nastali kao odgovor na ozljedu, obično se definira kao razvoj prekomjernog vlaknastog vezivnog tkiva. Budući da su kolageni glavni vlaknasti proteini koji se nalaze u vezivnom tkivu (Muiznieks & Keeley, 2013), mjerenje ili vizualizacija taloženja kolagena obično se koristi za procjenu fibroze u brojnim poremećajima funkcije srca (Lijnen i sur., 2012), jetre (Liu i sur., 2012) i bubrega (Farris & Colvin, 2012), kao i pri složenim multisistemskim bolestima poput skleroderme (Balbir-Gurman & Braun-Moscovici, 2012). Fibrilarne kolagene sintetiziraju stanice, osobito fibroblasti, kao prokolagene koji sadrže N- i C-propeptide na svakom kraju trostruke spiralne domene. Biosinteza kolagenskih proteina uključuje stvaranje kompleksa mRNA/ribosoma vezanih za endoplazmatski retikulum, u potpunosti u skladu s



normalnim sekretornim putem. Jednom u lumenu endoplazmatskog retikuluma, prokolagenski lanci podliježu hidroksilaciji prolina i lizina pomoću prolil-3-hidroksilaze, prolil-4-hidroksilaze i lizil hidroksilaza kodiranih s tri srodna gena (Walker i sur., 2005). Dodatno, neki hidroksilizinski nastavci podliježu glikozilaciji galaktozil transferazom i galaktozilhidroksilizil glukozil transferazom. Ova glikozilacija se razlikuje od O- i N-glikozilacije koja se događa na većini drugih proteina, i još je jedna jedinstvena posttranslacijska modifikacija prekursora kolagena (Heikkinen i sur., 2000). Trostruki spiralni prokolagen koji sadrži gore opisane modifikacije prolina i lizina se zatim izlučuje u izvanstaničnu okolinu, kao mali agregati trostrukih spiralnih jedinica prokolagena (Fleischmajer i sur., 1988). Jednom u izvanstaničnom okruženju, daljnje modifikacije kolagena u konačnici dovode do taloženja i umrežavanja potrebnih za normalno stvaranje izvanstaničnog matriksa (Trackman, 2005). Karakteristike normalnih ožiljaka proizlaze iz promjena u strukturi i sastavu ECM-a u dermisu. Najznačajnija razlika između normalnog tkiva i ožiljkastog tkiva je orijentacija fibroznog matriksa (Wolfram i sur., 2009). U glodavaca, normalno tkivo ima retikularni kolagenski uzorak, dok kolagen u ožiljkastom tkivu tvori velike paralelne snopove pod približno pravim kutom u odnosu na bazalnu membranu (Armour i sur., 2007). Kod ljudi, umjesto nasumične trodimenzionalne košaraste formacije kolagenih vlakana koja se nalaze u normalnom tkivu, u ožiljcima kolagen stvara poprečne veze kako bi se poravnao u jednom smjeru paralelno s kožom, suprotno od štakora (Ehrlich & Krummel, 1996). Osim toga, postoji veća gustoća kolagena i veća veličina vlakana u ožiljcima u usporedbi s normalnim tkivom (Wolfram i sur., 2009). Inhibiranjem enzima koji sudjeluju u post-translacijskoj modifikaciji smanjuje se proizvodnja i akumulacija kolagena, što neke od njih čini privlačnim metama za razvoj lijekova za liječenje fibroznih bolesti. Kolagen tipa I sintetizira se u obliku prokolagena, pri čemu se savija nakon enzimskog cijepanja koštanim morfogenetskim proteinom 1 (BMP1) na C-terminalnom kraju prokolagena (Grgurevic i sur., 2017). S obzirom na svoj profibrotični učinak BMP1 bi mogla biti ciljna molekula za razvoj lijekova koji umanjuju fibrozu.

### 1.5. Transformirajući faktor rasta beta

Transformirajući faktor rasta beta ( $TGF\beta$ ) je homodimerni protein od 25-kDa kodiran s tri različita gena ( $TGF\beta 1$ ,  $TGF\beta 2$  i  $TGF\beta 3$ ) identificirana u stanicama sisavaca (Roberts i sur., 1990). Proizvode ga brojne stanice unutar tijela, između ostalih, aktivirane T-stanice, makrofagi i neutrofili (Kehrl i sur., 1986), trombociti (Assoian i sur., 1983) i koštane stanice (Centrella & Canalis, 1985). Pokazalo se da je važan citokin u regulaciji različitih bioloških procesa uključujući angiogenezu, formiranje kostiju, kondrogenezu, hematopoezu, karcinogenezu i

produkciju granulacijskog tkiva (Chalmers, 2011). Većina stanica uključenih u cijeljenje rana izražava TGF $\beta$ 1, koji snažno potiče kemotaksiju fibroblasta do mjesta ozljede i igra ključnu ulogu u proliferaciji fibroblasta i proizvodnji ECM (Chen & Davidson, 2005). Ovaj faktor rasta inducira ekspresiju SMA (engl. smooth muscle actin) i potiče sintezu i zrelost kolagena I. Iako TGF $\beta$ 1 inducira ekspresiju matriks metaloproteinaze-2, -9 i -13 (engl. matrix metalloproteinase, MMPs) u fibroblastima, on zapravo smanjuje razgradnju kolagena inhibirajući ekspresiju MMP-1 i povećanje proizvodnje tkivnog inhibitora metaloproteinaze-1 (engl. tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP). Kako MMP-1 može razgraditi trostruku spiralu kolagena, bitan je čimbenik u migraciji fibroblasta što znači da prekomjerna ekspresija TGF $\beta$  u ožiljcima može utjecati na staničnu migraciju, razmnožavanje, a time i na stvaranje ožiljaka (Simon i sur., 2012), (Huang i sur., 2012). Postoje tri izoforme TGF $\beta$ , pri čemu TGF $\beta$ 1 i TGF $\beta$ 2 imaju profibrotička svojstva dok je TGF $\beta$ 3 antifibrotik (Huang i sur., 2012). Ožiljkasti fibroblasti imaju veći broj receptora faktora rasta i snažnije reagiraju na faktore rasta, kao što je TGF $\beta$  (Abdou i sur., 2011). Povećanje ili produljena aktivnost TGF $\beta$ 1 dovodi do prekomjerne proizvodnje i prekomjernog taloženja kolagena od strane fibroblasta što često rezultira hipertrofičnim ožiljcima (Chalmers, 2011). BMP signalizacija može ojačati signalizaciju TGF $\beta$ , kroz aktivaciju proteina arginin metiltransferaze 1 (PRMT1), koja zauzvrat metilira SMAD6/7, čime se omogućuje aktivacija SMAD1/3/5, i time potiče epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT) tijekom fibroze (Katsuno i sur., 2018). Budući da TGF $\beta$  doprinosi različitim aspektima normalnog cijeljenja rana, uključen je u patološke procese koji dovode do stvaranja abnormalnih ožiljaka. U modelu incizije kod odraslih štakora, dodavanje neutralizirajućeg protutijela za smanjenje razine TGF $\beta$ 1 i TGF $\beta$ 2 rezultiralo je smanjenim sadržajem kolagena, poboljšanom orijentacijom ECM-a u rani i manje ožiljaka u usporedbi s kontrolama (Shah i sur., 1992).

## 1.6. Dekorin

Dekorin je proteoglikan iz obitelji bogatih leucinom (engl. small leucine rich proteoglycans, SLRP), te igra značajnu ulogu u razvoju i građi tkiva, kao i izravnu i neizravnu signalnu ulogu (Reed & Iozzo, 2002). Proteoglikani utječu na fizičke karakteristike kože, sastav i strukturu kolagena, aktivnost faktora rasta i ponašanje stanica (Armour i sur., 2007). Proteoglikani u koži pridonose ukupnim mehaničkim svojstvima povezujući se s drugim proteinima izvanstaničnog matriksa, privlačeći vodu putem osmoze kako bi se ECM i rezidentne stanice održale hidratizirane i zadržavajući faktore rasta i citokine unutar ECM (Xue & Jackson, 2015). Prevladavajući proteoglikan u normalnoj koži je dekorin. Dekorin stupa u interakciju s

kolagenom i regulira kolagene fibrile i organizaciju snopa vlakana i ključan je za robusnu vlačnu čvrstoću kože jačanjem kolagenske mreže (Fleischmajer i sur., 1991). Dekorin inhibira proliferaciju fibroblasta i smanjuje proizvodnju TGF $\beta$ 1 i sintezu kolagena u fibroblastima hipertrofičnih ožiljaka (van der Veer i sur., 2009). Niske razine dekorina pronađene u hipertrofičnim ožiljcima stoga mogu objasniti njihovu nepravilnu organizaciju kolagena, kao i povećanu proizvodnju ECM (Xue & Jackson, 2015). Sniženi dekorin i TGF $\beta$ 3 u dubokom dermisu dovode do hipertrofičnih ožiljaka (Honardoust i sur., 2012).

### 1.7. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

Lančana reakcija polimeraze (engl. polymerase chain reaction, PCR) je enzimska metoda koja omogućava umnožavanje specifičnog DNA fragmenta promjenom temperature reakcijske smjese (Garibyan & Avashia, 2013). Osnovne komponente reakcijske smjese su: kalup DNA, par sintetskih oligonukleotidnih početnica, termostabilna Taq polimeraza, deoksiribonukleozid trifosfati (dNTPs), pufer, magnezijevi ioni i jednovalentni kationi (Green & Sambrook, 2019). Svaki ciklus reakcije sastoji se od denaturacije DNA lanaca temperaturom iznad 90 °C, vezanja početnica na 45-60 °C te ekstenzija na 55-70 °C u kojoj se započinje sinteza DNA na 3' krajevima vezanih početnica pomoću DNA polimeraze (Green & Sambrook, 2019). Ovaj proces, koji se ponavlja oko 25-35 puta, odvija se u termostatu, uređaju koji kontrolira vrijeme i temperaturu svakog koraka u ciklusu (Green & Sambrook, 2019). Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) koristi fluorescentne molekule za praćenje i kvantifikaciju proizvodnje produkata umnožavanja tijekom svakog ciklusa PCR reakcije (VanGuilder i sur., 2008). U reakcijsku smjesu je potrebno dodati agense koji interkaliraju u DNA (etidijev bromid ili SYBR® Green) ili DNA sonde s fluorescentnom bojom i prigušivačem (Arya i ostali, 2005). Dvije uobičajene metode koje se koriste za otkrivanje i kvantificiranje uključuju fluorescentne boje koje se nespecifično interkaliraju s dvolančanom DNA i DNA sonde specifične za sekvencu koje se sastoje od fluorescentno obilježenih molekula (Garibyan & Avashia, 2013). Interkalirajući agensi fluoresciraju kad su ugrađeni u dvolančanu DNA te je tada fluorescencija proporcionalna količini DNA u uzorku (Arya i sur., 2005). Kod upotrebe DNA sondi fluorescentna boja "reporter" (R) pričvršćena je na 5'-kraj sekvence sonde, dok je boja za "gašenje" (Q) na 3'-kraju. Kad je sonda netaknuta i fluorescentna boja je u neposrednoj blizini boje za gašenje, neće doći do fluorescencije zbog prijenosa energije između dvije boje (Butler, 2012). Taq DNA polimeraza ima 5'-egzonukleaznu aktivnost i stoga će razgraditi sondu na nukleotide te će se fluorescentna boja odvojiti od prigušivača i fluorescencija će biti vidljiva (Butler, 2012).

Reakcije su karakterizirane brojem reakcijskih ciklusa potrebnih da razina fluorescencije prijeđe unaprijed postavljen prag (treshold) (Arya i sur., 2005). Ova vrijednost se obično naziva ciklusom praga ( $C_t$ ) i što je veća količina DNA u početnom materijalu, brže će se pojaviti značajno povećanje fluorescentnog signala, što će rezultirati nižim  $C_t$  (Garibyan & Avashia, 2013). Vrijednosti se zatim normaliziraju s obzirom na referentni gen (Arya i ostali, 2005).

## 2. Obrazloženje teme

Ožiljci nastali nakon operativnog zahvata ili traume predstavljaju značajne funkcionalne i estetske smetnje kod ljudi (Chambers, 2020). U Sjedinjenim Američkim Državama korekcija ožiljaka iznosi oko 50 milijardi dolara zdravstvenih troškova svake godine, od čega opada na ožiljke od kirurških rezova i trauma gotovo 12 milijardi dolara i na ožiljke od opekline 7,5 milijardi dolara (Leavitt i sur., 2016). Osim toga, prisutnost ožiljaka može rezultirati znakovima mentalnih poremećaja s pridruženim simptomima depresije, ljutnje, anksioznosti i posttraumatskog stresa (Ngaage & Agius, 2018). Iako je dostupno nekoliko terapija za uspješnije zacjeljenje rana, one nisu potpuno učinkovite. Stoga postoji potreba za učinkovitijim terapijama za zacjeljenje rana. Hipoteza ovog rada je da protutijela na BMP 1-3 imaju povoljan učinak na zacjeljenje rana tako da djeluju na smanjenje ekspresije kolagena, TGF beta i povećanje ekspresije dekorina. Svrha ovog rada je ispitati učinak poliklonskih protutijela razvijenih na BMP1-3 na ekspresiju TGF $\beta$ -1, kolagena i dekorina u ožiljkastom tkivu *in vivo* koristeći različite koncentracije i načine primjene protutijela na eksperimentalnom modelu štakora.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Materijali

Izolacija mRNA:

- TRIzol (Ambion, SAD)
- Kloroform (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Izopropanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 75% etanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- DEPC-tretirana voda

Reverzna transkripcija:

- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems 4368814, Waltham, SAD)

RT-PCR:

- TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™ (cat. no. #RR820A, TaKaRa, Kusatsu, Japan)
- oligonukleotidne početnice specifične za pojedine gene (Tablica 2) (Invitrogen, SAD)

#### 3.2. Metode

##### 3.2.1. Protokol prije izolacije RNA

U prvomu su se pokusu koristile ženke Sprague Dawley soja štakora starosti oko 5 mjeseci i tjelesne mase 300 do 350 g, na kojima će se uspostaviti životinjski model koji imitira primarno cijeljenje rane. Lijeva strana dorzuma ostavljena je bez tretmana odnosno lokalno tretirana puferiranom fiziološkom otopinom (*eng. Phosphate-buffered saline, PBS*) u ukupnom volumenu od 1mL, dok je desna tretirana različitim dozama poliklonskog protutijela (polyAb) razvijenog na BMP1-3, proizvedenog u Laboratoriju za mineralizirana tkiva (LMT) Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Aplicirale su se doze 5, 15 i 50 µg/kg s.c. U zasebnoj grupi desna strana je tretirana rekombinantnim humanim BMP1 (rhBMP1) proteinom (1927-ZN, R&D Systems, SAD) u dozi od 5 µg/kg s.c. Injekcije su infiltrirane postoperativno 1.,2.,5.,7. i 14. dan. Na lijevoj, netretiranoj strani aplicirana je puferirana fiziološka otopina. U drugom protokolu štakorski model primarnog cijeljenja je tretiran sistemski, intravenski. Jedna grupa je tretirana BMP1-3 poliklonalnim protutijelom u dozi od 50 µg/kg i.v., a druga PBS-om i.v.

### 3.2.2. Izolacija RNA

Po završetku pokusa dio ekscidiranog ožiljka stavljen je u 1 mL TRIzol otopine za izolaciju RNA. Tako pripremljeni uzorci homogenizirani su pomoću mehaničkog homegenizatora, Ika T25. Uzorci se pohranjuju na  $-80^{\circ}\text{C}$  do početka izolacije. Vrste i broj skupina tretirane prema protokolu koji idu u daljnju izolaciju navedeni su u Tablici 1.

Tablica 1. Skupine uzoraka prema protokolima koji idu u daljnju izolaciju

	Protokol 1: štakorski model tretiran lokalno (s.c.)	Protokol 2: štakorski model tretiran sistemski (i.v.)
Skupina	1. PBS + BMP 1-3 polyAb 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 2. PBS + BMP 1-3 polyAb 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3. PBS + BMP 1-3 polyAb 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4. PBS + BMP 1-1 protein 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5. PBS 6. PBS + BMP 1-3 polyAb 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Homogenati se inkubiraju 5 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se osigurala potpuna disocijacija nukleoproteinskog kompleksa. U svaki homogenat doda se 200  $\mu\text{L}$  kloroforma, čvrsto se zatvore i 15 sekundi se dobro protresu rukom. Uzorci se inkubiraju 2-3 minute na sobnoj temperaturi, nakon čega se centrifugiraju 15 minuta na 12000 g pri  $4^{\circ}\text{C}$ . Centrifugiranjem se uzorak razdvaja u crvenu fenol-kloroformnu fazu na dnu, interfazu u sredini kao bijeli prsten i bezbojnu fazu na vrhu u kojoj se nalazi RNA. Vodena faza premješta se u novu epruvetu pazeći da se pritom ne pokupi interfaza ili donja faza i doda se 500  $\mu\text{L}$  izopropanola. Uzorci se miješaju laganim inverznim okretanjem i inkubiraju na sobnoj temperaturi 10 minuta nakon čega se centrifugiraju na 12000 g 10 minuta pri  $4^{\circ}\text{C}$ . Nakon centrifugiranja, vidljiv je bijeli talog RNA na dnu epruvete. Ukloni se supernatant iznad taloga te se talog ispiri s 1 mL 75% etanola. Uzorci se kratko pomiješaju na vibracijskoj miješalici kako bi se talog odvojio od stijenke i centrifugiraju na 7500 g 5 minuta pri  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant se ukloni pipetom i talog se kratko posuši na  $37^{\circ}\text{C}$ . Talog RNA se zatim otapa u 20-50  $\mu\text{L}$  (ovisno o njegovoj veličini) DEPC-tretirane vode. 2  $\mu\text{L}$  uzorka se razrijeđuje u 98  $\mu\text{L}$  DEPC-tretirane vode nakon čega se promiješaju i kratko centrifugiraju kako bi se spustili na dno epruvete. Mjeri se koncentracija i čistoća RNA na spektrofotometru kako bi se izračunao volumen uzorka za reverznu transkripciju. Uzorak se do reverzne transkripcije pohranjuje na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.3. Reverzna transkripcija

Izolirana RNA je prevedena u komplementarnu DNA (cDNA) pomoću kompleta za reverznu transkripciju High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Protokol je prilagođen transkripciji 1 µg RNA u 20 µL reakcijske smjese. Reakcija se radi u mikroepruветama za PCR. Radi se radna otopina iz kompleta za reverznu transkripciju koja za svaku mikroepruветu mora sadržavati 2 µL 10× RT buffera, 0,8 µL 25× dNTP (100 mM), 1 µL oligo dT primera, 1 µL MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/ µL) i 5,2 µL DEPC-tretirane vode. Doda se 10 µL radne otopine i 10 µL razrijeđene RNA u prethodnom koraku izolacije te se promiješa nastavkom pipete nekoliko puta. Program prevođenja RNA u cDNA izvodi se na PCR uređaju (ProFlex, Applied Biosystems, SAD) prema protokolu iz Tablice 2.

Tablica 2. Protokol reverzne transkripcije

Preikubacija	25 °C	10 minuta
Elongacija	37 °C	120 minuta
denaturacija enzima	85 °C	5 minuta
Hlađenje	4 °C	∞

Po završetku reakcije, mikroepruветe se centrifugiraju 1 minutu na 1600 rpm te se dobivena cDNA razrjeđuje TE puferom u omjeru 1:1. Polovicu tako razrijeđenog uzorka razrjeđuje se dodatno TE puferom u omjeru 1:5, te je tako dobivena otopina korištena za PCR u stvarnom vremenu. Do izvođenja daljnje reakcije, cDNA se pohranjuje na -20 °C.

### 3.2.4. PCR u stvarnom vremenu

Kvantitavni PCR u stvarnom vremenu proveden je pomoću reagensa TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™ II na uređaju LightCycler (Roche, Basel, Švicarska) prema protokolu prilagođenom ukupnom volumenu reakcijske smjese 10 µL. Reakcijska smjesa sadrži 1 µL cDNA dobivene reverznom transkripcijom te 5 µL SYBR premixa, 0,1 µL FOR primera, 0,1 µL REV primera i 3,8 µL DEPC-tretirane vode. 10 µL takve reakcijske smjese stavi se u kapilare, centrifugira na 800 rpm 10-20 sekundi te ih začepimo. Za svaki uzorak PCR je proveden u duplikatu. Kapilare se prenesu u LightCycler i pokrene se program. Kao referentni gen korišten je gen koji kodira β-aktin, a ispitivani su geni koji kodiraju: kolagen 1A1, transformirajući faktor rasta β-1 i dekorin. Slijed nukleotida početnica je naveden u tablici 3.



Tablica 3. Slijed nukleotida početnica za PCR u stvarnom vremenu. (F-forward, R-reverse)

Ispitivani gen	Nukleotidni slijed	Izvor
$\beta$ -aktin	F: GGCTGTATTCCCCTCCATCG R: CCCAGTTGGTAACAATGCCATGT	Wei et al. Gene 2020, 749:144703
Kolagen 1A1	F: CGGCTCCTGCTCCTCTTAG R: GGTTCACGTCCTCACCATT	Meroni et al. Neurobiology of Aging 2019, 82:48-59
Transformirajući faktor rasta $\beta$ -1	F: GAAGGACCTGGGTTGGAAGT R: CGGGTTGTGTTGGTTGTAGA	Meroni et al. Neurobiology of Aging 2019, 82:48-59
Dekorin	F: CCAAAGTTGATGCAGCCAGC R: GCCAGACTGCCATTTCCAC	Primer-BLAST alat za dizajniranje početnica ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a> )

### 3.2.5. Obrada rezultata za PCR u stvarnom vremenu

Izračunata je standardna devijacija (funkcija STDEV) od replikata svakog pojedinačnog gena (housekeeping gena i ostalih gena). Napravljena je normalizacija odnosno oduzme se  $C_t$  housekeeping gena od  $C_t$  ispitivanog gena prema formuli:

$$\Delta C_t = C_t (\text{gen}) - C_t (\beta\text{-aktin})$$

Zatim je izračunata  $\Delta\Delta C_t$  na sljedeći način:

$$\Delta\Delta C_t = \text{prosječni } \Delta C_t (\text{tretirana skupina}) - \text{prosječni } \Delta C_t (\text{kontrolna skupina})$$

( $\Delta\Delta C_t$  za kontrolnu skupinu iznosi 0)

Izračunata je standardna devijacija  $\Delta\Delta C_t$  za svaku eksperimentalnu skupinu prema formuli:

$$SD = \sqrt{SD (\beta - \text{aktin})^2 + SD (\text{gen od interesa})^2}$$

Izračunata je promjena odnosno „fold change“ koji nam služi kao podatak koji se poslije prikazuje grafički prema formuli:

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Za kontrolnu skupinu, fold change je 1 (jer je  $\Delta\Delta C_t$  za tu skupinu 0). Izračunata je gornja granicu pogreške (engl. upper level) prema izrazu:

$$UL = 2^{-\Delta\Delta C_t + SD}$$

### 3.2.6. Statistička obrada rezultata

Studentovim t-testom (funkcija TTEST, MS Excel) izračunata je značajnost razlike tako da se uspoređuju normalizirane vrijednosti razlike  $C_t$  gena i housekeeping gena između tretirane i kontrolne skupine. Rezultati su grafički prikazani kao stupići (engl. column graphs) gdje je na osi y fold change, a na osi x su geni. Prikaže se i stupanj promjene ekspresije (engl. fold change), a kao granice pogreške (engl. error bars) se uzme razlika:  $UL - \text{fold change}$ .

## 4. Rezultati

U Tablicama 4, 5 i 6 navedene su Ct vrijednosti dobivene RT-PCR-om za sve ispitivane gene svih tretiranih i netretiranih odnosno kontrolnih skupina. Vrijednosti stupnja promjene ekspresije (engl. fold change) i P-vrijednosti dobivene Studentovim t-testom navedene su u Tablici 7. Na Slikama 2, 3 i 4 grafički je prikazan stupanj promjene ekspresije kolagena 1A1, transformirajućeg faktora rasta  $\beta$  i dekorina u svim grupama između tretiranih i netretiranih skupina.

U grupi 1, tretiranoj subkutano BMP1-3 polyAb u koncentraciji 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , ekspresija gena Col1A1, TGF $\beta$  i dekorina, uz  $\beta$ -aktin kao referentni gen, povećana je u odnosu na kontrolne skupine ali promjena nije statistički značajna. Za grupu 2 tretiranu BMP1-3 polyAb u koncentraciji 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nema promjene ekspresije za Col1A1 i TGF $\beta$ , a ekspresija dekorina je smanjena u odnosu na kontrolnu skupinu, ali ta promjena nije statistički značajna. Grupa 3 tretirana je BMP1-3 polyAb u koncentraciji 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  te je ekspresija Col1A1 povećana u odnosu na kontrolnu skupinu, ali ne statistički značajno. Grupe 1, 2 i 3, unatoč tretiranju s različitim koncentracijama BMP1-3 polyAb, nisu pokazale značajnu razliku ekspresije između skupina tretiranih različitim dozama antitijela.

Za grupu 4, tretiranu BMP1-3 proteinom subkutano u koncentraciji 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , uz  $\beta$ -aktin kao referentni gen, ekspresija tretirane strane nije statistički značajno promijenjena u odnosu na kontrolnu.

Grupa 5 (tretirana PBSom) služi kao kontrola grupi 6, tretiranoj intravenski BMP1-3 polyAb u koncentraciji 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Ekspresija za Col1A1, TGF $\beta$  i dekorin, uz  $\beta$ -aktin kao referentni gen, povećana je u odnosu na kontrolnu skupinu, ali nema statistički značajne promjene.

Tablica 4. Ct vrijednosti dobivene RT-PCR-om. Brojevi od 1-30 označavaju broj uzorka, a slova L i D označavaju lijevu i desnu stranu dorzuma štakora. Lijeva strana je netretirana, aplicirana je puferirana fiziološka otopina i služi kao kontrola, dok je desna strana tretirana subkutano BMP1-3 polyAb u koncentracijama 5, 15 i 50 µg/kg.

tretman	uzorak	Ct ( $\beta$ -actin)	Ct ( <i>Col1A1</i> )	Ct ( <i>TGF<math>\beta</math></i> )	Ct ( <i>decorin</i> )
BMP1-3 polyAb 5 µg/kg s.c.	1D	19,51	26,03	30,22	24,28
	2D	18,63	28,11	31,47	23,13
	3D	19,17	25,90	29,73	24,66
	4D	19,02	25,75	30,32	23,69
	5D	19,09	24,72	30,59	22,64
	6D	20,62	29,94	30,94	25,63
	7D	19,50	25,32	29,79	23,00
	8D	19,76	23,93	28,32	24,56
	9D	18,32	24,60	30,91	22,82
	10D	19,66	28,93	30,45	24,02
	1L	18,57	25,19	30,58	22,60
	2L	17,71	26,05	30,02	22,41
	3L	20,01	25,65	31,11	25,28
	4L	18,49	25,16	30,74	23,20
	5L	17,78	24,85	30,61	22,64
	6L	20,85	26,25	29,69	25,96
	7L	19,59	26,04	30,65	23,49
	8L	18,82	28,63	30,51	24,28
	9L	20,38	28,43	29,72	25,02
	10L	18,89	28,80	30,49	23,61
BMP1-3 polyAb 15 µg/kg s.c.	11D	20,05	29,94	31,32	24,57
	12D	20,04	28,95	29,94	25,21
	13D	18,49	27,20	29,92	23,61
	14D	19,17	27,91	29,90	24,10
	15D	21,65	30,48	30,34	25,93
	16D	20,03	28,44	30,48	23,59
	17D	18,68	26,66	29,79	22,93
	18D	19,25	27,53	30,42	23,45
	19D	19,84	27,36	29,95	24,71
	20D	20,45	27,44	30,21	24,94
	11L	19,52	26,02	30,91	23,50
	12L	18,51	27,45	29,75	24,24
	13L	19,95	27,09	29,83	24,79
	14L	20,77	29,78	30,47	25,13
	15L	21,06	30,44	30,07	22,69
	16L	19,12	27,36	29,62	22,55
	17L	21,29	30,09	30,06	24,22
	18L	20,27	28,70	31,07	24,24

	19L	19,87	29,98	30,73	24,42
	20L	18,91	27,21	30,00	23,72
BMP1-3 polyAb 50 µg/kg s.c.	21D	18,97	28,94	30,79	23,62
	22D	19,86	29,99	30,63	26,49
	23D	18,43	32,71	31,72	23,47
	25D	18,04	27,20	30,78	22,9
	26D	18,03	28,25	31,52	22,73
	28D	20,89	35,57	31,83	30,86
	29D	18,75	27,30	30,68	23,82
	30D	19,48	26,56	29,72	24,99
	21L	18,83	30,36	31,05	22,89
	22L	18,74	28,89	30,73	24,43
	23L	19,13	33,75	31,32	23,98
	25L	18,64	30,08	30,52	24,62
	26L	19,00	26,77	29,64	24,65
	28L	18,61	30,15	30,87	24,93
	29L	19,02	31,22	32,45	25,67
		30L	17,75	29,85	30,02

Tablica 5. Ct vrijednosti dobivene RT-PCR-om. Brojevi od 31-40 označavaju broj uzorka, a slova L i D označavaju lijevu i desnu stranu dorzuma štakora. Lijeva strana je netretirana, aplicirana je puferirana fiziološka otopina i služi kao kontrola, dok je desna strana tretirana subkutano BMP1-3 proteinom u koncentraciji 5 µg/kg.

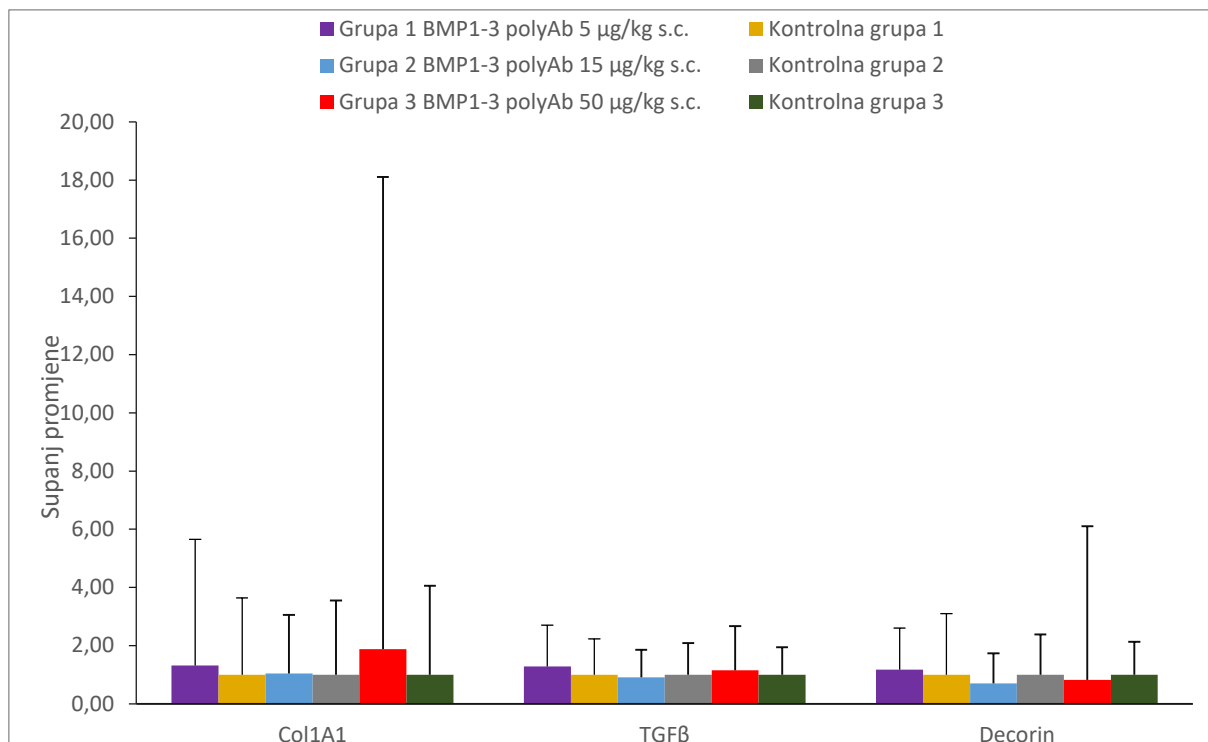
tretman	uzorak	Ct ( $\beta$ -actin)	Ct ( <i>Col1A1</i> )	Ct ( <i>TGF<math>\beta</math></i> )	Ct ( <i>decorin</i> )
BMP1-3 protein 5 µg/kg s.c.	31D	18,72	26,68	30,68	22,97
	32D	18,57	26,29	29,8	22,78
	33D	18,87	26,21	30,88	22,86
	34D	18,86	28,95	31,76	23,54
	36D	18,61	23,96	28,84	22,83
	37D	18,51	24,61	30,06	20,78
	38D	18,52	29,16	30,50	22,83
	39D	18,28	25,53	30,62	22,06
	40D	18,21	24,78	30,14	19,82
	31L	18,93	26,51	30,07	23,19
	32L	18,82	29,31	31,72	23,12
	33L	18,53	26,97	30,52	22,85
	34L	18,32	26,57	30,05	22,85
	36L	19,02	28,07	30,57	22,87
	37L	18,67	26,73	30,87	23,04
	38L	18,60	27,81	30,59	22,95
	39L	18,66	23,12	29,81	21,12
	40L	19,99	25,07	30,43	21,80

Tablica 6. Ct vrijednosti dobivene RT-PCR-om. Brojevi od 41-60 označavaju broj uzorka, a slovo D označava desnu stranu dorzuma štakora. Uzorci od 41-60 su netretirani, aplicirana je puferirana fiziološka otopina i služe kao kontrola, dok su uzorci od 51-60 tretirani intravenozno s BMP1-3 polyAb u koncentraciji 50 µg/kg.

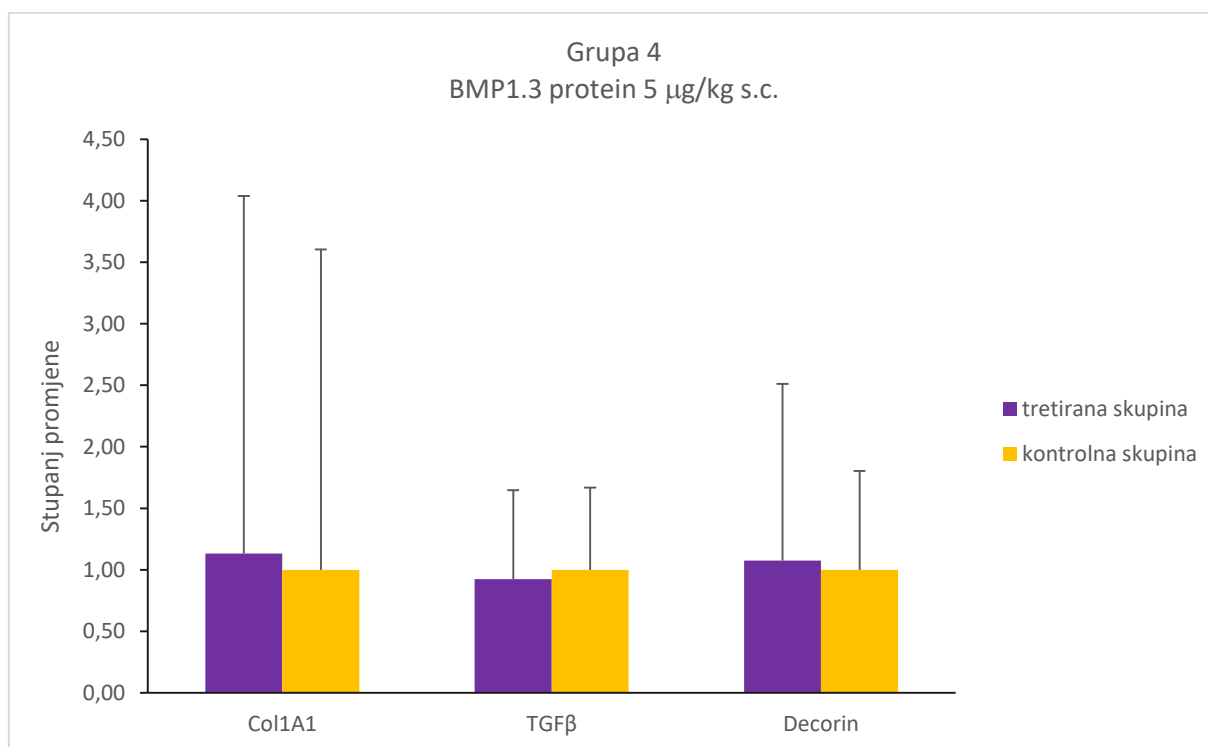
tretman	uzorak	Ct ( $\beta$ -actin)	Ct ( <i>Col1A1</i> )	Ct ( <i>TGF<math>\beta</math></i> )	Ct ( <i>decorin</i> )
PBS i.v.	41D	18,49	21,87	28,89	19,51
	42D	18,25	26,13	29,07	20,75
	43D	18,22	22,80	27,68	20,92
	44D	18,05	22,07	29,04	18,62
	45D	17,59	23,06	29,79	18,83
	46D	18,68	26,55	28,94	21,03
	47D	19,10	25,27	28,84	20,60
	48D	17,94	22,49	29,50	19,18
	50D	18,24	26,53	29,33	21,04
BMP1-3 polyAb 50 µg/kg i.v.	51D	18,59	22,90	27,75	21,02
	52D	18,44	23,23	29,61	19,03
	53D	18,54	21,72	28,66	19,61
	54D	18,43	25,46	28,99	21,27
	55D	18,01	24,87	29,50	20,74
	57D	18,48	27,13	28,61	20,88
	58D	17,65	23,62	29,25	19,96
	59D	18,12	21,66	28,11	20,41
	60D	18,76	21,44	27,85	20,63

Tablica 7. Vrijednosti stupnja promjene ekspresije i P-vrijednosti dobivene Studentovim t-testom usporedbom normaliziranih vrijednosti tretiranih skupina i normaliziranih vrijednosti kontrolnih skupina uz  $\beta$ -aktin kao referentni gen.

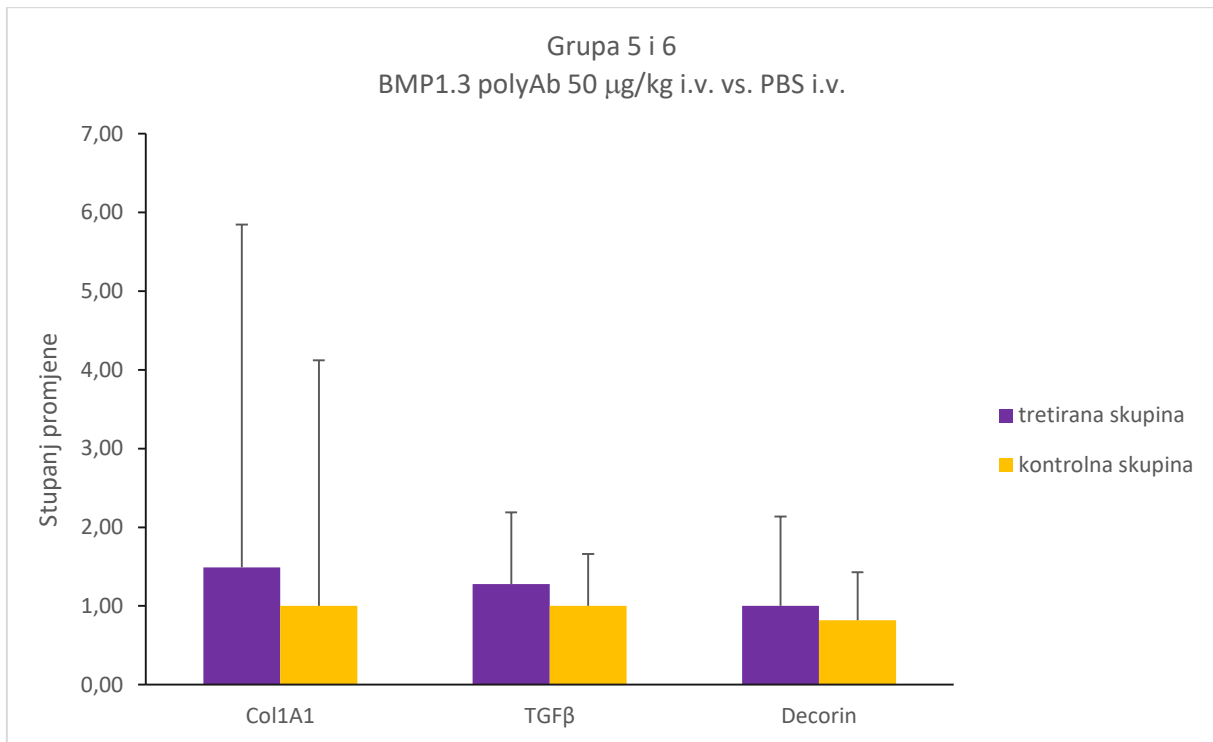
		<i>Col1A1</i>	<i>TGF<math>\beta</math></i>	<i>Decorin</i>
BMP1-3 polyAb 5 µg/kg s.c.	Stupanj promjene	1,32	1,28	1,17
	P-vrijednost	0,6174	0,5342	0,2184
BMP1-3 polyAb 15 µg/kg s.c.	Stupanj promjene	1,04	0,91	0,7
	P-vrijednost	0,9105	0,7262	0,1052
BMP1-3 polyAb 50 µg/kg s.c.	Stupanj promjene	1,88	1,15	0,82
	P-vrijednost	0,3911	0,7354	0,6458
BMP1-3 protein 5 µg/kg s.c.	Stupanj promjene	1,13	0,92	1,07
	P-vrijednost	0,8212	0,7700	0,7373
BMP1-3 polyAb 50 µg/kg i.v.	Stupanj promjene	1,49	1,28	0,82
	P-vrijednost	0,5353	0,4099	0,4486



Slika 2. Promjena ekspresije kolagena 1A1, transformirajućeg faktora rasta  $\beta$  i dekorina u grupi 1, 2 i 3 tretirane subkutano BMP1-3 polyAb u koncentracijama 5, 15 i 50 mg/kg uz  $\beta$ -aktin kao referentni gen. Crte iznad stupca označavaju gornju granicu moguće pogreške pogreške rezultata (engl. upper limit).



Slika 3. Promjena ekspresije kolagena 1A1, transformirajućeg faktora rasta  $\beta$  i dekorina u grupi 4 tretiranoj subkutano BMP1-3 proteinom u koncentraciji 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  uz  $\beta$ -aktin kao referentni gen. Crte iznad stupca označavaju gornju granicu moguće pogreške pogreške rezultata (engl. upper limit).



Slika 4. Promjena ekspresije kolagena 1A1, transformirajućeg faktora rasta  $\beta$  i dekorina u grupi 5 i 6 tretiranoj intravenski BMP1-3 polyAb u koncentraciji 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i PBSom uz  $\beta$ -aktin kao referentni gen. Crte iznad stupca označavaju gornju granicu moguće pogreške pogreške rezultata (engl. upper limit).



## 5. Rasprava

Istraživanje je provedeno u 6 grupa laboratorijskih štakora uz 10 životinja po grupi. U cijelom modelu istraživanja primaran cilj bio je pokazati učinak BMP1-3 protutijela na proces primarnog cijeljenja rane i formiranja ožiljka u štakora te ispitati njegovu terapijsku primjenu u svrhu nastanka funkcionalno i estetski prihvatljivog ožiljka.

S obzirom na dostupnu literaturu u kojoj su razmatrani učinci BMP1-3 polyAb na gensku ekspresiju kolagena, TGF $\beta$  i dekorina, očekivana je snižena ekspresija kolagena i TGF $\beta$  i povišena ekspresija dekorina u grupama tretiranim protutijelom čime bi se ostvario antifibrotički učinak. Sličan povoljan učinak pokazan je u kroničnoj bubrežnoj bolesti (CKD) gdje je genska ekspresija dekorina bila jako povišena nakon tretmanom BMP1-3 polyAb, dok je ekspresija kolagena i TGF $\beta$  bila snižena (Grgurevic i sur., 2011).

Na razini genske ekspresije, usporedbom rezultata dobivenih za grupe kojima je dodan BMP1-3 polyAb subkutano u koncentraciji 5, 15 i 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , nisu dobivene statistički značajne p-vrijednosti što znači da nije pokazana razlika u ekspresiji između tretiranih i kontrolnih skupina u svakoj grupi. Razlika u genskoj ekspresiji nije pokazana ni između grupa tretiranih različitim dozama antitijela. Moguće objašnjenje ovog rezultata je značajniji učinak BMP1-3 polyAb na posttranslacijske modifikacije u odnosu na gensku ekspresiju kolagena, TGF $\beta$  i dekorina. U slučaju kolagena, BMP1-3 djeluje na posttranslacijsku hidroksilaciju prolinskih ostataka kataliziranu prolil-4-hidroksilazom (P4H) i izvanstanično cijepanje C-terminalnog kraja prokolagena što inhibira sintezu kolagena i prekomjerno taloženje kolagena na mjestima tkiva (Reid i sur., 2006).

U grupi tretiranoj BMP1-3 proteinom subkutano u koncentraciji 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  povećana je ekspresija kolagena u tretiranoj skupini u odnosu na kontrolnu ali s obzirom na velike standardne devijacije i dobivene p-vrijednosti, razlike nisu statistički značajne iako je očekivan profibrotični učinak BMP1-3 proteina u tretiranoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu. Profibrotični učinak rekombinantnog BMP1-3 proteina pokazan je na životinjskom modelu infarkta miokarda, povišenom ekspresijom kolagena (Vukicevic i sur., 2022). Moguće objašnjenje je da BMP1-3 u toj koncentraciji ne može ostvariti značajnu razliku u ekspresiji kolagena, TGF $\beta$  i dekorina.

Zadnja je grupa tretirana sistemski, intravenskim doziranjem BMP1-3 polyAb u koncentraciji 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  te je ekspresija za kolagen, TGF $\beta$  i dekorin povećana u odnosu na kontrolnu skupinu, ali nema statistički značajne promjene. Za ovu eksperimentalnu skupinu to je bio očekivan

rezultat s obzirom na način primjene protutijela. Intravenskom primjenom BMP1-3 polyAb ne ostvaruje se lokalni učinak na ožiljkasto tkivo te takvom primjenom nije ostvaren antifibrotički učinak.

Ovi rezultati ukazuju na to da BMP1-3, kao i njegovo protutijelo, može imati mnogobrojne funkcije u regulaciji formiranja ekstracelularnog matriksa koje bi trebalo dodatno istražiti. Ovim rezultatima ne može se potvrditi hipoteza da lokalna i sustavna primjena neutralizirajućeg protutijela na BMP1-3 molekulu djeluje na gensku ekspresiju na način da smanjuje ekspresiju mRNA za Col1A1 i TGF $\beta$ , a povećava ekspresiju dekorina u usporedbi s kontrolnom netretiranom skupinom i skupinom tretiranom s BMP1-3 proteinom. Unatoč tome, potrebno je uzeti u obzir rezultate dobivene histološkom analizom, a što slijedi u nastavku ovog istraživanja, te na taj način interpretirati potencijalnu važnost primjene BMP1-3 polyAb na smanjenje veličine kožnog ožiljka u štakora.

## 6. Zaključak

1. BMP1-3 polyAb apliciran subkutano u koncentraciji 5, 15 i 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nema statistički značajan učinak na ekspresiju CollA1, TGF $\beta$  i dekorina u odnosu na kontrolnu skupinu.
2. Primjenom BMP1-3 proteina subkutano u koncentraciji 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nije uočena statistički značajna promjena ekspresije CollA1, TGF $\beta$  i dekorina u odnosu na kontrolnu skupinu kao ni intravenskom primjenom BMP1-3 polyAb u dozi 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .
3. Moguće je da BMP1-3 polyAb pokazuje značajniji učinak na posttranslacijsku modifikaciju u odnosu na gensku ekspresiju kolagena, TGF $\beta$  i dekorina.
4. Potrebna su daljnja istraživanja usmjerena na inhibiciju cirkulirajućeg BMP1-3, koji bi mogao postati nova terapijska meta u regenerativnoj medicini.

## 7. Literatura

Abdou, A. G., Maraee, A. H., Al-Bara, A. M., & Diab, W. M. Immunohistochemical expression of TGF- $\beta$ 1 in keloids and hypertrophic scars. *The American Journal of Dermatopathology*, 2011, 33(1), 84–91.

Armour, A., Scott, P. G., & Tredget, E. E. Cellular and molecular pathology of HTS: Basis for treatment. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 2007, 15 Suppl 1, S6-17.

Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. H. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2005, 5(2), 209–219.

Assoian, R. K., Komoriya, A., Meyers, C. A., Miller, D. M., & Sporn, M. B. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258(11), 7155–7160.

Bai, M., Lei, J., Wang, S., Ding, D., Yu, X., Guo, Y., Chen, S., Du, Y., Li, D., Zhang, Y., Huang, S., Jia, Z., & Zhang, A. BMP1 inhibitor UK383,367 attenuates renal fibrosis and inflammation in CKD. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 2019, 317(6), F1430–F1438.

Balbir-Gurman, A., & Braun-Moscovici, Y. Scleroderma—New aspects in pathogenesis and treatment. *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*, 2012, 26(1), 13–24.

Bodrukalo-Nikšić, T., & Kufner, V. BMP1.3 protein as potential target in treatment of fibrosis. *Rad Hrvatske Akademije Znanosti i Umjetnosti. Medicinske Znanosti*, 2021, 548(56–57), 56–69.

Boot-Handford, R. P., & Tuckwell, D. S. Fibrillar collagen: The key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 2003, 25(2), 142–151.

Brizzi, M. F., Tarone, G., & Defilippi, P. Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Current Opinion in Cell Biology*, 2012, 24(5), 645–651.

Butler, J. M. DNA Quantitation. U J. M. Butler (Ur.), *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, Academic Press, 2012, str. 49–67.

Centrella, M., & Canalis, E. Transforming and nontransforming growth factors are present in medium conditioned by fetal rat calvariae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, 82(21), 7335–7339.

Chalmers, R. L. The evidence for the role of transforming growth factor-beta in the formation of abnormal scarring. *International Wound Journal*, 2011, 8(3), 218–223.

Chambers, A. Management of Scarring Following Aesthetic Surgery. U L. Téot, T. A. Mustoe, E. Middelkoop, & G. G. Gauglitz (Ur.), *Textbook on Scar Management: State of the Art Management and Emerging Technologies*, Springer International Publishing, 2020, (str. 385–395).

Chen, M. A., & Davidson, T. M. Scar management: Prevention and treatment strategies. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 2005, 13(4), 242–247.

Clark, R. A. F. Fibrin is a many splendored thing. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2003, 121(5), xxi–xxii.

COL1A1 gene: MedlinePlus Genetics. 2022, <https://medlineplus.gov/genetics/gene/col1a1/>, pristupljeno 23. 05. 2022.

Cvjeticanin, B., Prutki, M., Dumic-Cule, I., Veir, Z., Grgurevic, L., & Vukicevic, S. Possible target for preventing fibrotic scar formation following acute myocardial infarction. *Medical Hypotheses*, 2014, 83(6), 656–658.

Ehrlich, H. P., & Krummel, T. M. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 1996, 4(2), 203–210.

Farris, A. B., & Colvin, R. B. Renal interstitial fibrosis: Mechanisms and evaluation. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2012, 21(3), 289–300.

Fish, P. V., Allan, G. A., Bailey, S., Blagg, J., Butt, R., Collis, M. G., Greiling, D., James, K., Kendall, J., McElroy, A., McCleverty, D., Reed, C., Webster, R., & Whitlock, G. A. Potent and selective nonpeptidic inhibitors of procollagen C-proteinase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2007, 50(15), 3442–3456.

Fleischmajer, R., Fisher, L. W., MacDonald, E. D., Jacobs, L., Perlish, J. S., & Termine, J. D. Decorin interacts with fibrillar collagen of embryonic and adult human skin. *Journal of Structural Biology*, 1991, 106(1), 82–90.

Fleischmajer, R., Perlish, J. S., Timpl, R., & Olsen, B. R. Procollagen intermediates during tendon fibrillogenesis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 1988, 36(11), 1425–1432.

Garibyan, L., & Avashia, N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of investigative dermatology*, 2013, 133(3), e6.

Green, M. R., & Sambrook, J. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(6), pdb.top095109.

Grgurevic, L., Erjavec, I., Grgurevic, I., Dumic-Cule, I., Brkljacic, J., Verbanac, D., Matijasic, M., Paljetak, H. C., Novak, R., Plecko, M., Bubic-Spoljar, J., Rogic, D., Kufner, V., Pauk, M., Bordukalo-Niksic, T., & Vukicevic, S. Systemic inhibition of BMP1-3 decreases progression of CCl4-induced liver fibrosis in rats. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, 2017, 35(6), 201–215.

Grgurevic, L., Macek, B., Healy, D. R., Brault, A. L., Erjavec, I., Cipicic, A., Grgurevic, I., Rogic, D., Galesic, K., Brkljacic, J., Stern-Padovan, R., Paralkar, V. M., & Vukicevic, S. Circulating bone morphogenetic protein 1-3 isoform increases renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 2011, 22(4), 681–692.

Hartigan, N., Garrigue-Antar, L., & Kadler, K. E. Bone Morphogenetic Protein-1 (BMP-1): Identification of the minimal domain structure for procollagen c-proteinase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(20), 18045–18049.

Heikkinen, J., Risteli, M., Wang, C., Latvala, J., Rossi, M., Valtavaara, M., & Myllylä, R. Lysyl hydroxylase 3 is a multifunctional protein possessing collagen glucosyltransferase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(46), 36158–36163.

Honardoust, D., Varkey, M., Marcoux, Y., Shankowsky, H. A., & Tredget, E. E. Reduced decorin, fibromodulin, and transforming growth factor- $\beta$ 3 in deep dermis leads to hypertrophic scarring. *Journal of Burn Care & Research: Official Publication of the American Burn Association*, 2012, 33(2), 218–227.

Huang, C., Akaishi, S., & Ogawa, R. Mechanosignaling pathways in cutaneous scarring. *Archives of Dermatological Research*, 2012, 304(8), 589–597.

Katsuno, Y., Qin, J., Oses-Prieto, J., Wang, H., Jackson-Weaver, O., Zhang, T., Lamouille, S., Wu, J., Burlingame, A., Xu, J., & Derynck, R. Arginine methylation of SMAD7 by PRMT1 in

TGF- $\beta$ -induced epithelial–mesenchymal transition and epithelial stem-cell generation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(34), 13059–13072.

Kehrl, J. H., Wakefield, L. M., Roberts, A. B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M. B., & Fauci, A. S. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *The Journal of Experimental Medicine*, 1986, 163(5), 1037–1050.

Leavitt, T., Hu, M. S., Marshall, C. D., Barnes, L. A., Lorenz, H. P., & Longaker, M. T. Scarless Wound Healing: Finding the Right Cells and Signals. *Cell and tissue research*, 2016, 365(3), 483–493.

Li, J., Chen, J., & Kirsner, R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, 2007, 25(1), 9–18.

Lijnen, P. J., Maharani, T., Finahari, N., & Prihadi, J. S. Serum collagen markers and heart failure. *Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets*, 2012, 12(1), 51–55.

Liu, T., Wang, X., Karsdal, M. A., Leeming, D. J., & Genovese, F. Molecular Serum Markers of Liver Fibrosis. *Biomarker Insights*, 2012, 7, 105–117.

Muiznieks, L. D., & Keeley, F. W. Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2013, 1832(7), 866–875.

Myllyharju, J., & Kivirikko, K. I. Collagens and collagen-related diseases. *Annals of Medicine*, 2001, 33(1), 7–21.

Ngaage, M., & Agius, M. The Psychology of Scars: A Mini-Review. *Psychiatria Danubina*, 2018, 30(Suppl 7), 633–638.

Panchenko, M. V., Stetler-Stevenson, W. G., Trubetskoy, O. V., Gacheru, S. N., & Kagan, H. M. Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolysinase. Potential role of procollagen C-proteinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(12), 7113–7119.

Reed, C. C., & Iozzo, R. V. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconjugate Journal*, 2002, 19(4–5), 249–255.

- Reid, R. R., Mogford, J. E., Butt, R., deGiorgio-Miller, A., & Mustoe, T. A. Inhibition of procollagen C-proteinase reduces scar hypertrophy in a rabbit model of cutaneous scarring. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 2006, 14(2), 138–141.
- Roberts, A. B., Heine, U. I., Flanders, K. C., & Sporn, M. B. Transforming growth factor-beta. Major role in regulation of extracellular matrix. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1990, 580, 225–232.
- Rockey, D. C., Bell, P. D., & Hill, J. A. Fibrosis—A common pathway to organ injury and failure. *The New England Journal of Medicine*, 2015, 372(12), 1138–1149.
- Schilling, J. A. Wound healing. *The Surgical Clinics of North America*, 1976, 56(4), 859–874.
- Scott, I. C., Blitz, I. L., Pappano, W. N., Imamura, Y., Clark, T. G., Steiglitiz, B. M., Thomas, C. L., Maas, S. A., Takahara, K., Cho, K. W., & Greenspan, D. S. Mammalian BMP-1/Tolloid-related metalloproteinases, including novel family member mammalian Tolloid-like 2, have differential enzymatic activities and distributions of expression relevant to patterning and skeletogenesis. *Developmental Biology*, 1999, 213(2), 283–300.
- Seet, L.-F., Toh, L. Z., Chu, S. W. L., Finger, S. N., Chua, J. L. L., & Wong, T. T. Upregulation of distinct collagen transcripts in post-surgery scar tissue: A study of conjunctival fibrosis. *Disease Models & Mechanisms*, 2017, 10(6), 751–760.
- Shah, M., Foreman, D. M., & Ferguson, M. W. Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor beta. *Lancet (London, England)*, 1992, 339(8787), 213–214.
- Simon, F., Bergeron, D., Larochelle, S., Lopez-Vallé, C. A., Genest, H., Armour, A., & Moulin, V. J. Enhanced secretion of TIMP-1 by human hypertrophic scar keratinocytes could contribute to fibrosis. *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries*, 2012, 38(3), 421–427.
- Tabas, J. A., Zasloff, M., Wasmuth, J. J., Emanuel, B. S., Altherr, M. R., McPherson, J. D., Wozney, J. M., & Kaplan, F. S. Bone morphogenetic protein: Chromosomal localization of human genes for BMP1, BMP2A, and BMP3. *Genomics*, 1991, 9(2), 283–289.
- Takahara, K., Lyons, G. E., & Greenspan, D. S. Bone morphogenetic protein-1 and a mammalian tolloid homologue (mTld) are encoded by alternatively spliced transcripts which



are differentially expressed in some tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(51), 32572–32578.

Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., & Karamanos, N. K. Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 97, 4–27.

Trackman, P. C. Diverse Biological Functions of Extracellular Collagen Processing Enzymes. *Journal of cellular biochemistry*, 2005, 96(5), 927–937.

Uzel, M. I., Scott, I. C., Babakhanlou-Chase, H., Palamakumbura, A. H., Pappano, W. N., Hong, H. H., Greenspan, D. S., & Trackman, P. C. Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(25), 22537–22543.

van der Veer, W. M., Bloemen, M. C. T., Ulrich, M. M. W., Molema, G., van Zuijlen, P. P., Middelkoop, E., & Niessen, F. B. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation. *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries*, 2009, 35(1), 15–29.

VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, 2008, 44(5), 619–626.

Vukicevic, S., Colliva, A., Kufner, V., Martinelli, V., Moimas, S., Vodret, S., Rumenovic, V., Milosevic, M., Brkljacic, B., Delic-Brkljacic, D., Correa, R., Giacca, M., Maglione, M., Bordukalo-Niksic, T., Dumic-Cule, I., & Zacchigna, S. Bone morphogenetic protein 1.3 inhibition decreases scar formation and supports cardiomyocyte survival after myocardial infarction. *Nature Communications*, 2022, 13(1), 81.

Walker, L. C., Overstreet, M. A., & Yeowell, H. N. Tissue-specific expression and regulation of the alternatively-spliced forms of lysyl hydroxylase 2 (LH2) in human kidney cells and skin fibroblasts. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 2005, 23(8), 515–523.

Wilgus, T. A., Roy, S., & McDaniel, J. C. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Advances in Wound Care*, 2013, 2(7), 379–388.

Wolfram, D., Tzankov, A., Pülzl, P., & Piza-Katzer, H. Hypertrophic scars and keloids—A review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management. *Dermatologic*

*Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery*, 2009, 35(2), 171–181.

Xue, M., & Jackson, C. J. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Advances in Wound Care*, 2015, 4(3), 119–136.

## 8. Sažetak

Uvod: BMP1-3 ostvaruje profibrotični učinak kroz povećanu ekspresiju i taloženje ECM-a, što može rezultirati estetski vidljivim ožiljkom. Smatra se da je za profibrotični učinak BMP1-3 dijelom odgovorno pridruženo smanjenje ekspresije dekorina, te povećana ekspresija Col1A1 i TGF $\beta$ . Ovaj rad ispituje učinak poliklonskih protutijela razvijenih na BMP1-3 na ekspresiju Col1A1, TGF $\beta$ -1 i dekorina u ožiljkastom tkivu *in vivo* koristeći različite koncentracije i načine primjene protutijela na eksperimentalnom modelu štakora.

Metode: Iz dobivenih homogenata, nakon tretmana različitim dozama i načinom primjene BMP1-3 polyAb i BMP1-3, izolira se RNA i provodi se analiza genske ekspresije Col1A1, TGF $\beta$  i dekorina lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu.

Rezultati: Primjenom BMP1-3 polyAb subkutano u tri koncentracijske razine, nije pokazana razlika u ekspresiji između tretiranih i kontrolnih skupina u svakoj grupi kao i između grupa tretiranih različitim dozama antitijela. Za grupe tretirane intravenski BMP1-3 polyAb i subkutano BMP1-3 proteinom, ekspresija tretirane strane nije statistički značajno promijenjena u odnosu na kontrolnu.

Zaključak: Moguće je da BMP1-3 polyAb značajnije utječe na posttranslacijsku modifikaciju, a manje na razini transkripcije kolagena, TGF $\beta$  i dekorina. Unatoč tome što razlika ekspresije između tretiranih i kontrolnih skupina nije pokazana, potrebno je uzeti u obzir rezultate histološke analize koja slijedi, te na taj način interpretirati potencijalnu važnost primjene BMP1-3 polyAb na smanjenje veličine kožnog ožiljka u štakora.

## 9. Summary

**Introduction:** BMP1-3 achieves a profibrotic effect through increased ECM expression and deposition, which can result in an aesthetically visible scar. The profibrotic effect of BMP1-3 is thought to be partly caused by the combined decrease in decorin expression and increased expression of Coll1A1 and TGF $\beta$ . This research explores the effect of polyclonal antibodies developed on BMP1-3 on the expression of Coll1A1, TGF $\beta$ -1 and decorin in scar tissue in vivo using different concentrations and methods of antibody application in an experimental model using rats.

**Methods:** After rat treatment with different doses and methods of application of BMP1-3 polyAb and BMP1-3, RNA was isolated from the obtained skin tissue homogenates and analysis of gene expression of Coll1A1, TGF $\beta$  and decorin was performed by real-time polymerase chain reaction.

**Results:** Administration of BMP1-3 polyAb subcutaneously at three concentration levels did not result in different gene expression between treated and control side of body in each group of animals, as well as between groups treated with different antibody doses. For the groups treated with BMP1-3 polyAb intravenously and BMP1-3 protein subcutaneously, gene expression in the treated group was not statistically significantly changed when compared to the control group.

**Conclusion:** It is possible that BMP1-3 polyAb shows a more significant effect on posttranslational modifications instead to the transcription of collagen, TGF $\beta$  and decorin genes. Despite the lack of a difference in expression between the treated and control groups, it is necessary to take into account the results obtained by future histological analysis, and interpret the potential importance of BMP1-3 polyAb to reduce skin scar size in rats accordingly.

## 10. Popis kratica

BMP - koštani morfogenetski proteini, engl. bone morphogenetic protein

cDNA – komplementarna DNA, engl. complementary DNA

CKD - kronične bubrežne bolesti, engl. chronic kidney disease

Col1A1 – kolagen tip 1 lanac alfa 1

CUB - komponente C1r/C1s komplementa- protein morskog ježa Uegf-BMP1

DEPC – dietil pirokarbonat, engl. diethyl pyrocarbonate

dNTP - deoksiribonukleozid trifosfat

ECM - izvanstanični matriks, engl. extracellular matrix

EGFR - epidermalni faktor rasta, engl. epidermal growth factor receptor

EMT - epitelno-mezenhimalna tranzicija

FGF – faktor rasta fibroblasta, engl. fibroblast growth factors

HA - hijaluronska kiselina

LMT - laboratorij za mineralizirana tkiva

MMP - matriks metaloproteinaza, engl. matrix metalloproteinase

PBS- fosfatni pufer, eng. phosphate-buffered saline

PCP - prokolagen C-proteinaza

PCR - lančana reakcija polimeraze, engl. polymerase chain reaction

PRMT1 - arginin metiltransferaze 1, engl. protein arginine methyltransferase 1

RNA – ribonukleinska kiselina, engl. ribonucleic acid

RT-PCR - lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu, engl. real-time polymerase chain reaction

SLRP - proteoglikan iz obitelji bogatih leucinom, engl. small leucine rich proteoglycans

SMA – aktin glatkog mišića, engl. smooth muscle actin

TGFβ - transformirajući faktor rasta β, engl. transforming growth factor β

TIMP - tkivni inhibitor metaloproteinaze, engl. tissue inhibitor of metalloproteinase

VEGF - vaskularni endotelni faktor rasta, engl. vascular endothelial growth factor

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Samostalni kolegij: Specijalna područja kliničke biokemije  
Kišpatićeva ulica 12, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Utjecaj BMP1-3 na ekspresiju Col1A1, TGFβ i dekorina u ožiljkastom tkivu štakora Ema Crnek

#### SAŽETAK

Uvod: BMP1-3 ostvaruje profibrotični učinak kroz povećanu ekspresiju i taloženje ECM-a, što može rezultirati estetski vidljivim ožiljkom. Smatra se da je za profibrotični učinak BMP1-3 dijelom odgovorno pridruženo smanjenje ekspresije dekorina, te povećana ekspresija Col1A1 i TGFβ. Ovaj rad ispituje učinak poliklonskih protutijela razvijenih na BMP1-3 na ekspresiju Col1A1, TGFβ-1 i dekorina u ožiljkastom tkivu *in vivo* koristeći različite koncentracije i načine primjene protutijela na eksperimentalnom modelu štakora.

Metode: Iz dobivenih homogenata, nakon tretmana različitim dozama i načinom primjene BMP1-3 polyAb i BMP1-3, izolira se RNA i provodi se analiza genske ekspresije Col1A1, TGFβ i dekorina lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu.

Rezultati: Primjenom BMP1-3 polyAb subkutano u tri koncentracijske razine, nije pokazana razlika u ekspresiji između tretiranih i kontrolnih skupina u svakoj grupi kao i između grupa tretiranih različitim dozama antitijela. Za grupe tretirane intravenski BMP1-3 polyAb i subkutano BMP1-3 proteinom, ekspresija tretirane strane nije statistički značajno promijenjena u odnosu na kontrolnu. Zaključak: Moguće je da BMP1-3 polyAb značajnije utječe na posttranslacijsku modifikaciju, a manje na razini transkripcije kolagena, TGFβ i dekorina. Unatoč tome što razlika ekspresije između tretiranih i kontrolnih skupina nije pokazana, potrebno je uzeti u obzir rezultate histološke analize koja slijedi, te na taj način interpretirati potencijalnu važnost primjene BMP1-3 polyAb na smanjenje veličine kožnog ožiljka u štakora.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 34 stranica, 4 grafičkih prikaza, 7 tablica i 61 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: BMP1-3, Col1A1, TGFβ, dekorin, ožiljak

Mentor: **Prof. dr. sc. Dunja Rogić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Tatjana Bordukalo Nikšić**, znanstveni suradnik Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Dunja Rogić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Tatjana Bordukalo Nikšić**, znanstveni suradnik Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.

**Prof. dr. sc. József Petrik**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical Biochemistry  
Independent course: Special areas of clinical biochemistry  
Kišpatićeva ulica 12, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

### **Impact of BMP1-3 on expression of Col1A1, TGF $\beta$ and decorin on dermal scarring in rats** **Emma Crnek**

#### **SUMMARY**

**Introduction:** BMP1-3 achieves a profibrotic effect through increased ECM expression and deposition, which can result in an aesthetically visible scar. The profibrotic effect of BMP1-3 is thought to be partly caused by the combined decrease in decorin expression and increased expression of Col1A1 and TGF $\beta$ . This research explores the effect of polyclonal antibodies developed on BMP1-3 on the expression of Col1A1, TGF $\beta$ -1 and decorin in scar tissue in vivo using different concentrations and methods of antibody application in an experimental model using rats. **Methods:** After rat treatment with different doses and methods of application of BMP1-3 polyAb and BMP1-3, RNA was isolated from the obtained skin tissue homogenates and analysis of gene expression of Col1A1, TGF $\beta$  and decorin was performed by real-time polymerase chain reaction. **Results:** Administration of BMP1-3 polyAb subcutaneously at three concentration levels did not result in different gene expression between treated and control side of body in each group of animals, as well as between groups treated with different antibody doses. For the groups treated with BMP1-3 polyAb intravenously and BMP1-3 protein subcutaneously, gene expression in the treated group was not statistically significantly changed when compared to the control group. **Conclusion:** It is possible that BMP1-3 polyAb shows a more significant effect on posttranslational modifications instead of the transcription of collagen, TGF $\beta$  and decorin genes. Despite the lack of a difference in expression between the treated and control groups, it is necessary to take into account the results obtained by future histological analysis, and interpret the potential importance of BMP1-3 polyAb to reduce skin scar size in rats accordingly.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 34 pages, 4 figures, 7 tables and 61 references. Original is in Croatian language.

Keywords: BMP1-3, Col1A1, TGF $\beta$ , decorin, scar

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*  
**Tatjana Bordukalo Nikšić, Ph.D.** *Research Associate at University of Zagreb School of Medicine*

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*  
**Tatjana Bordukalo Nikšić, Ph.D.** *Research Associate at University of Zagreb School of Medicine*  
**József Petrik, Ph.D.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: July 2022.