

UTJECAJ GASTROINTESTINALNOGA PEPTIDA BPC 157 NA RANU FAZU EKSPRESIJE GENA POVEZANIH S ANGIOGENEZOM

Milavić, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:272460>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -](#)
[Repository of PHD, master's thesis](#)





Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

Marija Milavić

**UTJECAJ GASTROINTESTINALNOGA
PEPTIDA BPC 157 NA RANU FAZU
EKSPRESIJE GENA POVEZANIH S
ANGIOGENEZOM**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Marija Milavić

**IMPACT OF GASTROINTESTINAL
PEPTIDE BPC 157 ON EARLY
PHASE EXPRESSION OF
ANGIOGENESIS-RELATED
GENES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

MARIJA MILAVIĆ

**UTJECAJ GASTROINTESTINALNOGA
PEPTIDA BPC 157 NA RANU FAZU
EKSPRESIJE GENA POVEZANIH S
ANGIOGENEZOM**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Izv. prof. dr. sc. Andrea Gudan Kurilj, DECV
Prof. dr. sc. Sven Seiwerth

Zagreb, 2021.



University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Marija Milavić

**IMPACT OF GASTROINTESTINAL
PEPTIDE BPC 157 ON EARLY
PHASE EXPRESSION OF
ANGIOGENESIS-RELATED
GENES**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Assistant professor Andrea Gudan Kurilj, PhD, DECVP
Professor Sven Seiwerth, PhD

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

IZJAVA

Ja, Marija Milavić, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mogega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima do onih navedenih u radu.

Zagreb, 2021.

ZAHVALE

Posebnu zahvalnost dugujem svojim mentorima, izv. prof. dr. sc. Andrei Gudan Kurilj i prof. dr. sc. Svenu Seiwerthu na vremenu odvojenom za mene i moja brojna pitanja, velikoj podršci, razumijevanju i savjetima tijekom izrade ovoga rada.

Veliko hvala Ivanu Gržibovskom i Goranu Madžarcu koji su pomogli prilikom rada s eksperimentalnim životinjama te Jakši Vukojeviću na pomoći pri statističkoj obradi podataka.

Zahvalna sam i svojim kolegama i prijateljima na njihovoj pomoći i podršci, a posebno Diani Hrg, Ivani Birek, Ivoni Kaloper Lovreković i Nikoli Karabolovskom.

I na kraju, najtoplije se zahvaljujem svojoj obitelji koja je uvijek vjerovala u mene i bez čije podrške ne bih mogla realizirati ovaj rad.

SAŽETAK

Cijeljenje rane je prirodni odgovor na ozljedu tkiva, a u procesu cijeljenja rane angiogeneza ima ključnu ulogu. Sintetski pentadekapeptid probavnog sustava BPC 157 pospješuje cijeljenje što je dokazano brojnim studijama, a djeluje i na angiogenezu. Molekularni mehanizam njegovog djelovanja još uvijek je nerazjašnjen.

U ovom istraživanju je analiziran učinak peptida BPC 157 na ranu fazu ekspresije gena povezanih s angiogenezom na modelu rane izazvane na koži štakora. Analizirani su uzorci kože i potkožja oko rane uzeti dva, pet, odnosno 10 minuta nakon izazivanja rane i aplikacije testnih agenasa. Aktivacija ekspresije pojedinih gena istraživana je na razini analize količine stvorene mRNA. Analiza je napravljena metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR), a za određivanje relativne kvantifikacije ekspresije gena korištena je metoda $\Delta\Delta C_t$ te su rezultati prikazani kao $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrijednosti. Istraživani su geni *Akt1*, *Braf*, *Egfr*, *Egr1*, *Grb2*, *Hdac7*, *Kras*, *Mapk1*, *Mapk3*, *Mapk14*, *Nos3*, *Pik3cd*, *Plcg1*, *Prkcg*, *Ptk2*, *Pxn*, *Src*, *Srf* i *Vegfa*. Obzirom na distribuciju, dobiveni su podatci analizirani Studentovim T-testom, a vrijednost $p < 0.05$ smatrana je statistički značajnom.

BPC 157 potiče ekspresiju svih navedenih gena. Pojačana ekspresija gena *Akt1*, *Grb2*, *Nos3*, *Pik3cd*, *Prkcg*, *Ptk2* i *Src* javlja se već nakon dvije minute, a vidi se i kroz pet i deset minuta. Za gene *Braf*, *Egfr*, *Egr1*, *Hdac7*, *Mapk1*, *Mapk3*, *Mapk14*, *Plcg1*, *Pxn*, *Srf* i *Vegfa*, pojačana ekspresija zabilježena je nakon pet i u desetoj minuti, dok je povećana ekspresija gena *Kras* detektirana nakon 10 minuta.

Dobiveni podatci ukazuju na to da pojačavanjem ekspresije navedenih gena protein BPC 157 ima utjecaj i na signalne putove koji su važni za angiogenezu i cijeljenje. Jedan od njih je prethodno identificiran signalni put PI3K-AKT-eNOS-VEGF koji se aktivira kod proliferacije, adhezije i migracije stanica. Aktiviraju se i signalni put RAS-RAF-MEK-ERK/MAPK koji je uključen u regulaciju staničnog ciklusa i migraciju, PTK2(FAK)-SRC-PXN, važan za moduliranje stanične adhezije i migracije te signalni put SRC-PLC γ -PKC-MEK-ERK uključen u stanični rast i diferencijaciju. Geni čiji su produkti uključeni u navedene signalne putove imaju različite uloge, a mehanizmi kojima utječu na regulaciju staničnih procesa su iznimno složeni i često se međusobno isprepliću. Zaključno, BPC 157 ima proangiogeni učinak dokazan u *in vivo* modelu kožne rane.

KLJUČNE RIJEČI: BPC 157, cijeljenje, angiogeneza, genska ekspresija, signalni putovi

EXTENDED SUMMARY

Introduction

Healing is a complex cascade of events that are not clearly separated, but they interfere and involve complex interactions of different cell types, mediators, cytokines, and the vascular system. Briefly, tissue healing is a procedure during which growth factors cause cell proliferation, leading to the integration of dynamic changes involving soluble mediators, blood cells, extracellular matrix production, and parenchymal cell proliferation. We can distinguish several phases of healing: hemostasis, inflammatory phase, proliferative phase and maturation phase. One of the earliest responses to injury results from damage to blood vessels in the wound area. Blood coagulation is enabled by various humoral and cellular ingredients such as fibrinogen and platelets which are also responsible for signaling that contributes healing. Various cytokines (chemokines, interleukins, interferons, TNF, etc.) and growth factors (PDGF, VEGF, TGF- β , etc.) are released. They are signals for recruitment of circulating inflammatory cells to the wound site, they initiate reepithelialization and connective tissue contraction, stimulate keratinocyte and fibroblast migration and stimulate the angiogenic response.

Inflammatory cells like neutrophils and macrophages are attracted to the wound site where they phagocytose debris, release NO (increase vascular permeability) and reactive oxygen species – ROS (killing pathogens), secreting proteases (break down damaged cells), produce and release cytokines, angiogenic, inflammatory and fibrogenic factors. Epidermis and dermis are regenerated by migration and proliferation of different cells near the lesion as keratinocytes and fibroblasts. For successful wound reparation, it is necessary to ensure the transport of fluid, nutrients, oxygen and immunocompetent cells to the newly formed tissue, so the development of new blood vessels is essential. Angiogenesis is a complex process involving the proliferation, migration and remodeling of endothelial cells as well as pericyte stabilization. These events are regulated by multiple cytokines and growth factors. Binding of growth factors to their receptors induce receptor dimerization which activates receptor kinases, receptor autophosphorylation and downstream signalling (PI3K-AKT-eNOS, RAS-RAF-MEK-ERK/MAPK, etc.). In the final stage of healing, it is necessary to establish a normal tissue structure and a scar is formed with a large number of collagen fibers.

All these processes and events can be modulated by numerous exogenous and endogenous factors. Some of them will have negative effect (old age, infection, diabetes),

but some of them can enhance wound healing. One of the agents that improves healing is synthetic pentadecapeptide – BPC 157. It is confirmed by a series of studies: different types of lesions (skin, muscle, tendon), burns, bone fractures, eye injuries, brain and spinal cord injuries digestive system impairments etc. In addition to healing, it also has a proven cellprotective and organoprotective effect. BPC 157 has no proven lethal dose and can be administrated without a carrier.

The impact of BPC 157 on healing is reflected in rapid development of granulation tissue, its maturation and degradation, improved epithelialization and increased wound vascularization. The role of the NO-system is very important in the healing process, and the effect of BPC 157 on the NO system has been demonstrated in several studies (activation of VEGFR2-AKT-eNOS signaling pathway). BPC 157 stimulates the expression of several genes mRNA (*Egr1*, *Nab2*, *Nos3*, *Cox2*, *Vegfa*) and phosphorylation of proteins important for cell adhesion, proliferation and migration (*Ptk2*, *Pxn*, *Akt1*), all mechanisms important for angiogenesis. Although results of previous studies suggest promotional effect of BPC 157 on angiogenesis, the molecular level of this mechanism has not been fully elucidated.

Aim of the study

The aim of this study was to evaluate the effect of the peptide BPC 157 on early phase expression of the angiogenesis-related genes which was analyzed on the rat skin wound model. Also, to confirm the effect of BPC 157 on expression of these genes, to show its angiogenetic effect at the molecular level, to identify affected signaling pathways and to elucidate the action mechanism of BPC 157.

Material and methods

The study was performed on female Wistar albino rats. The animals were randomly assigned to two basic groups: control and treated with BPC 157, within which there were subgroups with different time intervals from wound induction and agents application to sampling.

Excision wound was performed with a 5 mm diameter biopsy punch in the skin of the inner part of the hind right limb and immediate intraperitoneal administration of saline and solution of BPC 157 in saline (2 µg/mL), respectively, was done (10 µg/kg body weight). After two, five and 10 minutes, respectively, the wound was frozen locally and a ring-shaped skin and subcutaneous tissue sample was then taken around the wound using a round 8 mm diameter biopsy knife. Immediately after sampling, the tissue was frozen in liquid nitrogen and stored until RNA extraction. Prior to extraction of total RNA, tissue

was homogenized. RNA extraction was done using the TRIzol-based method. The concentration of RNA samples was measured and a reverse transcription reaction was performed.

Analysis of selected genes expression evaluated on mRNA level was done using the quantitative real-time polymerase chain reaction method (qRT-PCR). Obtained data revealed the potential activation of signaling pathways associated with angiogenesis and the mechanism of peptide BPC 157 activity, respectively. The $\Delta\Delta C_t$ method was used to determine the relative quantification of gene expression, and results were presented as $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values. *Akt1*, *Braf*, *Egfr*, *Egr1*, *Grb2*, *Hdac7*, *Kras*, *Mapk1*, *Mapk3*, *Mapk14*, *Nos3*, *Pik3cd*, *Plcg1*, *Prkcg*, *Ptk2*, *Pxn*, *Src*, *Srf* and *Vegfa* genes were analyzed. Endogenous controls, ie housekeeping genes *Gapdh*, *Actb* and *Rn18s*, were used for results normalization. Fold change with values < 1 was considered as reduced expression, while fold change > 1 indicated increased expression.

The data obtained were analyzed, based on the distribution, by the Student's T-test, and the value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

BPC 157 increases the expression of all investigated genes. Significant upregulation of *Akt1*, *Grb2*, *Nos3*, *Pik3cd*, *Prkcg*, *Ptk2* and *Src* gene expression was noted after only two minutes, and can also be detected in five and 10 minutes time periods. As for the expression of *Braf*, *Egfr*, *Egr1*, *Hdac7*, *Mapk1*, *Mapk3*, *Mapk14*, *Plcg1*, *Prkcg*, *Ptk2*, *Pxn*, *Srf* and *Vegfa* genes, significantly increased expression was registred after five and also after 10 minutes, while increased *Kras* gene expression was detected 10 minutes after inducing wound and application of BPC 157.

Discussion and conclusions

This study confirmed most of the data obtained by previous studies. Activation of *Akt1*, *Nos3*, *Pik3cd*, *Ptk2*, *Pxn*, *Src* and *Vegfa* gene expression supports the idea that BPC 157 activates the PI3K-AKT-eNOS-VEGF and SRC-CAV-1-eNOS signaling pathways crucial for cell proliferation, migration and adhesion, and angiogenesis as suggested in studies by HSIEH et al. in 2017. and 2020., respectively. In the first study they discovered that, due the BPC 157, expression of VEGFA mRNA and protein was not changed, but VEGFR2 mRNA and protein indicated an increased expression after six hours with a peak of expression after 12 hours for mRNA and 9 hours for proteins, respectively (time periods studied were 3, 6, 12 and 24 hours after treatment). The same study showed, using a immunofluorescence, that BPC 157, just like VEGF, promotes the internalization of

VEGFR2 on HUVEC cells. Since the internalization of VEGFR2 is followed by activation of Akt and eNOS, ie initiation of VEGFR2-AKT-eNOS signaling pathway, the expression of VEGFR2, Akt and eNOS proteins and their phosphorylated (activated) forms was analyzed in 10, 15 and 30 minutes after treatment. Results showed that BPC 157 causes phosphorylation of VEGFR2 rapidly, after 10 minutes, as Akt phosphorylation, while eNOS phosphorylation was noted after 15 minutes. That data suggest that BPC 157 has an extremely fast effect, as detected in our study with upregulated *Akt1* and *Nos3* mRNA expression two minutes and *Vegfa* five minutes after injury.

In 2020. study HSIEH et al. discovered BPC 157 effect on vasorelaxation induction by activating eNOS/NO signalling. It also stimulated vascular endothelial cell migration and activated SRC-CAV1-eNOS signaling pathway. Expression of SRC, CAV1, eNOS proteins and their phosphorylated forms was analyzed in HUVEC cells using the Western blot 30 and 60 minutes after treatment. BPC 157 promoted phosphorylation of SRC and eNOS proteins while the amount of total SRC and eNOS proteins remained unchanged. A similar thing happened with the pCAV1 protein, but the amount of total CAV1 protein was reduced. BPC 157 promotes NO formation (important role in regulation of inflammation), eNOS phosphorylation and it reduces CAV1-eNOS binding (increased eNOS activity is associated with decreased CAV1 binding). Data obtained for SRC protein correlates with previous 2010. *in vitro* study from CHANG et al. which demonstrated effect of BPC 157 on the increased migration rate of tendon fibroblast cells in a dose-dependent manner. It was confirmed with Western blot method which showed that the application of BPC 157 had no effect on the increased amount of Fak/Ptk2 protein and paxilin, but enhanced their phosphorylation. This effect can be associated with the activation of the PTK2(FAK)-SRC-PXN signaling pathway which plays an important role in modulating cell adhesion and migration. Src protein cooperates with many tyrosine kinase receptors and can activate numerous signaling pathways, as SRC-CAV1-eNOS, PI3K/AKT and PTK2(FAK)-PXN. In this study, expression of *Ptk2*, *Src* and *Pxn* genes was analyzed, and the obtained data showed that BPC 157 application increased *Ptk2* and *Src* gene expression after only two minutes, while the same effect on *Pxn* was noted after five minutes.

An extensive study by KANG et al. in 2018. on an *in vivo* model of tumor cachexia also analyzed molecular mechanisms of BPC 157. RT-PCR analysis was done and expression of *Mfn-2*, *PGC-1 α* and *Pax* mRNA was investigated. Decreased expression of all these genes was observed in cachexia animals while in BPC 157-treated cachexia animals the expression level was preserved. BPC 157 corrected both inflammatory and

metabolic changes caused by the tumor. The phosphorylated forms of Foxo, Akt, mTOR i GSK-3 β (transcription factor and regulatory proteins important for muscle proliferation and myogenesis) were analyzed using the Western blot and their phosphorylation was reduced in cachexia animals as opposed to those treated with BPC 157.

Some studies investigated BPC 157 effect on PI3K-AKT signalling and eNOS. In 2018. and 2020. VUKOJEVIĆ et al. have shown that BPC 157 has activating effect to *Nos3* expression, while study from CESAREC et al. in 2013. has shown that it reduces *Nos3* expression. The reason for these contradictory data can be found in studies describing the effect of BPC 157 on the NO system where it interferes with the effects of agonists (L-arginine, substrate molecules for NO) and antagonists of the NO system (L-NAME, NOS inhibitors). It indicates that BPC 157 regulates the amount of NO depending on the situation in the system. In addition, sampling and analysis were performed at different time periods: one and 24 hours from wound induction (increased expression of *Nos3*), at the beginning of inflammatory phase, and after four days (reduced *Nos3* expression), when the inflammatory phase should enter a downward trajectory.

In vivo studies from VUKOJEVIĆ et al. in 2018. and 2020. also examined the effect of BPC 157 on the mRNA expression of genes important for cell migration, proliferation and survival, and for the formation of reactive oxygen species, events important for overcoming induced injury. Activation of VEGFR2 signaling is very important for that events. It stimulates phospholipase C gamma (*Plcg1*) which is responsible for the activation of protein kinase C (*Prkcg*), whose downstream signaling targets are members of the MAPK signaling pathway (*Raf*, *Ras*, *Mek*, *Erk2-1/Mapk1-3*). Inferior caval vein ligation samples were analysed one and 24 hours after injury. Results indicated that BPC 157 increases the expression of the *Egr* (one hour) and *Nos3*, *Srf*, *Kras* (one hour and 24 hours) genes and decreases the expression of the *Egr* (24 hours), *Vegfr2* (one hour and 24 hours) and *Plc γ* (24 hours) genes while the expression the *Akt1* gene remained unchanged. Study done on ischemic/reperfusion injury in rat brain addressing the effect of BPC 157 discovered its effect on upregulated expression of *Egr1*, *Akt1*, *Kras*, *Src*, *Foxo*, *Srf*, *Vegfr2*, *Nos3* and *Nos1* genes, and downregulated expression of *Nos2* and *Nfkb* genes, while no effect on *Mapk1* gene expression was observed. Data collected in this study mostly correlates with those, as we showed that BPC 157 has an activating effect on *Prkcg* expression after only two minutes, while increased *Plcg1* expression was observed after five minutes. Activation of the MAPK signaling pathway is manifested as increased expression of *Braf*, *Mapk1* i *Mapk3* observed in the fifth minute, and for *Kras* the same

effect is seen after 10 minutes. BPC 157 also upregulated expression of *Mapk14* five minutes after application. It is also very important in the healing process, especially in the inflammatory phase, as MAPK p38 (Mapk14) signaling pathway controls cytokine release.

In addition to VEGFR2, activation of EGFR signaling also includes components of the MAPK signaling pathway and PI3K-AKT signaling pathway, respectively. *Egfr* expression analysis showed upregulating effect of BPC 157 noted after five minutes. Binding of the ligand to *Egfr* enables activation of Grb2 protein and triggering a MAPK signaling cascade. Also, it can activate PI3K-AKT, PLC γ -PKC and other signaling pathways. For this reason, the *Grb2* gene was studied and its increased expression was proven due to the action of BPC 157.

Cellular cytoskeletal proteins play a significant role during angiogenesis as they are responsible for cell shape, adhesion and motility. One of the main regulators of cytoskeleton protein expression is Srf – a transcription factor that regulates a number of genes involved in cell growth, migration, and cytoskeletal organization. Srf is important for the activation of some genes involved in endothelial proliferation, such as *Fos* and *Egr1*, so in the case of Srf deficiency, VEGF-induced signaling will not be able to activate the expression of *Fos* and *Egr1*. Analysis of the BPC 157 effect on *Srf* expression in this study showed an increased expression after five minutes. The same effects on *Srf* gene expression were demonstrated in previous studies from VUKOJEVIĆ et al. in 2018. and 2020.

Activation of protein kinase C signaling pathways includes induction of transcription factors, Nfat and *Egr1*, respectively, and activation of the angiogenic response. *Egr1* induces cytokines and the production of growth factors as well as the early formation of collagen, or extracellular matrix, and, like Srf, is a very important component of the healing process and angiogenesis. An *in vitro* study from TKALČEVIĆ et al. in 2007. done on Caco-2 cells showed that BPC 157 enhances *EGR1* expression. The analysis was performed by RT-PCR method (effect was detected after 15 minutes) and Western blot (effect was detected after one hour). That data correlate with the results obtained in this study where increased expression of the *Egr1* gene was demonstrated after only 5 minutes. Studies from 2018. and 2020. performed by VUKOJEVIĆ et al. analysing the effect of BPC 157 on *Egr1* expression also support this data.

Vegfa can cause rapid phosphorylation Hdac7 as early as five minutes, as described by WANG et al. in 2008. Plcg and Prkc activate Prkd followed by Hdac7 phosphorylation resulting in endothelial cell proliferation and migration. In this study, therefore, the effect

of BPC 157 on *Hdac7* gene expression was investigated and the result indicated increased expression after five minutes.

The complexity of events in signaling pathways and the large number of interactions makes it difficult to clearly detect the action mechanism of BPC 157. However, it is indisputably proven to have a pleiotropic effect, not only on expression of different genes but also on their protein products triggering complex signaling cascades. Taking into account the results of this and previous studies, it can be concluded that BPC 157 acts extremely quickly (gene expression effects seen in two, five and ten minutes, respectively). It can have prolonged impact with modular or regulatory effects on different events involved in angiogenesis or inflammatory response (regulation of NO system, effect on expression and activation of certain genes and/or their protein products).

In conclusion, BPC 157 has a proangiogenic effect proven in an *in vivo* skin wound model. Studied genes with protein products involved in angiogenic signaling pathways have different roles and mechanisms they affect as regulation of cellular processes is extremely complex and often intertwined. That is a puzzle that needs to be solved to elucidate molecular mechanism of BPC 157 action which can potentially lead to widespread use in a variety of pathological conditions.

POPIS KORIŠTENIH KRATICA I OZNAKA

aFGF/FGF1 – kiseli faktor rasta fibroblasta (engl. *acidic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor-1*)

AKT1/PKB – serinska treoninska kinaza 1/proteinska kinaza B (engl. *serine-threonine kinase 1/protein kinase B*)

ANG1/2 – angiopoietin 1/2

AMP – adenzin-monofosfat (engl. *adenosine monophosphate*)

ASAP – regulatorski protein

ATP – adenzin-trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

BAD – Bcl2 antagonist stanične smrti (engl. *Bcl2-Antagonist of Cell Death*)

bFGF/FGF2 – bazični faktor rasta fibroblasta (engl. *basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor-2*)

BMPs – koštani morfogenetski proteini (engl. *bone morphogenetic proteins*)

bp – par baza (engl. *base pair*)

BPC 157 – engl. *body protective compound 157*

BRAF – produkt B-raf protoonkogena (engl. *B-Raf proto-oncogene*)

Caco-2 – stanična linija nastala od primarnog kolorektalnog karcinoma (engl. *colorectal adenocarcinoma cells*)

Cas/p130Cas – adapterski protein

cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (engl. *complementary deoxyribonucleic acid*)

cGMP – ciklički gvanozin-monofosfat (engl. *cyclic guanosine monophosphate*)

COX2/PTGS2 – ciklooksigenaza 2/sintaza prostaglandin-endoperoxida 2 (engl. *cyclooxygenase/prostaglandin-endoperoxide synthase 2*)

CRK – produkt protoonkogena

Ct/Cp – ciklus u kojem fluorescencija analiziranih gena prelazi prag detekcije (engl. *threshold cycle/crossing point*)

DAG – diacilglicerol

DAMPs – molekularni uzorci povezani s oštećenjem (engl. *damage-associated molecular patterns*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

DOCK180 – posrednik citokineze (engl. *dedicator of cytokinesis*)

dNTP – deoksinukleotid (engl. *deoxynucleotide*)

ECM – izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*)

EDHF – faktor hiperpolarizacije nastao iz endotela (engl. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*)

EDRF – faktor opuštanja nastao iz endotela (engl. *endothelium-derived relaxing factor*)

EGF – epidermni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*)

EGFR – receptor epidermnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

EGR1/2 – faktor ranog odgovora na rast 1/2 (engl. *early growth response 1/2*)

ELISA – metoda za detekciju proteina (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

eNOS/NOS3 – sintaza dušikovog monoksida endotela/sintaza dušikovog monoksida 3 (engl. *endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide synthase 3*)

ErbB/HER – porodica receptora tirozinske kinaze (engl. *erythroblastic oncogene B/human epidermal growth factor receptor*)

F – uzvodna početnica (engl. *forward primer*)

FAT – domena koja usmjerava FAK prema kompleksima fokalne adhezije (engl. *focal adhesion targeting*)

FGF – faktor rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor*)

FGFR1/2/3/4 – receptor faktora rasta fibroblasta 1/2/3/4 (engl. *fibroblast growth factor receptor 1/2/3/4*)

FOS – produkt protoonkogen

GDP – gvanozin-difosfat (engl. *guanosine diphosphate*)

GEF – faktor razmjene nukleotida gvanina (engl. *guanine-nucleotide exchange factor*)

GPCR – receptori povezani s G-proteinom (engl. *G-protein-coupled receptors*)

GRAF – regulatorski protein

GRB2 – protein 2 vezan na receptor faktora rasta (engl. *growth factor receptor bound protein 2*)

GTP – gvanozin-trifosfat (engl. *guanosine triphosphate*)

HDAC7 – histonska deacetilaza 7 (engl. *histone deacetylase 7*)

HGF – faktor rasta hepatocita (engl. *hepatocyte growth factor*)

HIF – faktor koji izaziva hipoksiju (engl. *hypoxia-inducible factor*)

HUVEC – endotelne stanice porijeklom od velike umbilikalne vene (engl. *human umbilical vascular endothelial cell*)

IFN $\alpha/\beta/\gamma$ – interferon $\alpha/\beta/\gamma$

IGF – faktor rasta nalik inzulinu (engl. *insulin-like growth factor*)

IL-1/2/4/5/6/8/10/12/17 – interleukin1/2/4/5/6/8/10/12/17

iNOS/NOS2 – inducibilna sintaza dušikovog monoksida/ sintaza dušikovog monoksida 2 (engl. *inducible nitric oxide synthase/nitric oxide synthase 2*)

IP3 – inozitol 1,4,5-trisfosfat (engl. *inositol 1,4,5-trisphosphate*)

JNK/SAPK – c-Jun N-terminalna kinaza, proteinska kinaze SAPK aktivirana stresom (engl. *c-Jun-N-terminal kinase/stress activated protein kinase*)

KGF – faktor rasta keranocita (engl. *keratinocyte growth factor*)

KIT – produkt protoonkogen

KRAS – produkt homologa onkogen Kirstenova virusa sarkoma (engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*)

MADS – porodica transkripcijskih faktora

MAPK/ERK – MAP-kinaza; kinaza koja se aktivira mitogenima/kinaza koja se regulira izvanstaničnim signalima (engl. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*)

MAPK14/p38 – serinska treoninska kinaza koju aktivira MAPKK

MAPKK/MEK – MAPK-kinaza; kinaza MAP-kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*)

MAPKKK – kinaza MAPK-kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*)

MCP-1; monocitni kemoatraktantni protein-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*)

MMP – metaloproteinaze matriksa (engl. *matrix metalloproteinase*)

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger ribonucleic acid*)

mTOR – meta rapamicina kod sisavaca (engl. *mammalian target of rapamycin*)

M.W. – molekularna težina (engl. *molecular weight*)

MYC – produkt protoonkogena

NAB2 – protein 2 koji veže NGFI-A/EGR1 (engl. *NGFI-A binding protein 2/EGR1 binding protein 2*)

NF-κB – nuklearni faktor κB (engl. *nuclear factor κB*)

NK – prirodno ubilačke (engl. *natural killer*)

nNOS/NOS1 – neuralna sintaza dušikovog monoksida/sintaza dušikovog monoksida 1 (engl. *neuronal nitric oxide synthase/nitric oxide synthase 1*)

NO – dušikov monoksid (engl. *nitric oxide*)

NOS – sintaza dušikovog monoksida (engl. *nitric oxide synthase*)

p90RSK – kinaza ribosomskog proteina S6 (engl. *90 kDa Ribosomal protein S6 Kinases*)

PXN – paksilin (engl. *paxillin*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PDGF – faktor rasta dobiven iz trombocita (engl. *platelet-derived growth factor*)

PDGFR – receptor faktora rasta dobivenog iz trombocita (engl. *platelet-derived growth factor receptor*)

PDK1 – kinaza 1 ovisna o fosfoinozolidu (engl. *phosphoinositide-dependent protein kinase 1*)

PF4 – faktor trombocita 4 (engl. *platelet factor-4*)

PGF – faktor rasta posteljice (engl. *placental growth factor*)

PI3K – PI3-kinaza, kinaza koja fosforilira fosfatidilinozitolni fosfat na položaju 3 (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*)

PIGF – faktor rasta placente (engl. *placental growth factor*)

PIK3CD – izoforma PI3K s katalitičkom podjedinicom δ (engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit δ*)

PIP2 – fosfatidilinozitol 4,5-difosfat (engl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)

PIP3 – fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfat (engl. *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*)

PRKCG/PKC – proteinska kinaza C γ /proteinska kinaza C (engl. *protein kinase C γ /protein kinase C*)

PKD – proteinska kinaza D (engl. *protein kinase D*)

PLA2 – fosfolipaza A2 (engl. *phospholipase A*)

PLCG1/PLC γ – fosfolipaza C γ 1 (engl. *phospholipase C γ 1*)

PTEN – proteinska fosfataza i homolog tenzina (engl. *phosphatase and tensin homolog*)

PTK2/FAK – proteinska tirozinska kinaza 2/kinaza fokalne adhezije (engl. *protein tyrosine kinase 2/focal adhesion kinase*)

qRT-PCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*)

R – nizvodna početnica (engl. *reverse primer*)

Rac – porodica malih proteina koji vežu GTP

Raf – porodica serinskih/treoninskih kinaza

Ras – porodica onkogeni koji vežu GTP

RB – produkt gena tumorskog supresora

Rheb – porodica proteina koji vežu GTP

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

RT – reverzna transkripcija (engl. *reverse transcription*)

RT-PCR – lančana reakcija polimerazom kojoj prethodi reverzna transkripcija (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina (engl. *ribosomal ribonucleic acid*)

s. a. – nije poznata godina izdanja, bez godine (lat. *sine anno*)

SAD – Sjedinjene Američke Države

SCH – adapterski protein

SD – standardna devijacija

SH2/3 – domena 2/3 homologna „Src“ (engl. *Src homology 2/3 domain*)

SHB – domena 2 adaptorskog proteina B homologna „Src“ (engl. *Src homology 2 domain-containing adapter protein B*)

SMAD – proteini koji upravljaju signalizacijom

SOS – engl. *son of sevenless*

SRC – produkt protoonkogeni *Src* (engl. *SRC proto-oncogene*)

SRE – element reakcije na serum (engl. *serum response element*)

SRF – faktor koji reagira na serum (engl. *serum response factor*)

STAT – signalni adapterski proteini (engl. *signal transducer and activator of transcription*)

TGF – transformirajući faktor rasta (engl. *transforming growth factor*)

Th – pomoćničke-T stanice (engl. *T-helper cells*)

TIE1/2 – receptorska tirozinska kinaza 1/2 (engl. *tyrosine kinase with immunoglobulin i EGF homology domains*)

TIMP – tkivni inhibitori metaloproteinaza (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase*)

TLR – receptor nalik proteinu „*toll*“ (engl. *toll-like receptors*)

t.m. – tjelesna masa

TNF- α – faktor tumorske nekroze α (engl. *tumor necrosis factor α*)

TP53/p53 – tumorski supresor p53 (engl. *tumor protein p53*)

TSC – kompleks tuberozne skleroze (engl. *tuberous sclerosis complex*)

UK – Ujedinjeno Kraljevstvo

VEGF/VEGFA/VPF – faktor rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor/ vascular endothelial growth factor A/vascular permeability factor*)

VEGFR1/2/3 – receptor faktora rasta vaskularnog endotela 1/2/3 (engl. *vascular endothelial growth factor receptor 1/2/3*)

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
2.	PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA.....	3
2.1.	KOŽA	3
2.1.1.	EPIDERMIS	4
2.1.2.	DERMIS	6
2.1.3.	SUBDERMIS (HIPODERMIS)	8
2.1.4.	KOŽNA CIRKULACIJA	9
2.1.4.1.	ANATOMIJA KOŽNE CIRKULACIJE.....	9
2.1.4.2.	KONTROLA KOŽNE CIRKULACIJE.....	11
2.1.5.	KOŽA ŠTAKORA	14
2.2.	CIJELJENJE RANA.....	14
2.2.1.	HEMOSTAZA	16
2.2.2.	UPALNA FAZA	18
2.2.3.	PROLIFERATIVNA FAZA.....	20
2.2.4.	FAZA REMODELIRANJA	21
2.2.5.	PROBLEMI U CIJELJENJU RANA	22
2.3.	ANGIOGENEZA.....	25
2.3.1.	KRVOŽILNI SUSTAV	25
2.3.2.	RAST I RAZVOJ KRVNIH ŽILA.....	26
2.3.3.	MOLEKULARNI MEHANIZMI ANGIOGENEZE	30
2.4.	BPC 157.....	35
2.5.	GENI UKLJUČENI U ANGIOGENEZU	37
2.5.1.	<i>AKT1</i>	38
2.5.2.	<i>BRAF</i>	40
2.5.3.	<i>EGFR</i>	42
2.5.4.	<i>EGR1</i>	44

2.5.5.	<i>GRB2</i>	46
2.5.6.	<i>HDAC7</i>	48
2.5.7.	<i>KRAS</i>	50
2.5.8.	<i>MAPK1</i>	52
2.5.9.	<i>MAPK3</i>	54
2.5.10.	<i>MAPK14</i>	56
2.5.11.	<i>NOS3</i>	58
2.5.12.	<i>PIK3CD</i>	60
2.5.13.	<i>PLCG1</i>	62
2.5.14.	<i>PRKCG</i>	64
2.5.15.	<i>PTK2</i>	66
2.5.16.	<i>PXN</i>	68
2.5.17.	<i>SRC</i>	70
2.5.18.	<i>SRF</i>	72
2.5.19.	<i>VEGFA</i>	74
2.6.	SIGNALNI PUTOVI	76
2.6.1.	RAS-RAF-MEK-ERK/MAPK	76
2.6.2.	PI3K-AKT-eNOS-VEGF	79
2.6.3.	PTK2(FAK)-SRC-PXN.....	82
2.6.4.	SRC-PLC-PKC-MEK-ERK	85
3.	OBRAZLOŽENJE TEME.....	88
3.1.	HIPOTEZA	88
3.2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	88
4.	MATERIJAL I METODE	89
4.1.	EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE	89
4.2.	EKSPERIMENTALNE SUPSTANCIJE	90
4.3.	REAGENSI ZA MOLEKULARNU ANALIZU	90

4.4.	EKSPERIMENTALNI PROTOKOL	91
4.5.	IZOLACIJA RNA IZ TKIVA	93
4.6.	ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE RNA.....	94
4.7.	PROVJERA KAKVOĆE I ČISTOĆE RNA	94
4.8.	REVERZNA TRANSKRIPCIIJA	95
4.9.	KVANTITATIVNA LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM	95
4.10.	ANALIZA PODATAKA DOBIVENIH KVANTITATIVNOM LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZOM	97
4.11.	STATISTIČKA ANALIZA	98
5.	REZULTATI	99
5.1.	KAKVOĆA RNA IZOLATA.....	99
5.2.	EKSPRESIJA ANALIZIRANIH GENA.....	100
5.2.1.	<i>Akt1</i>	101
5.2.2.	<i>Braf</i>	102
5.2.3.	<i>Egfr</i>	103
5.2.4.	<i>Egr1</i>	104
5.2.5.	<i>Grb2</i>	105
5.2.6.	<i>Hdac7</i>	106
5.2.7.	<i>Kras</i>	107
5.2.8.	<i>Mapk1</i>	108
5.2.9.	<i>Mapk3</i>	109
5.2.10.	<i>Mapk14</i>	110
5.2.11.	<i>Nos3</i>	111
5.2.12.	<i>Pik3cd</i>	112
5.2.13.	<i>Plcg1</i>	113
5.2.14.	<i>Prkcg</i>	114
5.2.15.	<i>Ptk2</i>	115

5.2.16.	<i>Pxn</i>	116
5.2.17.	<i>Src</i>	117
5.2.18.	<i>Srf</i>	118
5.2.19.	<i>Vegfa</i>	119
6.	RASPRAVA.....	120
7.	ZAKLJUČCI	128
8.	POPIS LITERATURE.....	129
9.	ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA	154
9.1.	ŽIVOTOPIS	154
9.2.	POPIS RADOVA	155

1. UVOD

Cijeljenje rane je prirodni odgovor na ozljedu tkiva gdje razlikujemo faze koje nisu jasno odijeljene i uključuju složeno međudjelovanje različitih tipova stanica, posrednika i citokina te krvožilnog sustava. U procesu cijeljenja rane angiogeneza ima ključnu ulogu.

Istraživanjem sintetskog pentadekapeptida probavnog sustava nazvanog BPC 157 (engl. *body protective compound 157*) i njegovog djelovanja, otkriveno je da ima pospješujući učinak na proces cijeljenja. Taj je učinak potvrđen nizom *in vivo* i *in vitro* studija na različitim modelima poput lezija (kože, mišića, tetiva), opekline, fraktura kostiju, ozljeda oka, ozljeda mozga i kralježnice, oštećenja probavnog sustava i dr. Osim toga, ima i dokazano staničnoprotektivno i organoprotektivno djelovanje. BPC 157 nema dokazanu letalnu dozu i može se primjenjivati bez nosača. Utjecaj BPC 157 na cijeljenje ogleda se u pojačanoj vaskularizaciji rane, brzim razvojem granulacijskog tkiva, njegovim sazrijevanjem i degradacijom, kao i poboljšanoj epitelizaciji – važnim događajima u cijeljenju. Međutim, molekularni mehanizam kojim BPC 157 djeluje na navedene procese još je u fazi istraživanja i nije u potpunosti poznat. Na temelju studija koje su bavile tim problemom može se zaključiti da BPC 157 ima utjecaja na ekspresiju nekih gena, odnosno na sintezu i aktivaciju određenih proteina povezanih s navedenim procesima.

Kako bi se dodatno rasvijetlio mehanizam djelovanja BPC 157, u ovoj je disertaciji istražen njegov učinak na ranu fazu ekspresije gena povezanih s angiogenezom. Korišten je model rane izazvane na koži štakora. Životinje su nasumično raspoređene u 2 osnovne grupe: kontrolne i tretirane s BPC 157, unutar kojih su postojale podgrupe prema vremenskim intervalima od izazivanja kožne rane do uzorkovanja (dvije, pet i 10 minuta). Materijal za analizu, koža i potkožje oko izazvane rane su iskorišteni za istraživanje aktivacije ekspresije pojedinih gena na razini analize količine stvorene mRNA – glasničke ribonukleinske kiseline (engl. *messenger ribonucleic acid*). Analiza je napravljena metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR), a dobiveni podaci su statistički obrađeni. Rezultati otkrivaju djelovanje BPC 157 na ekspresiju gena čiji proteinski produkti su uključeni u signalne putove povezane s angiogenezom, odnosno njegov angiogenetski učinak na molekularnoj razini. Time se dobivaju važne informacije o

mehanizmu djelovanja peptida BPC 157 što je temelj za njegovu uporabu kod medicinskih stanja koja uključuju cijeljenje rana.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. KOŽA

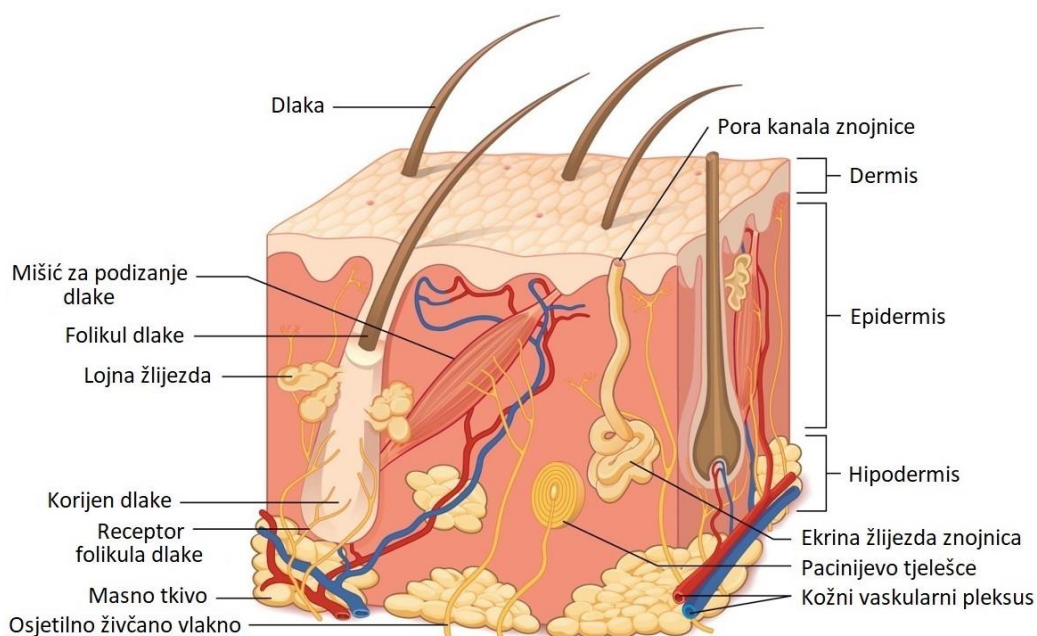
Koža (lat. *cutis*, grč. *dermis*) je složeni, najveći organ ljuskog tijela koji čini otprilike 15 % ukupne tjelesne težine (KANITAKIS, 2002.). Koža pokriva cijelu površinu tijela, a u predjelima funkcionalnih otvora prelazi u sluznicu dišnog, probavnog, odnosno urogenitalnog sustava. (MAK i SAUNDERS, 2005.).

Glavna uloga kože je zaštita tijela od različitih okolišnih čimbenika: fizikalnih (mehanički i termički utjecaji, UV zračenje), kemijskih i bioloških (patogeni mikroorganizmi). Koža je važan sekretorni i ekskretorni organ, ima važnu imunološku i osjetilnu (toplina, hladnoća, dodir, pritisak, vibracije, svrbež i bol) funkciju, pomaže u regulaciji tjelesne temperature (znojenje) i staničnog metabolizma (sinteza vitamina D, potkožno masno tkivo – zalihe energije) (LIPOZENČIĆ, 2004.; WICKETT i VISSCHER, 2006.).

Koža može obavljati različite funkcije zahvaljujući razrađenoj strukturi koja povezuje tkiva različitog podrijetla: epitelno, vezivno, krvožilno, mišićno i živčano (KANITAKIS, 2002.). Koža je sastavljena od tri glavna strukturna sloja:

- epidermis – vanjski sloj s izdancima: folikulima dlaka te lojnim i znojnim žlijezdama koji iz epidermisa rastu u dermis
- dermis – podležeci sloj, odijeljen od epidermisa dermo-epidermalnim spojem
- subdermis ili hipodermis – potkožje, varijabilni duboki sloj većinom građen od masnog tkiva (Slika 1).

Struktura kože pokazuje znatne varijacije koje se odnose na njenu debljinu, raspodjelu epidermalnih dodataka, gustoću melanocita i dr. (KANITAKIS, 2002.; WONG i sur., 2016.). Embriološki su epiderma i njeni dodaci ektodermalnog podrijetla, dok su dermis i hipodermis mezodermalnog porijekla (KANITAKIS, 2002.).



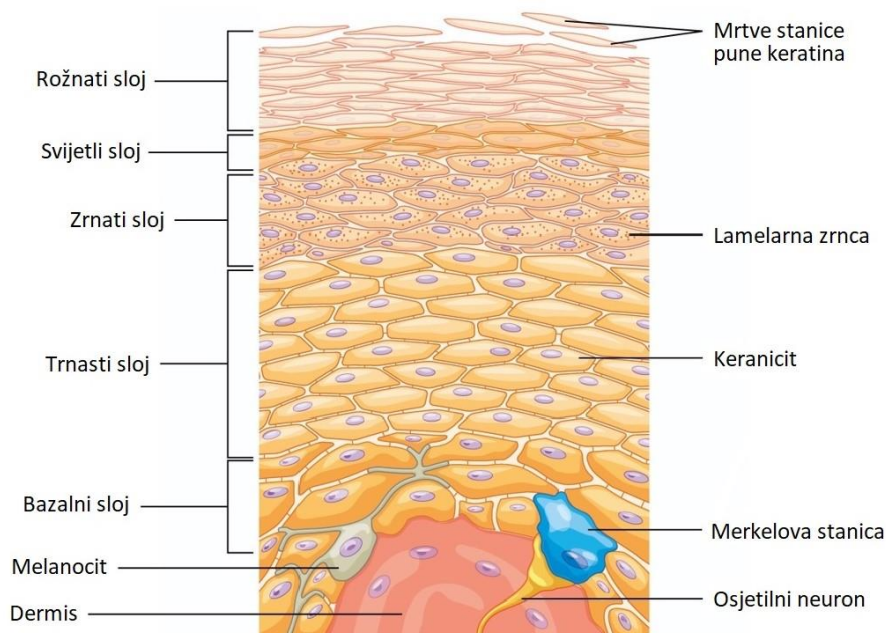
Slika 1. Slojevi kože. Epidermis s brojnim epitelnim stanicama, dermis sastavljen od gustog vezivnog tkiva i hipodermisa građenog od rahlog vezivnog tkiva i masnog tkiva (preuzeto i prilagođeno iz: [BETTS i sur., 2013.]).

2.1.1. EPIDERMIS

Epidermis je slojevita barijera, kontinuirano se obnavlja, a debljina mu varira od 0.05 mm na kapcima do 1.5 mm na dlanovima i tabanima (MCCANCE i HUETHER, 2018.). Sastoji se od različitih tipova stanica, većinom keranocita (80-95 %). Keranociti potječu iz matičnih stanica bazalnog sloja epidermisa. Nakon diobe, keranociti kroz sljedećih 30-ak dana migriraju prema površini kože, prolaze morfološku i biokemijsku diferencijaciju: gube stanične organele i jezgru te polako orožnjavaju. Keranociti postaju korneociti – spljoštene stanice pune keratina, glavnog strukturnog proteina kože, kose i noktiju i na kraju se ljušte s kože. Manji dio (5-10 %) epidermalnih stanica su nekeratinociti, uključujući uglavnom Langerhansove stanice, melanocyte i Merkelove stanice (KANITAKIS, 2002.; WICKETT i VISSCHER, 2006.; KOLARSICK i sur. 2011.).

Stanice epiderme raspoređene su u slojeve (Slika 2):

- rožnati sloj (lat. *stratum corneum*): (5-10 slojeva stanica) dalje se dijeli na površinski, labavi sloj (lat. *stratum disjunctum*) i duboki, kompaktni sloj (lat. *stratum compactum*) keranocita (korneocita), služi kao barijera, a debljina mu varira ovisno o mjestu na tijelu
- svijetli sloj (lat. *stratum lucidum*): nalazi se samo na palmoplantarskim područjima (dlanovi i tabani); keranociti u tom području sadrže eleidin – bistri protein, produkt transformacije proteina keratohijalina, a koji se, kako stanice migriraju prema rožnatom sloju, pretvara u keratin
- zrnati sloj (lat. *stratum granulosum*): (1-3 sloja stanica) u tom sloju keratinociti gube svoju jezgu, a naziv je dobio zahvaljujući proteinu keratohijalinu koji u stanicama formira citoplazmatske granule
- trnasti sloj (lat. *stratum spinosum*): (5-15 slojeva stanica) sastoji se od keranocita poligonalnog oblika sa šiljatim nastavcima koji se naslanjaju jedan na drugog
- bazalni sloj (lat. *stratum basale*): (jednoslojan) germinativni sloj gdje se keranociti dijele i pomiču prema gore kako bi zamijenili stanice odljuštene s površine. (KANITAKIS, 2002.; WICKETT i VISSCHER, 2006.; MCCANCE i HUETHER, 2018.; KABASHIMA i sur., 2019).



Slika 2. Slojevi epidermisa. Rožnati, svijetli, zrnati, trnasti i bazalni sloj (preuzeto i prilagođeno iz: [BETTS i sur., 2013.]).

Langerhansove stanice je prvi put opisao Paul Langerhans 1868. godine (GIROLOMONI i sur., 2002.; JAITLEY i SARASWATHI, 2012.), a čine 3-6 % svih stanica u epidermi. To su pokretne, antigen prezentirajuće stanice koje potječu iz hemopoetičkih prekursora koštane srži (JAKSITS i sur., 1999.). Podskup su makrofaga koji prebivaju u tkivu i koji stječu fenotip i funkciju sličnu dendritičnim stanicama nakon daljnje diferencijacije u koži. Dendritičke stanice su specijalizirane za prezentaciju antigena u perifernom tkivu, poput kože, gdje djeluju kao imunološki stražari (HANIFFA i sur., 2015.; KABASHIMA i sur., 2019.). Langerhansove stanice su u epidermisu uglavnom smještene između trnastog i zrnatog sloja, ali nešto manje ih ima i u bazalnom sloju i dermisu (KOLARSICK i sur., 2011.).

Melanociti potječu iz neuralnog grebena i migriraju u epidermis gdje se smještaju među bazalnim keranocitima i gdje sintetiziraju i luče melanin, glavni prirodni pigment kože (MORT i sur., 2015.). Melanociti se, osim u epidermisu kože, mogu naći u drugim organima (oko, mozak), a osim dobro poznate zaštitne uloge od utjecaja UV zračenja koje i inducira stvaranje melanina u melanocitima kože, igraju važnu ulogu kao protuupalni čimbenici (pluća), smanjuju oksidativni stres (masno tkivo), važni su za dobar sluh, ravnotežu i dr. (PLONKA i sur., 2009.).

Epidermis sadrži mali udio limfocita (< 1.3 %) Te su stanice prisutne uglavnom u bazalnom sloju, a radi se uglavnom o memorijskim limfocitima T s određenim fenotipskim varijacijama (KANITAKIS, 2002.; KABASHIMA i sur., 2019.).

2.1.2. DERMIS

Dermis je potpuno elastično vezivno tkivo koje se nalazi ispod epidermisa i štiti njegove adneke. Debljina dermisa varira od 1 do 4 mm (MCCANCE i HUETHER, 2018.), ovisno o anatomskom položaju (puno je deblji na leđima ili dlanovima nego na kapcima). U dermisu se nalaze brojna osjetilna tjelešca (mehanoreceptori) kojima primamo osjete dodira i topline, krvne i limfne žile te živčani završeci. Dermis se sastoji se od vlaknastih molekula (kolagena, elastina i retikulina), stanica (fibroblasta, mastocita i makrofaga) i osnovne tvari (sastoji se od glikoproteina i proteoglikana). Na kolagen otpada 70 % suhe mase kože (KOLARSICK i sur., 2011.).

Dermis se sastoji od dva sloja:

- papilarnog sloja (lat. *stratum papillare*) građenog od finih elastičnih i kolagenih vlakana raspoređenih u rahle i labave snopove i u njemu se nalaze sitne krvne žile i živčani završeci
- retikularnog sloja (lat. *stratum reticulare*) sastavljenog od kompaktnih snopova kolagenih vlakana i elastinskih vlakana, a sadrži veće krvne žile, izvodne kanale žlijezda te živce i živčane završetke (KOLARSICK i sur., 2011.).

Postoje specijalizirane strukture povezane s površinskim epidermisom, ali smještene uglavnom unutar dermisa i subdermisa. To različiti receptori, žlijezde znojnice, dlake i žlijezde lojnice čija distribucija i brojnost, između ostalog, ovisi o lokalizaciji na koži. Osim njih, nokti su također jedna od adneksa kože (KOLARSICK i sur., 2011.).

Različita tjelesna osjetila prikupljaju različite informacije iz okoline. Osnovni tipovi podražaja su mehanički (dodir, vibracije, tlak – podatke o njima prikupljaju mehanoreceptori), termalni (toplo i hladno – podatke o temperaturi prikupljaju termoreceptori) i bol (informacije o boli prikupljaju nocireceptori). Brojne su stanice koje omogućuju detekciju navedenih podražaja:

- Merkelove stanice: mehanoreceptori opisani kao „taktilne stanice“ u koži; smještene su u bazalnom sloju epiderme i epitelnom omotaču folikula dlake (KANITAKIS, 2002.)
- Pacinijeva tjelešca: detektiraju duboki pritisak i vibraciju, a nalaze se duboko u dermisu kože (FLEMING i LUO, 2013.)
- Meissnerova tjelešca: maleni jajoliki mehanoreceptori koji omogućavaju detekciju različitih tekstura i nalaze se unutar dermalnih papila (FLEMING i LUO, 2013.)
- Ruffinijeva tjelešca: termoreceptori i mehanoreceptori koji detektiraju rastezanje kože, a koji se nalaze u dermisu kože (FLEMING i LUO, 2013.; [MOLNAR i GAIR, 2015.])
- Krauseova tjelešca: termoreceptori koji omogućuju detekciju hladnoće smješteni u dermisu ([MOLNAR i GAIR, 2015.])
- nociceptori, odnosno receptori boli: periferno lokalizirani neuroni koji upozoravaju na potencijalno oštećujuće podražaje na koži, a aktivira ih bilo koji čimbenik koji oštećuje tkiva (udarac, opekline, distorzija). Svako preintenzivno podraživanje

receptora se također doživljava kao bol (toplina, hladnoća) (DUBIN i PATAPOUTIAN, 2010.).

Žlijezde znojnice su cjevaste egzokrine žlijezde koje luče vodenu tekućinu na površinu kože i prisutne su svuda na koži osim na sluznici. Sastoje se od sekretorne zavojnice i izlučnog kanala te imaju vitalnu ulogu u procesu termoregulacije (GROSCUH, 2002.; KANITAKIS, 2002.).

Dlake su keratinizirajuće strukture koje produciraju dlačni folikli smještene po cijelom tijelu s izuzetkom dlanova, stopala i dijelova genitalija. Njihova veličina i morfologija su promjenjivi. Uz folikul dlake nalazi se glatki mišić uspravljač dlake (lat. *musculus arrector pili*) koji svojom kontrakcijom izaziva uspravljanje dlake povećavajući na taj način toplinsku barijeru (KOLARSICK i sur., 2011.).

Sa svakim foliklom dlake je povezana jedna ili više žlijezda lojnica koje luče loj (sebum) na površinu dlake. Loj ima zaštitnu ulogu: čini dlake i kožu otpornijom na vodu i infekciju. Žlijezde lojnice se ponekad mogu naći na mjestima gdje nema dlačnih folikla i to na mjestima gdje koža prelazi u sluznicu (bradavice, usne, vjeđe i dr.) (MCCANCE i HUETHER, 2018.).

Nokti su rožnate tvorevine koje prekrivaju i štite stražnji dio vrhova prstiju i pripadaju kožnim priložima. Sastoje se od tri dijela: korijena, ploče nokta i slobodnog ruba (KANITAKIS, 2002.).

2.1.3. SUBDERMIS (HIPODERMIS)

Predstavlja najdublji dio kože, potkožje i sastoji se uglavnom od masnog tkiva. Ima važnu ulogu u termoregulaciji, izolaciji, opskrbi energijom (pohrani) i zaštiti od mehaničkih ozljeda te povezuje kožu s mišićima i kostima koji se nalaze ispod ovog sloja. Glavne stanice hipodermisa su adipociti koji su raspoređeni u primarnim i sekundarnim lobulama, čija morfologija može varirati ovisno o spolu i lokalizaciji na tijelu. Lobule su razdvojene pregradama od vezivnog tkiva koje se sastoje od stanica, najdubljih dijelova znojnih žlijezda, krvnih žila i živaca. Postoje 2 tipa adipoznog tkiva u sisavaca: bijelo i smeđe. Stanice smeđeg masnog tkiva se uglavnom razvijaju u embriogenezi, sadrže višeslojne kapljice lipida, bogate su mitohondrijima i energiju otpuštaju u obliku topline,

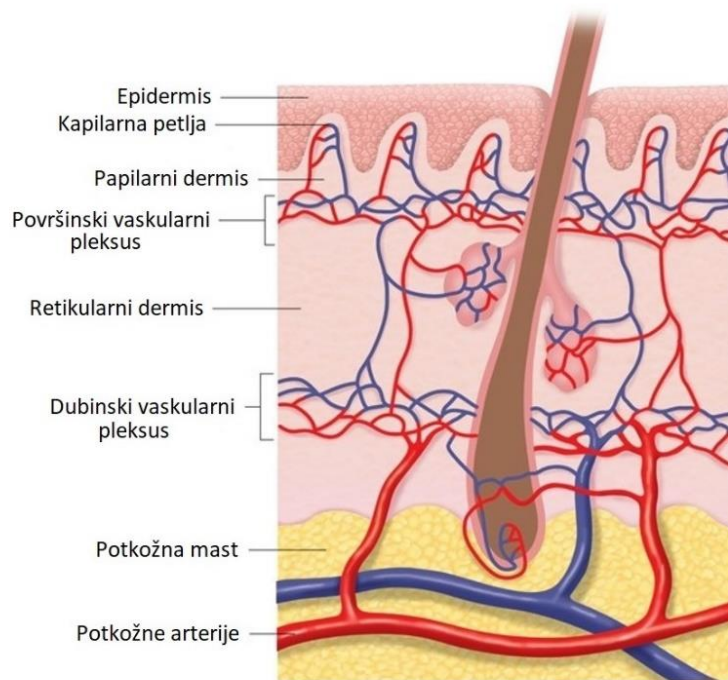
dok je bijelo masno tkivo puno zastupljenije u organizmu, sastavljeno je od velikih adipocita koji sadrže lipide i imaju znatno manje mitohondrija od smeđih adipocita, a osnovna im je funkcija kontrola energetske homeostaze (KANITAKIS, 2002.; ZWICK i sur., 2018.).

2.1.4. KOŽNA CIRKULACIJA

Kardiovaskularni sustav ima izrazito važnu ulogu: dopremanje kisika i hranjivih tvari (glukoza, aminokiseline), uklanjanje ugljičnog dioksida i ostalih štetnih produkata metabolizma, transportiranje hormona i održavanje homeostaze (kemijske, termičke, biološke) (ONO i sur., 2017.).

2.1.4.1. ANATOMIJA KOŽNE CIRKULACIJE

Anatomija kožne cirkulacije i mikrocirkulacije specijalizirana je i povezana je s različitim funkcijama kože. Iz malih se arterija u potkožnom tkivu izdvajaju arteriole koje se granaju i spajaju paralelno s površinom kože, stvarajući tako duboki pleksus donjeg dijela dermisa. Iz njega se izdvajaju arteriole okomito na kožu, gdje se opet granaju i spajaju stvarajući subpapilarni pleksus u gornjem dermisu. Iz malih arteriola subpapilarnog pleksusa izdvajaju se brojne kapilare koje ulaze u svaku dermalnu papilu. Tamo čine kapilarne petlje koje, osim arterijskih, imaju i venske dijelove. Venski dijelovi kapilara se prazne u postkapilarne venule subpapilarnog pleksusa pa u veće venule, a zatim u male vene u potkožnoj masti (Slika 3). I venule se, kao i arteriole, granaju i spajaju na svim razinama dermalne cirkulacije, pogotovo u gornjem dijelu dermisa, što je od velikog funkcionalnog značaja. Naime, u slučaju blokade određenih ruta, na taj se način osiguravaju alternativni kanali kao bi se protok krvi održao (SONKSEN i CRAGGS, 1999.).



Slika 3. Kožna cirkulacija. Dermis sadrži mreže kapilara, pleksuse. Gornja vodoravna mreža je u papilarnom dermisu, dok se donji vodoravni pleksus nalazi se na spoju dermisa i potkožnog tkiva (preuzeto i prilagođeno iz HAMELIN i WONG, 2015.).

Osim kapilarnih petlji, postoje i anastomoze između arteriola i venula (uglavnom u površinskom dermisu), a postoje i specijalizirani arteriovenski spojevi, tzv. glomusna tijela koja se, poput ostalih arteriovenskih anastomoza, uglavnom bave regulacijom temperature. Nalaze se najčešće u dermisu akralne kože (ruke, noge, nos, uši) (SONKSEN i CRAGGS, 1999.). U jagodicama prstiju može ih se naći oko 20-25 po kvadratnom centimetru, a smješteni su otprilike 1-1.5 mm ispod površine kože. Kad su ove specijalizirane anastomoze otvorene, krv prolazi kroz njih pod dovoljnim tlakom da ispuni subpapilarne venule kao i dublje vene pa se na taj način osigurava jednolika izmjena topline (HURLEY i sur., 1956.).

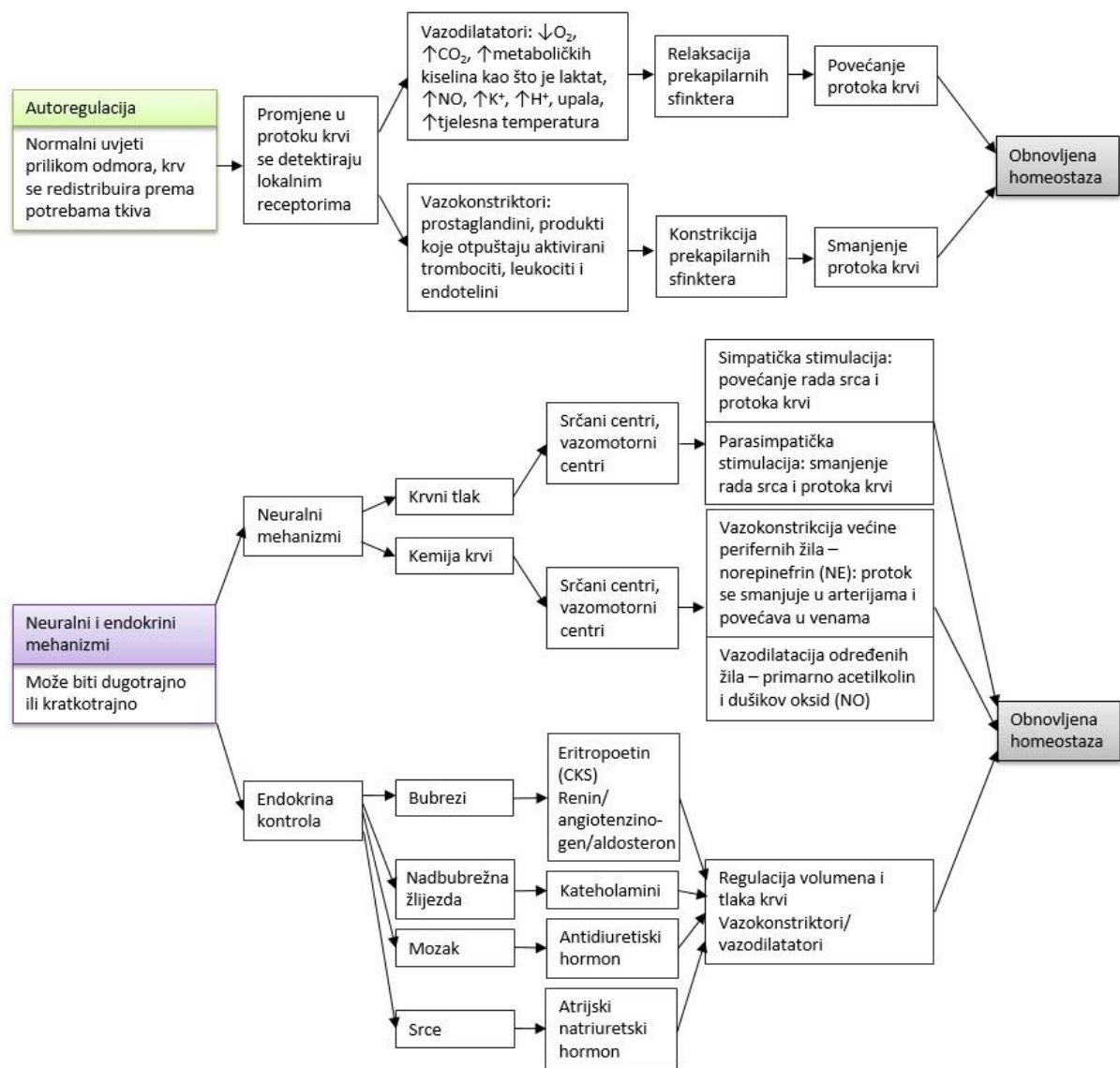
Opskrbu jedne dermalne papile osigurava jedna kapilarna petlja koja ima uzlazni i silazni dio. Kapilarna petlja ima značajke arterijske kapilare (ima bazalnu membranu homogenog izgleda) sve dok silazni dio ne prođe zamišljenu liniju između najdubljih točaka dvaju susjednih grebena gdje se iz intrapapilarnog prostora prelazi u ekstrapapilarni. U tome dijelu, gdje kapilara napušta dermalnu papilu, silazni dio razvija venske karakteristike (višeslojnu bazalnu membranu). Endotelne stanice su najtanje na vrhu kapilarne petlje (BRAVERMAN i YEN, 1977.).

Na mnogim područjima kože, poput podlaktice, dermalne papile slabo su razvijene, a na tim je područjima većina žila horizontalno raspoređena u valovitim linijama. U papilarnom dermisu nalazi se jako puno postkapilarnih venula zahvaljujući čemu imaju veliki potencijalni volumen iz kojeg mogu izmjenjivati toplinu s okolinom. Postkapilarne venule obavljaju važne fiziološke funkcije koje nisu prisutne u ostalim dijelovima mikrocirkulacije. Tu gradijent propusnosti koji započinje u arteriolama, dostiže svoj vrhunac, a zatim se postepeno smanjuje duž vena. Vazoaktivne tvari (histamin, supstancija P, serotonin i bradikinin) u području postkapilarnih venula mogu uzrokovati kontrakciju endotelnih stanica. Ovo je i mjesto dijapedeze (prolaska krvnih stanica kroz neoštećenu kapilarnu membranu u okolno tkivo) leukocita (SONKSEN i CRAGGS, 1999.).

Limfne žile kože također formiraju dva plexusa u blizini krvnih vaskularnih plexusa. Grane iz površinskog plexusa limfnih žila strše u dermalne papile i odvođe se u veće limfne žile u donjem dermisu i površinskoj zoni potkožnog tkiva (HUGGENBERGER i DETMAR, 2011.).

2.1.4.2. KONTROLA KOŽNE CIRKULACIJE

Glavna je funkcija kože regulacija temperature pa se njena mikrocirkulacija sastoji od 85 % protoka krvi u termoregulacijskom sloju i do 15 % protoka krvi u hranjivom kapilarnom prostoru (WOLLINA i sur., 2006.). Iz toga je razloga za njeno uspješno funkcioniranje od velike važnosti imati arterijski sustav s velikim protokom u kombinaciji s velikim kapacitetom venskog sustava male linearne brzine, kako bi se mogla osigurati maksimalna izmjena topline s okolinom. Naime, kod cirkulacije je na arterijskoj strani važan odnos tlaka i protoka, tako da su promjene u tonusima tih žila glavni regulator količine krvi koja teče kroz kožu. Na venskoj strani je važan odnos tlaka i volumena, tako da promjene tonusa regulira volumen kojim teče arterijska krv o čemu ovisi linearna brzina krvi u venskom sustavu. Kontrola cirkulacije kože je jako složena i veliki dio integracije signala vrši se na razini krvnih žila, a ne centralno. Reguliraju je autoregulacijski mehanizmi, faktori koje otpuštaju endotelne stanice, hormoni i neuronski faktori (Slika 4) (SONKSEN i CRAGGS, 1999.).



Slika 4. Regulacija vaskularnog sustava zahvaljujuću autoregulatornim, neuralnim i endokrinim mehanizmima (preuzeto i prilagođeno iz: [LUMEN LEARNING, s. a.]).

Simpatička živčana kontrola kožne cirkulacije uključuje dvije populacije simpatičkih živaca: adrenegičke vazokonstriktorne i aktivne vazodilatacijske živce (uglavnom aktivirane uslijed hipotermije). Oni inerviraju sva područja kože, osim područja kože gdje nema dlaka (dlanovi, stopala, usne) gdje nalazimo samo simpatičke vazokonstriktorske živce. Za takva je područja karakteristično postojanje većeg broja arteriovenoznih anastomoza – područja koja omogućuju veliki protok krvi izravno od arteriola do venula i bogato su inervirana simpatičkim vazokonstriktorskim živcima pa njihovo otvaranje i zatvaranje može izazvati značajne promjene u krvnom protoku. Na područjima kože gdje ima dlaka ima puno manje arteriovenoznih anastomoza, a inervirana

su simpatičkim vazokonstriktorskim i vazodilatorskim živcima (CHARKOUDIAN, 2003.). Simpatički živčani sustav je glavni regulator protoka krvi kroz arterio-venske anastomoze akralnih regija čime ima veliki utjecaj u regulaciji temperature. Isto tako, simpatički neuroni mogu pohranjivati i oslobađati određene vazoregulatorne supstancije: vazokonstriktore noradrenalin, neuropeptid Y i adenzin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*, ATP), koji prvo izaziva vazokonstriktorski učinak, nakon čega se raspada u adenzin koji će izazvati vazodilaciju (SONKSEN i CRAGGS, 1999.). Parasimpatički živčani sustav ima malu ulogu u regulaciji cirkulacije (njegova stimulacija smanjuje srčanu frekvenciju) (ROBINSON i sur., 1966.).

Perivaskularni živci sadrže senzorna i simpatička vlakna, a djeluju uglavnom u vezivnom tkivu koje okružuje žile i u mišićnom sloju. Lokalni aksonski refleksi koji uključuju senzorna i simpatička vlakna su odgovorni za promjene u vaskularnom tonusu kao reakcija na različite podražaje (SONKSEN i CRAGGS, 1999.).

Endotelne stanice mogu oslobađati različite faktore poput faktora opuštanja nastalog iz endotela (engl. *endothelium-derived relaxing factor*, EDRF) i dušikovog monoksida (engl. *nitric oxide*, NO) što doprinosi vaskularnom tonusu. NO difundira od endotelnih stanica do stanica glatkih mišića gdje izaziva vazodilaciju aktiviranjem topljive gvanilat ciklaze koja stvara ciklički gvanozin-monofosfat (engl. *cyclic guanosine monophosphate*, cGMP). Otpuštanje NO mogu potaknuti različite vazoaktivne supstancije (ATP, supstancija P, bradikinin, histamin), kao i mehaničko rastezanje ili hipoksija. Osim toga, endotelne stanice mogu skladištiti i otpuštati mnoge od tih vazoaktivnih tvari (acetil kolin, ATP, supstancija P, 5-hidroksitriptamin – serotonin) (BURNSTOCK i RALEVIC, 1994.). Endotel oslobađa i vazodilatator faktor hiperpolarizacije nastao iz endotela (engl. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF) koji uzrokuje opuštanje glatkih mišića hiperpolarizacijom membrane. Endotel može oslobađati i faktore koji posreduju vazokonstrikciju, poput endotelina i metabolita arahidonske kiseline koji se otpuštaju kao odgovor na stimulaciju noradrenalinom, trombinom ili visokim koncentracijama izvanstaničnog kalija (SKAGEN i sur., 1981.).

2.1.5. KOŽA ŠTAKORA

Štakori i miševi su najčešće korišteni *in vivo* modeli za proučavanje okolišnih ugroza i patogena povezanih s kožom. Postoje određene razlike između kože ljudi i glodavaca: koži glodavaca nedostaju višeslojna epiderma, ekrina i apokrina žlijezda te papilarna, retikularna i hipodermalna područja dermalnog sloja. Razlike su uočene i u građi imunološkog sustava, a interakcije između stanica imunološkog sustava i kože igraju značajnu ulogu u moduliranju imunološkog odgovora (AGARWAL i sur., 2020.).

Epidermis kod štakora je nešto tanji zbog gusto raspoređenih dlaka koje služe kao toplinska izolacija i prekrivaju veliki dio tijela. Kod štakora postoje i osjetilne dlačice (lat. *vibrissae*) koje im, između ostalog, olakšavaju orijentaciju i lokalizirane su na nekoliko mjesta na tijelu, a najviše ih je na njuški. Folikuli osjetilnih dlaka su dobro prokrvljeni i bogati živcima. Oko folikula se nalaze žlijezde lojnice (PRESCOTT i sur., 2011.).

Dermis je građen od širokog sloja vezivnog tkiva sastavljenog od krutih kolagenih vlakana, a sadrži krvne i limfne žile, živce, lojne žlijezde i korijene dlaka. Kod štakora su znojne žlijezde smještene samo u jastučićima za stopala jer pomažu prilikom povećane temperature okoliša (JUNG i MAIBACH, 2014.).

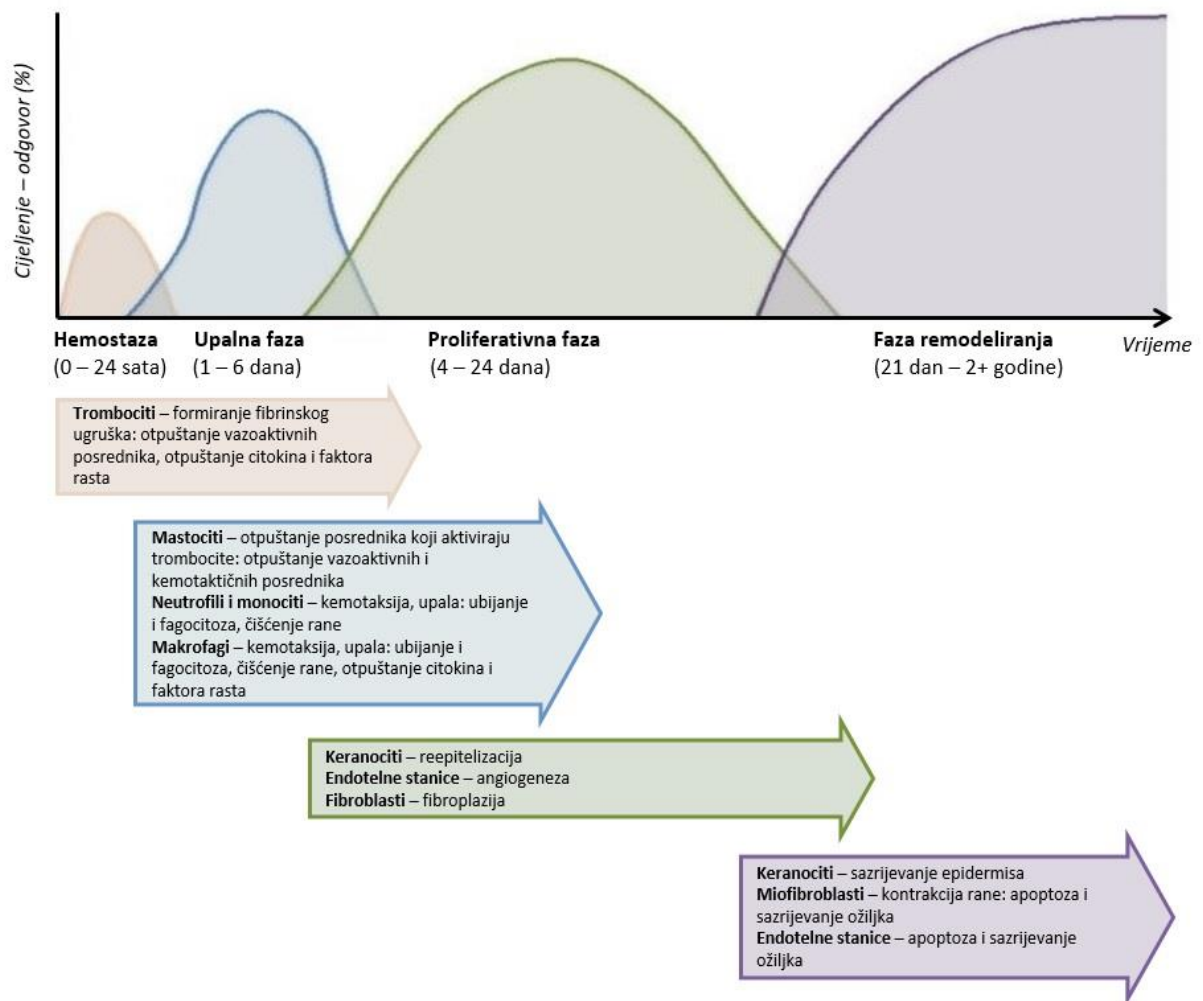
Ispod dermisa nalazi se subdermis koji povezuje kožu s mišićima i kostima, a sastoji se od nešto vezivnog tkiva isprepletenog s (bijelim) masnim tkivom. Kod štakora se smeđe masno tkivo nalazi između lopatica i u dorzocervikalnoj regiji, u području aksile i u području abdomena (oko bubrega) (OELKRUG i sur., 2015.; SCHOETTL i sur., 2018.).

2.2. CIJELJENJE RANA

Cijeljenje je odgovor organizma na ozljedu tkiva. Cijeljenje je složena kaskada događaja koji nisu jasno odijeljeni, već interferiraju i uključuju složeno međudjelovanje različitih tipova stanica, posrednika i citokina te krvožilnog sustava. Kod cijeljenja razlikujemo nekoliko faza:

- hemostazu, fazu koja nastupa neposredno nakon ozljede i u kojoj se događa vazokonstrikcija, odnosno koagulacija

- upalnu fazu koja započinje brzo i traje od nekoliko sati do nekoliko dana za akutne rane
- proliferativnu fazu koja uključuje staničnu proliferaciju i sintezu elemenata koji čine izvanstanični matriks te rezultira formacijom granulacijskog tkiva
- fazu remodeliranja ili pregradnje, odnosno maturacijsku fazu u kojoj se granulacijsko tkivo zamjenjuje ožiljkom kroz sljedeći mjesec ili više dana (Slika 5) (TAKEO i sur., 2015.; GONZALEZ i sur., 2016.).



Slika 5. Cijeljenje, glavne stanice i njihovi učinci. Uobičajeni proces cijeljenja tkiva sastoji se od nekoliko kontinuiranih i preklapajućih faza različitog trajanja: hemostaze, upalne faze, proliferativne faze i faze remodeliranja. Svaka se faza sastoji od različitih staničnih događaja koji zahtijevaju međusobno djelovanje više staničnih populacija (preuzeto i prilagođeno iz: LI i sur., 2007.; THAN i sur., 2017.).

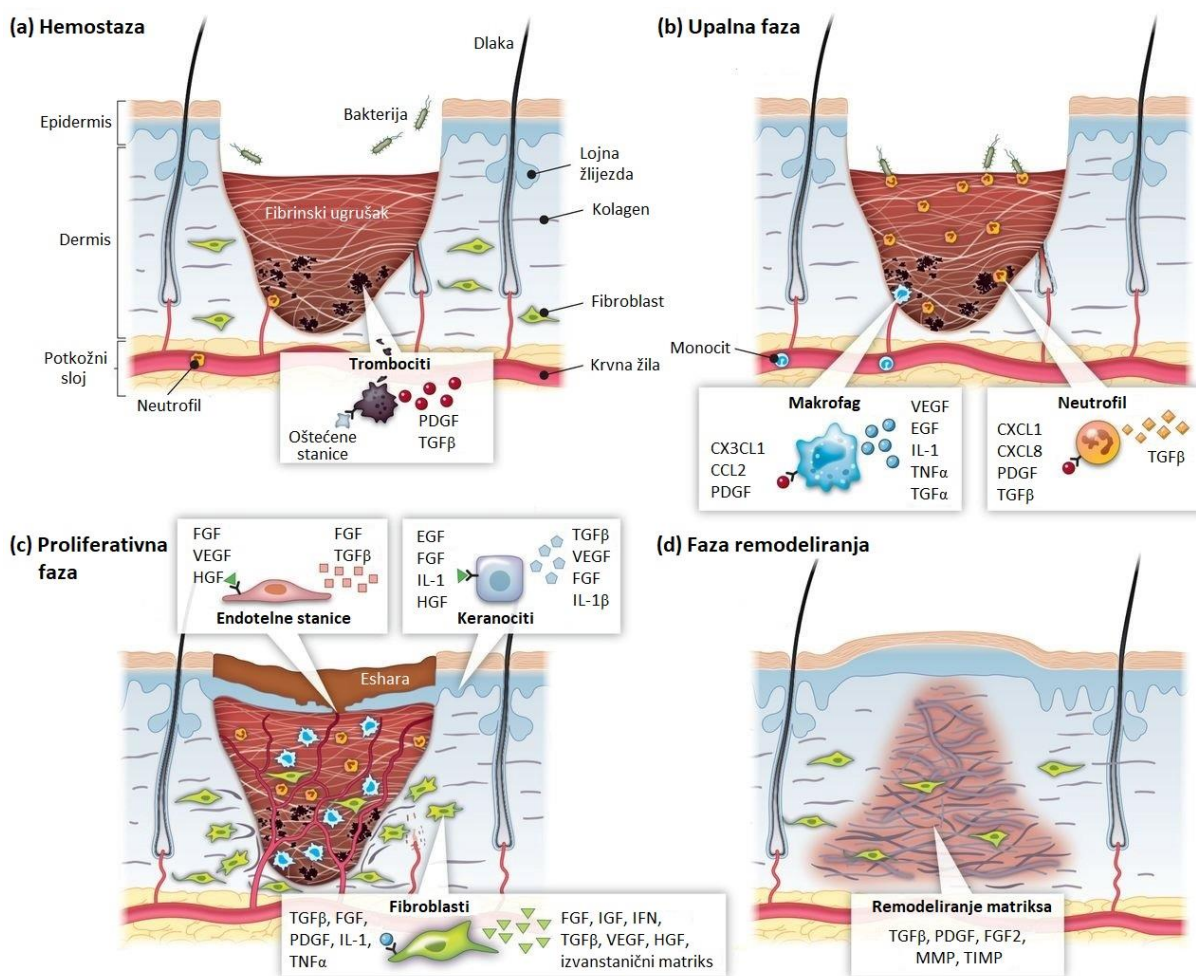
Ukratko, cijeljenje tkiva je postupak u kojem faktori rasta uzrokuju proliferaciju stanica, što dovodi do integracije dinamičnih promjena koje uključuju topljive medijatore, krvne stanice, proizvodnju izvanstaničnog matriksa i proliferaciju parenhimskih stanica (GONZALEZ i sur., 2016.). Postupak zarastanja kože ilustrira principe popravljivanja za većinu tkiva. Kod cijeljenja tkiva događa se regeneracija – zamjena uništenog tkiva funkcionalnim parenhimskim stanicama ishodišnog tkiva i/ili reparacija – stvaranje ožiljka gdje se funkcionalno tkivo nadomješta vezivnim tkivom. Kod cijeljenja kože događaju se oba spomenuta procesa (MARTIN, 1997.).

2.2.1. HEMOSTAZA

Ozljeda kože podrazumijeva različite mehaničke i kemijske događaje: stanice na rubu rane pucaju, kao i žile u blizini rane (SHAW i MARTIN, 2009.).

Jedan od najranijih odgovora na ozljedu proizlazi iz oštećenja nanesenih lokalnim krvnim žilama. Krv ulazi u područje rane što je potrebno što prije zaustaviti. To se postiže vazokonstrikcijom oštećenih žila te humoralnim i staničnim sastojcima, poput fibrinogena i trombocita koji zaustavljaju gubitak krvi i zaduženi su za dodatno signaliziranje koje doprinosi cijeljenju (KAWASUMI i sur., 2013.). Fibrinogen formira fibrinske mrežice koje hvataju trombocite koji se nakupljaju na mjestima oštećenja krvnih žila sprječavajući daljnji gubitak krvi. Kako trombociti dolaze u kontakt s komponentama oštećenog izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM), oslobađaju faktore koagulacije, što dovodi do stvaranja krvnih ugrušaka na ozlijeđenom tkivu (TAKEO i sur., 2015.). Otpuštaju se raznovrsni kemokini i faktori rasta kao što su faktor rasta dobiven iz trombocita (engl. *platelet-derived growth factor*, PDGF), faktor rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor*, VEGF/VPF), transformirajući faktor rasta β (engl. *transforming growth factor β* , TGF- β), bazični faktor rasta fibroblasta (engl. *basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor-2*, bFGF/FGF2) i faktor trombocita 4 (engl. *platelet factor-4*, PF4). Navedeni faktori rasta potiču različite aspekte cijeljenja jer daju kemotaktični znak za privlačenje cirkulirajućih upalnih stanica na mjesto rane, iniciraju reepitelizaciju i kontrakciju vezivnog tkiva, potiču migraciju keratinocita i fibroblasta te stimuliraju angiogeni odgovor (Slika 6) (MARTIN, 1997.; BAHOU i GNATENKO, 2004.; BARRIENTOS i sur., 2008.).

Ugrušak se sastoji od trombocita ugrađenih u mrežicu umreženih fibrinskih vlakana, fibronektina, vitronektina i trombospondina, a osim što pomaže u sprječavanju gubitka krvi, služi i kao rezervoar citokina i faktora rasta koji se oslobađaju kada se aktivirani trombociti degranuliraju te kao privremeni medij kroz koji mogu prolaziti stanice tijekom procesa cijeljenja što vraća koži funkciju zaštitne barijere i njenu cjelovitost (MARTIN, 1997.; GONZALEZ i sur. 2016.).



Slika 6. Faze cijeljenja. Svaku od faza cijeljenja: (A) hemostazu, (B) upalnu fazu, (C) proliferativnu fazu i (D) fazu remodeliranja karakteriziraju ključni molekularni i stanični događaji, a koordinira ih veliki broj faktora koje stanice prepoznaju i oslobađaju: PDGF, TGF, FGF, IL-1, TNF, KGF (faktor rasta keranocita, engl. *keratinocyte growth factor*), IGF (faktor rasta nalik inzulinu, engl. *insulin-like growth factor*), IFN, VEGF, HGF, MMP, TIMP TIMP (tkivni inhibitori metaloproteinaza, engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase*) i dr. (preuzeto i prilagođeno iz: SUN i sur., 2014.).

Stanice koje su oštećene u stresu reagiraju kroz nekoliko minuta aktiviranjem nekoliko različitih signalnih putova kao što su, primjerice, signalni put c-Jun N-terminalne kinaze (engl. *c-Jun-N-terminal kinase*, JNK) – proteinske kinaze SAPK aktivirane stresom (engl. *stress-activated-protein-kinase*, SAPK) i signalni put MAP-kinaze p38 (SHAW i MARTIN, 2009.). Radi se o signalnim putovima proteinskih kinaza aktiviranih mitogenima (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK). MAPK su važna grupa serinskih/treoninskih signalnih kinaza koje modulacijom svoje fosforilacije, a time i aktivacijskog statusa transkripcijskih faktora, povezuju transmembransku signalizaciju s indukcijom gena u jezgri (KOBAYASHI i sur., 2003.). Aktivacija tih putova rezultira kaskadnom fosforilacijom niza signalnih molekula, što na kraju dovodi do različitih staničnih promjena, uključujući promjene u ekspresiji gena, staničnom preživljavanju i metabolizmu. Stanice koje su u stresu propuštaju endogene molekule, uključujući molekule povezane s oštećenjem (engl. *damage-associated molecular pattern molecules*, DAMPs), koje mogu djelovati kao aktivatori, odnosno kao kemotaktički faktori za ostale stanice u tom području (SHAW i MARTIN, 2009.).

Ostali događaji koji mogu utjecati na stanice u području rane uključuju mehaničke signale poput istezanja koje se javlja kao odgovor na promjenu napetosti tkiva, električne struje koje nastaju uslijed oštećenja membrane i pucanja epitelnog barijere te izloženost raznim mikroorganizmima čiji su epitopi uglavnom prepoznati zahvaljujući tzv. „Toll-like“ receptorima (engl. *toll-like receptors*, TLR). Aktivacija TLR epitelnih stanica pokreće ekspresiju i oslobađanje proupalnih medijatora i antimikrobnih peptida (SHAW i MARTIN, 2009.).

2.2.2. UPALNA FAZA

Upala je lokalizirani zaštitni odgovor tkiva koji se javlja kao odgovor na ranu. Upalni odgovor započinje odmah nakon ranjavanja, uslijed naviranja cirkulirajućih leukocita (uglavnom neutrofila) iz oštećenih krvnih žila u ranu. Upalne stanice otpuštaju citokine (između ostalih, i one koji reguliraju angiogenezu), faktore rasta, NO, ali isto tako proizvode i velike količine antimikrobnih tvari, poput reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS), kationskih peptida i proteaza (TONNESEN i sur., 2000.; SHAW i MARTIN, 2009.; GONZALEZ i sur., 2016.). Javlja se i brza reakcija

imunoloških stanica već prisutnih u tkivu: mastocita, gama-delta $\gamma\delta$ T stanica i Langerhansovih stanica, koje otpuštaju kemokine i citokine (GONZALEZ i sur., 2016.). Krvne žile i, u nešto manjoj mjeri, limfne žile bitno pridonose kardinalnim znakovima upale: proširene i hiperpropusne krvne žile uzrokuju prekomjerni eksudat koji prelazi kapacitet odvodnje tekućine iz limfnih žila (HUGGENBERGER i DETMAR, 2011.).

Upalni odgovor se nastavlja regrutiranjem neutrofila, a potom i monocita koji sazrijevaju u makrofage zahvaljujući aktivaciji proupalnim citokinima interleukinom 1β (IL- 1β), faktorom tumorske nekroze α (engl. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), monocitnim kemoatraktantnim proteinom 1 (engl. *monocyte chemoattractant protein 1*, MCP1) i interferonom γ (IFN- γ) iz okolnih stanica na mjestu lezije i seruma te stranim epitopima patogena. Ti signali pokreću aktivaciju endotelnih stanica koje su prisutne u stijenkama krvnih kapilara na način da promoviraju ekspresiju različitih adhezijskih molekula (selektina i integrina) koje su važan faktor dijapedeze leukocita. Neutrofili se vežu na zid žile i na taj način prijeđu endotelnu barijeru što je olakšano zahvaljujući dilataciji žila i povećanoj vaskularnoj propusnosti, stanjima koja su nastupila uslijed djelovanja NO povezanog s upalom, histamina iz mastocita i dr. faktorima. Navedeni citokini dovode i do aktivacije faktora koji reagira na serum (engl. *serum response factor*, SRF) koji se veže i inducira transkripciju određenih gena: protoonkogen *FOS* i gena faktora ranog odgovora na rast $1/2$ (engl. *early growth response 1/2*, *EGR1/2*). Transkripcijske studije pokazale su iznimno brzi odgovor na ozljede u kojem se u roku od sat vremena od oštećenja poveća ili smanji regulacija (ekspresija) nekoliko stotina gena (SHAW i MARTIN, 2009.; GONZALEZ i sur., 2016.).

Makrofagi obavljaju funkcije fagocitoze staničnih krhotina, kao i proizvodnju i oslobađanje citokina i proangiogenih, upalnih i fibrogenih faktora te slobodnih radikala. Makrofagi nakon izlučivanja kemotaktičkih faktora privlače druge upalne stanice na područje rane. Proizvode i prostaglandine koji djeluju kao vazodilatatori i utječu na propusnost mikro-krvnih žila. Ti faktori uzrokuju aktivaciju endotelnih stanica koje također proizvode PDGF, TGF- β , FGF – faktor rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor*) i VEGF, važne za poticanje stvaranja granulacijskog tkiva i za prijelaz iz eksudativne u proliferativnu fazu cijeljenja tkiva (GONZALEZ i sur., 2016.).

2.2.3. PROLIFERATIVNA FAZA

Cilj proliferativne faze je smanjiti područje rane kontrakcijom i fibroplazijom tkiva, uspostavljajući održivu epitelnu barijeru za aktiviranje keratinocita. Ta je faza odgovorna za zatvaranje same lezije, što uključuje angiogenezu, fibroplaziju i reepitelizaciju. Ovi procesi započinju u mikropodručju lezije unutar prvih 48 sati i mogu se odvijati do 14. dana nakon početka lezije (GONZALEZ i sur., 2016.).

Ugrušak, odnosno krasta koja se formira tijekom brzog odgovora na ozljedu, je privremeni mehanizam za vraćanje funkcije kože kao zaštitne barijere. Proliferativna faza uključuje akcije stanica kojima je cilj postizanje trajnog zatvaranja rane i nadoknađivanje izgubljenog tkiva. Ovi se postupci pokreću kroz nekoliko sati, ali vrijeme potrebno za cijeljenje jako ovisi o veličini rane, njenoj lokalizaciji, dobi, zdravlju tkiva i dr. faktorima (SHAW i MARTIN, 2009.; GUO i DIPIETRO, 2010.). Stroma koja zamjenjuje fibrinski ugrušak naziva se granulacijsko tkivo, a sastoji se od fibroblasta iz više izvora (cirkulirajući fibrociti, fibrociti iz zdravog dermisa na rubu rane i iz progenitorskih stanica koštane srži), kolagena i elastina. Fibroblasti u neposrednoj blizini rane reagiraju formiranjem slabo kontraktilnih snopova aktina koji omogućuju stezanje vezivnog tkiva. Kontraktilnost snopova znatno se poboljšava nakon njihove diferencijacije u miofibroblaste zahvaljujući djelovanju faktora rasta (TGF β 1), ECM i/ili mehaničkog stresa. Na taj način fibroblasti rana i miofibroblasti pomažu zatvaranje rane i stvaraju mrežu vezivnog tkiva sastavljenu uglavnom od kolagenih vlakana, primarnog sastojka ožiljnog tkiva (SHAW i MARTIN, 2009.; GONZALEZ i sur., 2016.).

Reepitelizacija rane keranocitima se postiže kombinacijom migracije i proliferacije stanica u blizini oštećenja. Stanice epidermisa rane migriraju zajedno nakon što su prošle brojne promjene koje su im olakšale kretanje u pokušaju da zatvore ranu. Mijenja se adhezija stanica-stanica i stanica-matriksa kako bi se omogućila njihova progresija kroz privremene supstrate matriksa koji čine ugrušak (kolagen i fibronektin). Stanice koje migriraju također sastavljaju lamelarne izbočine za puzanje bogate aktinima i pojačavaju ekspresiju proteolitičkih enzima kao što su metaloproteinaze matriksa (engl. *matrix metalloproteinase*, MMP) što im omogućuje prolazak između kraste i cjelovitog tkiva. Kao odgovor na ozljedu, matične stanice bulbusa folikula dlake razvijaju epidermalni fenotip te

migriraju u epidermu kako bi sudjelovale u postupku popravljjanja (SHAW i MARTIN, 2009.; GONZALEZ i sur., 2016.).

Usljed oštećenja i vaskularne pregradnje događaju se promjene u protoku krvi radi ponovne uspostave transporta tekućine, kisika, hranjivih sastojaka i imunokompetentnih stanica, a u izvanstaničnom matriksu rane se pokreće proces angiogeneze. Makrofagi (lučenjem IL-1 i TNF- α) i fibroblasti (lučenjem KGF-2 i TGF- β) stimuliraju keranocite koji ekspimiraju VEGF što uzrokuje proliferaciju endotelnih stanica i formiranje kapilara. Uz aktivno sudjelovanje limfocita i endotelnih stanica, u ovom biološkom procesu su jako važni i periciti koji čine skupinu stanica koja proizlazi iz mezenhimalne linije glatkih mišićnih stanica. Javljaju se kao zasebne cjeline dijeleći bazalnu membranu krvnih žila i endotelnih stanica. Periciti su stanice vezivnog tkiva koje sadrže duga i tanka citoplazmatska proširenja koja okružuju endotelnu cijev krvnih kapilara i malih venula u koje se kapilare prazne. Periciti su važni za strukturni integritet krvnih žila, a mogu i oslobađati faktore koji potiču diferencijaciju ili suradnju endotelnih stanica. Periciti zadržavaju mezenhimalni potencijal i predstavljaju važan izvor stanične rezerve. (BROUGHTON i sur., 2006.; VELNAR i sur., 2009.; GONZALEZ i sur., 2016.).

2.2.4. FAZA REMODELIRANJA

Posljednja faza cijeljenja sastoji se od remodeliranja, koje započinje dva do tri tjedna nakon početka lezije i može trajati godinu dana pa čak i dulje. Osnovni cilj je postići maksimalnu vlačnu čvrstoću kroz reorganizaciju, degradaciju i resintezu izvanstaničnog matriksa. U ovoj se fazi pokušava vratiti normalna struktura tkiva, a granulacijsko tkivo se postepeno preuređuje, formirajući ožiljak koji ima manje stanica i krvnih žila i koji pokazuje povećanje koncentracije kolagenih vlakana. Čim je površina lezije prekrivena jednim slojem keratinocita, prestaje njezina epidermalna migracija i ponovno se uspostavlja nova slojevit epiderma s podzemnom bazalnom laminom od granica rane do njezina unutarnjeg dijela. U fazi remodeliranja dolazi do taloženja matriksa i promjene u njegovom sastavu: kolagen III (koji ne doprinosi značajno čvrstoći) se zamijenjuje kolagenom I, a hijaluronska kiselina i fibronektin se razgrađuju zahvaljujući stanicama i plazmatskoj metaloproteinazi. Kolagena vlakna postaju gušća i postavljaju se paralelno, a vlačna čvrstoća tkiva rane se povećava proporcionalno s njihovim depozitom te može

dosegnuti oko 80 % čvrstoće zdravoga tkiva što uvelike ovisi i o lokalizaciji rane i trajanju cijeljenja (VELNAR i sur., 2009.; GONZALEZ i sur., 2016.).

Rezolucijska faza neophodna je za vraćanje funkcionalnosti oštećenog tkiva. U njoj sudjeluju brojni regulatori poput TGF- β , TNF- α i IL-6 koji utječu na sintezu kolagena, TIMP, odnosno MMP. Tijekom procesa sazrijevanja i remodeliranja, većina krvnih žila, fibroblasta i upalnih stanica nestaje s područja rane zbog emigracijskih procesa, apoptoze ili drugih mehanizama stanične smrti. Ta činjenica dovodi do stvaranja ožiljaka sa smanjenim brojem stanica (BROUGHTON i sur., 2006.; GONZALEZ i sur., 2016.).

Sve navedene procese i događaje mogu modulirati egzogeni i endogeni faktori čime utječu na proces cijeljenja pa je moguća pojava hipertrofičnih ožiljaka i keloida (GONZALEZ i sur., 2016.).

2.2.5. PROBLEMI U CIJELJENJU RANA

Koža ima značajan kapacitet za obnovu i popravak tkiva, čineći cijeljenje rana koordiniranom kaskadom molekularnih i staničnih događaja. Ipak, nekoliko čimbenika može dovesti do produljenog vremena cijeljenja ili čak do neuspjeha u zacjeljivanju rana. Takvi uvjeti dovode do nastanka kronične rane. Čimbenici koji doprinose otežanom cijeljenju uključuju stariju životnu dob, problematičnu lokalizaciju rane, hipoksiju, nedostatak hranjivih tvari, narušenu imunološko-endokrinu funkciju, određenu terapiju, pretilost, dijabetes i druge kronične bolesti te infekcije (MILLER i NANCHAHAL, 2005.; SOOD i sur., 2014.).

Starenjem tkivo postaje manje elastično i otporno i ima negativan utjecaj na određene faze cijeljenja rane: agregaciju trombocita, infiltraciju makrofaga i limfocita, oslobađanje faktora rasta, angiogenezu, epitelizaciju, taloženje kolagena i preoblikovanje (GOSAIN i DIPIETRO, 2004.; GUO i DIPIETRO, 2010.).

Rane u vaskulariziranim područjima i područjima smanjene pokretljivosti i napetosti brže zacjeljuju od onih područja koja su manje prokrvljena i podnose više kretanja i napetosti. Bilo koje stanje koje mijenja protok krvi, poput ishemije ili edema, može utjecati na distribuciju hranjivih tvari i imunološki sustav, prije svega zato što

organizam pokazuje smanjenu sposobnost transporta obrambenih stanica, ometajući proces ozdravljenja (ALBERTI i sur., 2017.).

Umjerena hipoksija nakon lezije tkiva aktivira faktore koji će potaknuti sanaciju rane. Međutim, dugotrajni nedostatak kisika odgađa zacjeljivanje rana povećanjem razine ROS koja nadilazi njihove blagotvorne učinke, ometajući postupak cijeljenja. Smanjena migracija neutrofila utječe na antimikrobno djelovanje na mjestu rane, a suzbija se i funkcija limfocita, citotoksičnost prirodnoubilačkih (engl. *natural killer*, NK) stanica i proizvodnja IL-1. Osim pušenja, akutno izlaganje alkoholu također kompromitira upalnu fazu zarastanja rane, inhibirajući zatvaranje lezija, angiogenezu, proizvodnju kolagena i ravnotežu proteaza u mjestu lezije (GUO i DIPIETRO, 2010.; ALBERTI i sur., 2017.).

Nedostatak hranjivih tvari može usporiti proces cijeljenja jer suprimira imunološki sustav i smanjuje sintezu različitih komponenti novostvorenog tkiva. Manjak proteina i vitamina najvažniji je jer izravno utječu na sintezu kolagena. Među osnovnim potrebnim aminokiselinama je arginin (modulira imunološki sustav, zacjeljivanje rana i krvožilni tonus) koji je i prekursor za prolin (neophodan za taloženje kolagena i angiogenezu). Važan je i glutamin, glavni izvor energije koji omogućuje brzu proliferaciju stanica poput fibroblasta, limfocita, makrofaga i epitelnih stanica. Mikronutrijenti su isto tako značajni: cink je kofaktor za polimeraze ribonukleinskih kiselina (engl. *ribonucleic acid*, RNA) i deoksiribonukleinskih kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) i enzime važne za cijeljenje kao što je MMP. Bakar, magnezij i željezo (umrežavanje, odnosno sinteza kolagena) su također od iznimne važnosti za proces cijeljenja. Neke bolesti jetre mijenjaju metabolizam cinka, dok bubrežni poremećaji mogu otežati popravak tkiva raznim mehanizmima, kao što su deregulacija pH i elektrolita, pojava edema, ureinskih toksina ili kalcifikata (GUO i DIPIETRO, 2010.; ALBERTI i sur., 2017.).

Imunonološko-endokrina ravnoteža ključna je za održavanje zdravlja. Neki adrenokortikotropni hormoni (kortizol, prolaktin) pojačavaju sintezu glukokortikoida i smanjuju sintezu proupalnih faktora i citokina. Hipotireoza rezultira taloženjem dermalnih mukopolisaharida, poput hijaluronske kiseline čime utječe na sintezu ECM-a i cijeljenje rane. Stres i povezani poremećaji kao što su metabolički sindrom, kardiovaskularne bolesti, pretilost i dijabetes dovode se u vezu s poremećajem imunološko-endokrine ravnoteže (GUO i DIPIETRO, 2010.; ALBERTI i sur., 2017.).

Određeni lijekovi kao što su kortikosteroidi i postupci poput radioterapije mogu otežati zarastanje rana jer smanjuju normalan imunološki odgovor na lezije, ugrožavajući imunitet i povećavajući osjetljivost na sepsu i oštećenje tkiva. Primjerice, ionizirajuće zračenje uzrokuje neadekvatnu perfuziju i slabije taloženje ECM-a. Veliki broj kemoterapeutika inhibira metabolizam stanica, brzu staničnu diobu, angiogenezu i brojne putove za popravak tkiva (ROBSON i sur., 2001.; ALBERTI i sur., 2017.).

Pretilost je jedan od faktora koji može otežati cijeljenje. Naime, adipociti i susjedni im makrofagi također proizvode bioaktivne molekule poput citokina, adiponektina i rezistina koji imaju negativan utjecaj na imunološku i upalnu reakciju, što utječe na proces zarastanja rana. Pretilost je povezana s višom razinom citokina (IL-1 β , IL-6) i TNF- α i nižom proliferacijom limfocita (ALBERTI i sur., 2017.; WANG i HE, 2018.).

Šećerna bolest (lat. *diabetes mellitus*) također može utjecati na proces zacjeljivanja rana različitim biološkim mehanizmima, djelujući na staničnu signalizaciju i inhibirajući odgovor, što uzrokuje smanjeni periferni protok, kao i lokalnu angiogenezu i regeneraciju tkiva. Hiperglikemija povećava proizvodnju ROS-a, a signalna kaskada inzulina mijenja otpuštanje faktora rasta. Visoka razina MMP kod dijabetičara također pridonosi oštećivanju tkiva, a jedan od najozbiljnijih problema ljudi s dijabetesom je upravo oslabljeno zacjeljivanje rana (ALBERTI i sur., 2017.).

Smanjeni imunološki odgovor uzrokovan različitim faktorima također može rezultirati smanjenim uklanjanjem bakterija na mjestu lezije. Bakterijska se infekcija često događa u kompromitiranom tkivu (nekroza, strano tijelo ili ožiljak). Bakterije i endotoksini produžuju i pojačavaju proizvodnju protuupalnih citokina, a dulje trajanje upalne faze može dovesti do kroničnog stanja rane (GUO i DIPIETRO, 2010.; ALBERTI i sur., 2017.).

Pojedinci s bilo kojim medicinskim stanjem koje smanjuje sposobnost zarastanja rana ili oni koji imaju kronične rane trebaju napredne metode za poboljšanje zacjeljivanja rana (ALBERTI i sur., 2017.).

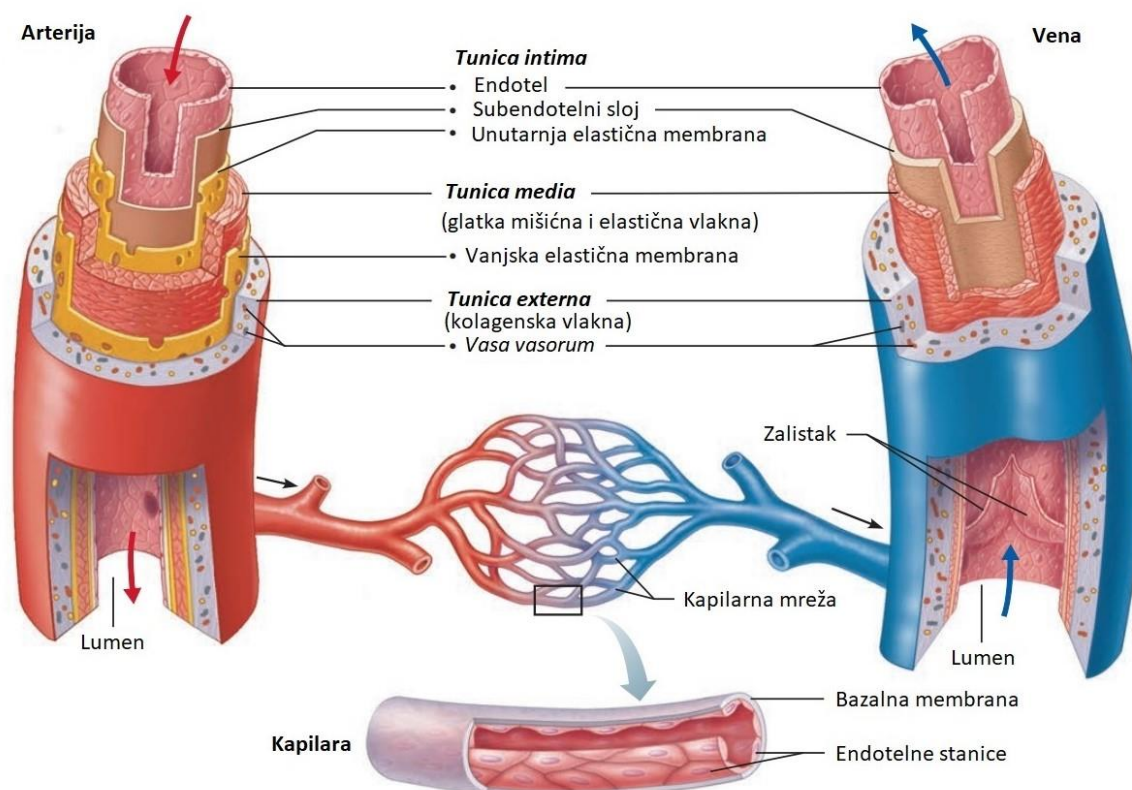
2.3. ANGIOGENEZA

Nastanak novih krvnih žila iz već postojećih se naziva angiogenezom (FOLKMAN, 1984.).

2.3.1. KRVOŽILNI SUSTAV

Prvi funkcionalni organski sustav koji nastaje u kralješnjaka je krvožilni sustav. Krvožilni sustav sudjeluje u mnogim ključnim fiziološkim zadacima, uključujući oksigenaciju tkiva, isporuku hranjivih tvari i uklanjanje otpada, imunološki odgovor, regulaciju temperature i održavanje krvnog tlaka (PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.).

Tri su osnovna tipa krvnih žila: arterije koje odvođe krv iz srca, kapilare kojima se odvija izmjena tvari između krvi i tkiva i vene kojima se krv iz kapilara prenosi do srca. Sve krvne žile su svojom građom prilagođene fiziološkim potrebama i funkciji koju obavljaju. Kapilare su cjevčice formirane od endotelnih stanica koje podupiru vaskularni periciti. Arterije i vene su cijevi koje se sastoje od više slojeva: unutarnjeg (lat. *tunica intima*) koja se sastoji od endotelnih stanica, pericita i bazalne membrane, srednjeg (lat. *tunica media*) koji se uglavnom sastoji od stanica glatkih mišića i izvanstaničnog matriksa i vanjskog sloja (lat. *tunica adventitia*) koji se uglavnom sastoji od fibroblasta i njihovog izvanstaničnog matriksa (Slika 7) (SEMENZA, 2007.).



Slika 7. Struktura arterija, vena i kapilara (preuzeto i prilagođeno iz: MARIEB, E. N. i K. HOEHN, 2016.).

2.3.2. RAST I RAZVOJ KRVNIH ŽILA

Precizna koordinacija staničnih događaja omogućuje stvaranje i modificiranje krvožilnog sustava za što je jako važna signalizacija brojnih molekula (PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.). Rast krvnih žila je od iznimne važnosti i za cijeljenje tkiva (MILLER i NANCHAHAL, 2005.). Vaskulatura nastaje kroz tri glavna stanična procesa: vaskulogeneza, angiogeneza i arteriogeneza, od čega su prva dva zaslužna za nastanak novih krvnih žila (SEMENZA, 2007.).

Vaskulogeneza je definirana kao diferencijacija endotelних prekursorskih stanica – angioblasta u endotelne stanice i *de novo* formiranje primitivne vaskularne mreže, odnosno primarnog vaskularnog plexusa (RISAU i FLAMME, 1995.). Angiogeneza se formiraju nove kapilare iz postojeće vaskulature što omogućuje dramatično širenje vaskularnog plexusa, dok arteriogeneza uključuje povećanje promjera arterijskih žila kao odgovor na pojačani protok krvi (HEIL i sur., 2006.).

Formiranje početnog vaskularnog pleksusa unutar svakog tkiva, kao i kasnije formiranje glavnih krvnih žila koje vode krv u srce i iz srca događa se po ustaljenom protokolu neovisno o koncentraciji kisika. Međutim, uzorak kapilara koji se razvija unutar tkiva je individualan i jedinstven i ovisi o lokalnoj potražnji za kisikom (SEMENZA, 2007.).

Razvoj krvožilnog sustava započinje vrlo rano, a stvaranje krvnih žila se događa unutar i izvan embrija. Embrionalni mezoderm, kao i ekstraembrionalni žumančani sok, alantois i posteljica identificirani su kao izvori vaskularnih endotelnih i hematopoetskih progenitorskih stanica i mjesta su vaskulogeneze (PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.). U žumanjčanoj vrećici vaskulogeneza rezultira stvaranjem primitivnog vaskularnog pleksusa. Prekursorske stanice iz splanhopleuralnog mezoderma migriraju, diferenciraju se i združuju se u nakupine zvane krvni otoci (KOLTE i sur., 2016.). Periferno smještene stanice u krvnim otocima – angioblasti, prolaze daljnju diferencijaciju u endotelne stanice, dok stanice koje se nalaze u unutrašnjosti postaju hematopoetski prekursori koji će stvoriti krvne stanice. Postoje prekursorske stanice koje mogu stvoriti i endotelne i hematopoetske stanice – hemangioblasti (PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.; KOLTE i sur., 2016.). U procesu diferencijacije angioblasta od velike je važnosti endoderma. Angioblasti proliferiraju, migriraju i udružuju se kako bi formirali primitivne cjevolute žile međusobnim stapanjem angioblasta ili njihovim migriranjem s udaljenih mjesta. Razvoj krvnih žila se odvija nakon što se angioblasti diferenciraju u endotelne stanice, formiraju vaskularni lumen i stvore bazalnu laminu te formiraju primitivni vaskularni pleksus (PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.).

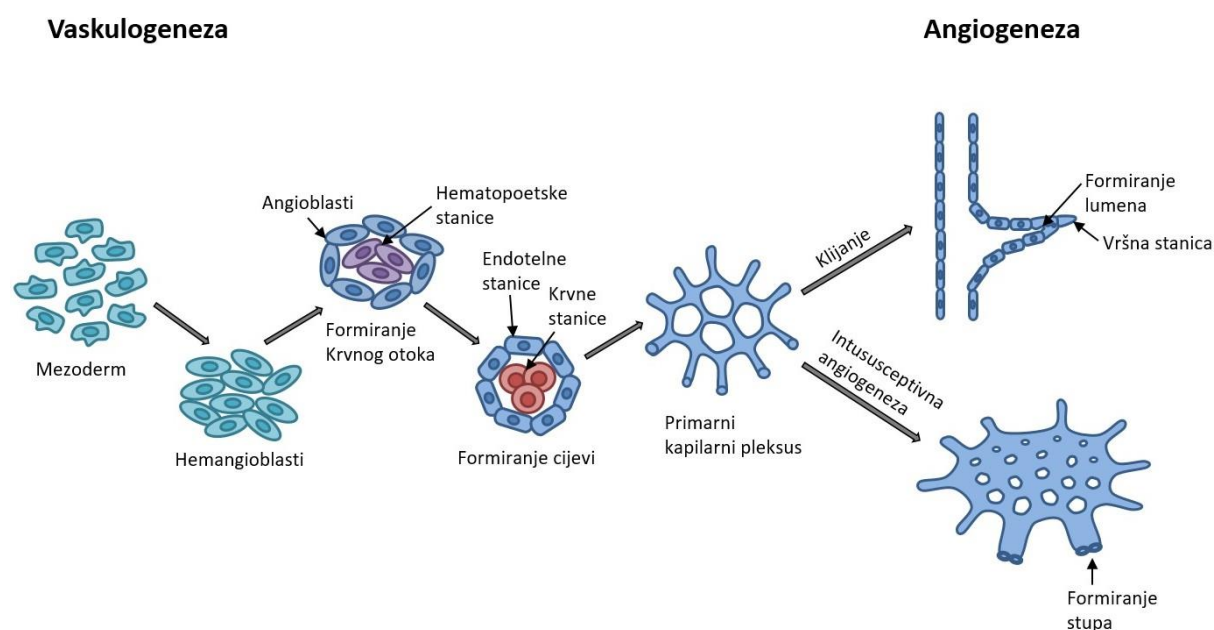
Angiogeneza je rast novih kapilara od postojećih krvnih žila koji se događa ili klijanjem endotelnih stanica postojećih žila ili tzv. intususceptivnom angiogeneom gdje se razvijaju pregrade, odnosno stupovi koji se translumenalno umeću u postojeće kapilare čime se formiraju nove žile (FOLKMAN, 1984.; RISAU, 1997.). Pokretač angiogeneze je hipoksija okolnog tkiva (HEIL i sur., 2006.). Angiogeneza je zaslužna za stvaranje većine krvnih žila embrija. Prilikom angiogeneze, u procesu klijanja kapilara, vršne endotelne stanice vaskularnih klica reagiraju na angiogene podražaje i povezane su s endotelnim stanicama koje sudjeluju u stvaranju cijevi. Progresija angiogeneze započinje lokalnim razaranjem bazalne membrane žile i disocijacijom pericita iz kapilara, nakon čega slijedi migracija vršnih stanica prema angiogenom podražaju. Endotelne stanice prodiru u donju bazalnu membranu krvožilnog sustava, ulaze u stromu izvanstaničnog matriksa i formiraju

lumen endotelnih staničnih cijevi koje se nastavljaju širiti, granati i stvarati mreže, gurnute proliferacijom endotelnih stanica sa stražnje i privučene kemotaksijom s prednje strane. Pericitna i/ili stanična povezanost glatkih mišića i taloženje bazalne membrane posreduju u stabilizaciji žila (FOLKMAN, 1982.; FOLKMAN, 1984.; PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.). Ovi događaji zahtijevaju dinamičku, vremenski i prostorno reguliranu interakciju između endotelnih stanica, faktora angiogeneze i okolnih proteina izvanstaničnog matriksa (TONNESEN i sur., 2000.) (Tablica 1).

Tablica 1. Aktivatori i inhibitori angiogeneze (DALY i sur., 2003.; NYBERG i sur., 2005.; NISHIDA i sur., 2006.; MORGAN i NIGAM, 2013.).

	Stimulatori angiogeneze	Inhibitori angiogeneze
Faktori rasta/ citokini/ endogeni modulatori	VEGF/VPF (A, B, C i D) EGF bFGF/FGF2, FGF3 TGF- α , TGF- β TNF- α HGF PDGF PIGF IGF-1 IL-1, IL-6, IL-8 Angiopoetin 1, Ang1 Triptaza mastocita Endotelin Eritropoetin NOS Trombocitni aktivirajući faktor Prostaglandini E Trombopoetin	Trombospondin TGF- β HGF domena NK1 i NK2 IL-10, IL-12 IFN- α , IFN- β PF4 Angiopoetin 2, Ang2 Angiotenzin Kaveolin 1 i 2 Endostatin Angiostatin Izoflavon Prolaktin Troponin 1
Elementi u tragovima	Bakar	Cink
Onkogeni	MYC, RAS, SRC, JNK	TP53, RB, PTEN
EGF, epidermni faktor rasta (engl. <i>epidermal growth factor</i>); HGF, faktor rasta hepatocita (engl. <i>hepatocyte growth factor</i>); PIGF, faktor rasta placente (engl. <i>placental growth factor</i>); NOS, sintaza dušikovog monoksida (engl. <i>nitric oxide synthase</i>)		

Intususceptivna angiogeneza podrazumijeva širenje kapilarne mreže složenim postupkom ponovnog modeliranja koji uključuje umetanje stupova tkiva unutar postojećih žila, a sastoji se od nekoliko faza. Intususceptivni mikrovaskularni rast se pokreće kontaktom endotelnih stanica na suprotnim stijenkama kapilara koje stvaraju izbočine zidova kapilara u njen lumen, što dovodi do formacija međuendotelnog transluminalnog mosta. Dolazi do perforacije endotelnog dvosloja i stvara se cilindrični tkivni stup koji se proteže kroz lumen, obložen je endotelnim stanicama i sadrži elemente intersticijskog tkiva, uglavnom citoplazmatske nastavke miofibroblasta. Novonastali pregradni stup oblažu periciti, sintetiziraju se kolagena vlakna koja ga stabiliziraju i formira se bazalna membrana, a pregradni stup urasta u normalnu interkapilarnu mrežu (BURRI i TAREK, 1990.; KOLTE i sur., 2016.) (Slika 8).



Slika 8. Vaskulogeneza i angiogeneza. Diferencijacija angioblasta ili endotelnih prekursorskih stanica iz mezoderma i formiranje primitivnog vaskularnog plexusa iz angioblasta različiti su koraci u početku vaskularizacije koji zajedno čine vaskulogenezu. Angiogeneza se odnosi na rast novih kapilara iz postojećih krvnih žila bilo putem klijanja ili intususcepcijom.

2.3.3. MOLEKULARNI MEHANIZMI ANGIOGENEZE

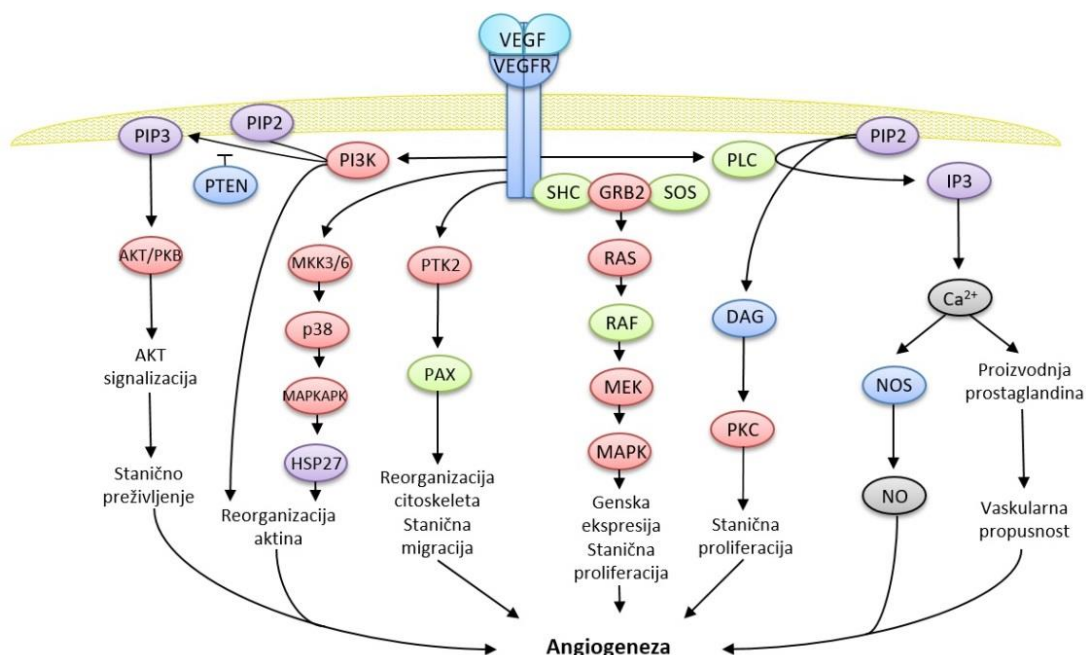
Stanični poremećaji i hipoksija, obilježja ozljede tkiva, snažni su početni induktori snažnih faktora angiogeneze na mjestu rane. Najčešće opisani angiogeni faktori rasta i citokini su: VEGF, kiseli faktor rasta fibroblasta (engl. *acidic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor-1*, aFGF/FGF1), bFGF/FGF2, TGF- β , TNF- α , EGF i angiopoetini (TONNESEN i sur., 2000.; FALLAH i sur., 2019.).

Navedene faktore rasta i citokine proizvode endotelne stanice, fibroblasti, stanice glatkih mišića, trombociti, upalne stanice i stanice raka. Neki su faktori rasta, uključujući FGF2, pohranjeni u izvanstaničnom matriksu gdje služe kao rezervoari za njihovo trajno oslobađanje. Koncentracija specifičnog faktora rasta smještenog u izvanstaničnom okruženju ovisi o fiziološkom i patološkom stanju (ozljeda, kronična upalna stanja, rak) (UCUZIAN i sur., 2010.).

Faktori rasta FGF1 i FGF2 imaju snažno angiogeno djelovanje, ali nemaju transmembransku sekvenciju pa ih stoga nije moguće izlučiti. Međutim, neki oblici oštećenja stanica mogu uzrokovati njihovo otpuštanje. Ta dva faktora oslobođena iz oštećenih parenhimskih stanica na mjestu rane rezultiraju početnim podražajem za angiogenezu (TONNESEN i sur., 2000.). Priprema okoline za angiogenezu tijekom prva 3 dana cijeljenja rane događa se zahvaljujući FGF2, dok je VEGF ključan za angiogenezu tijekom stvaranja granulacijskog tkiva od 4. do 7. dana. Niska razina kisika, koja se javlja kod tkivne hipoksije, glavni je induktor ovog faktora rasta i njegovog receptora (PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.).

VEGF je član porodice faktora rasta koji snažno potiču angiogenezu i vazopermeabilnost, uključen je u migraciju endotelnih stanica, mitogenezu, klijanje i formiranje žilica (Slika 9) (UCUZIAN i sur., 2010.). VEGF faktori su srodnici PDGF. Postoji više članova porodice VEGF, a najbolje istraženi su VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD i faktor rasta posteljice (engl. *placental growth factor*, PGF). VEGFA je izvorno identificiran kao faktor vaskularne propusnosti (engl. *vascular permeability factor*, VPF) i najčešće je proučavani član porodice VEGF te je uključen u vaskulogenezu i u angiogenezu. VEGF-B igra središnju ulogu u razvoju srca, dok VEGFC i VEGFD potiču razvoj limfnih žila i mogu također pridonijeti angiogenezi, a PGF, prvo detektiran u

posteljici, se javlja u malim količinama u embrionalnoj i u odrasloj fazi (PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.; KOLTE i sur., 2016.).



Slika 9. VEGF signalni put je uključen u angiogenezu (preuzeto i prilagođeno iz: [SINO BIOLOGICAL, s. a.]).

Članovi porodice VEGF reguliraju stanični odgovor zahvaljujući interakciji s tri glavna receptora faktora rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR): VEGFR1, VEGFR2 i VEGFR3 (KOLTE i sur., 2016.). VEGFA, VEGFB i PGF vežu se na VEGFR1. VEGFA i obrađeni oblici VEGFC i VEGFD vežu se na VEGFR2, dok se dugački, neobrađeni oblici VEGFC i VEGFD vežu na VEGFR3 (HOLMES i ZACHARY, 2005.; PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.; KARAR i MAITY, 2011.). Vezanje VEGF liganda na njihove receptore inducira homodimerizaciju ili heterodimerizaciju receptora, što aktivira receptorske kinaze, autofosforilaciju receptora i nizvodnu signalizaciju. VEGF receptori posjeduju više tirozinskih ostataka od kojih su neki mjesta autofosforilacije, neki reguliraju kinaznu aktivnost, a neki služe kao mjesta za priključivanje signalnih molekula (PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.).

VEGFR1 komunicira s više signalnih molekula, uključujući fosfolipazu C γ (engl. *phospholipase C gamma*, PLC γ /PLC γ) – ključni enzim u transmembranskom prijenosu signala i protein 2 vezan na receptor faktora rasta (engl. *growth factor receptor bound*

protein 2, GRB2). Oba proteina uključena su u signalne putove povezane s angiogenezom (PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.).

Jedan od tirozinskih ostataka VEGFR2 također služi kao mjesto za priključivanje fosfolipaze C- γ što potiče kinazu koja se aktivira mitogenima, MAPK na aktivaciju proliferacije endotelних stanica. PLC γ potom uzrokuje oslobađanje kalcija i aktiviranja proteinske kinaze C (engl. *protein kinase C*, PKC) koji induciraju transkripcijske faktore poput EGR1, kako bi pokrenuli angiogeni odgovor. Aktivacija PLC γ i PKC potiče fosforilaciju proteinske kinaze D (engl. *protein kinase D*, PKD) i histonske deacetilaze 7 (engl. *histone deacetylase 7*, HDAC7) što rezultira proliferacijom i migracijom endotelnih stanica (PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.).

Adapterski protein B koji sadrži domenu 2 homolognu „Src“ (engl. *Src homology 2 domain-containing adapter protein B*, SHB) i molekula adaptera PI3-kinaze koja fosforilira fosfatidilinozitolni fosfat na položaju 3 (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K) mogu se vezati na fosforilirani tirozinski ostatak VEGFR-2 i potaknuti migraciju endotelnih stanica. Na taj se način aktivira PI3K-PKB/AKT signalni put koji je odgovoran za preživljavanje endotelnih stanica i vaskularnu propusnost. PI3K aktivacija serinske/treoninske kinaze proteina AKT1 (engl. *serine-threonine kinase 1*), poznate još i kao PKB, proteinske kinaze B (engl. *protein kinase B*) vodi do fosforilacije sintaze dušikovog monoksida endotela (engl. *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS/NOS3) i proizvodnje NO te povećane vaskularne propusnosti (PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.).

Fosforilacija VEGFR2 kod drugog tirozinskog ostatka potiče migraciju endotelnih stanica uslijed remodeliranja citoskeletnog aktina zahvaljujući aktivaciji p38 proteinskih kinaza aktiviranih mitogenima (engl. *p38 mitogen-activated protein kinases*, MAPK), dok treći tirozinski ostatak VEGFR-2 predstavlja mjesto za priključivanje specifičnog adaptera za T-stanicu koji se povezuje sa Src radi poticanja migracije endotelnih stanica i vaskularne propusnosti (PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.).

U regulaciju pokretljivosti endotela nakon aktivacije VEGFR2 uključeni su i paksilin i kinaza fokalne adhezije, proteinska tirozinska kinaza 2 (engl. *focal adhesion kinase/protein tyrosine kinase 2*, FAK/PTK2) koja nakon aktiviranja formira komplekse sa SRC što dovodi do fosforilacije dodatnih tirozinskih ostataka, potiče aktiviranje PI3K i PI3K-PKB/AKT signalnog puta, a potiče i aktivaciju MAPK/ERK signalnog puta. Paksilin

(engl. *Paxillin*, PXN) je adhezijski i signalni protein kojeg fosforiliraju SRC i FAK i koji regulira usmjerenu migraciju stanica u fibroblastima (GERMAN i sur., 2014.).

Članovi porodice TGF- β su iznimno važni za razvoj krvnih žila (HOFER i SCHWEIGHOFER, 2007.). Porodica TGF- β obuhvaća više članova, koštane morfogenetske proteine (engl. *bone morphogenetic proteins*, BMPs) i aktivine. Članovi porodice TGF- β vežu se na dvije vrste receptora, tip I i tip II. Receptor tipa II transfosforilira i aktivira receptor tipa I koji fosforilira i transducira SMAD proteine – transkripcijske faktore koji se potom translociraju u jezgru gdje formiraju transkripcijske komplekse s genima od interesa i aktiviraju njihovu transkripciju (BARBARA i sur., 1999.; MASSAGUÉ i sur., 2005.; PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.). TGF- β ima dvojak učinak na angiogenezu: potiče angiogenezu *in vivo*, dok *in vitro* inhibira rast i razmnožavanje slojeva endotelnih stanica. Te se razlike mogu dijelom objasniti sposobnošću TGF- β da *in vivo* regrutira i stimulira makrofage koji potom proizvode druge aktivne faktore angiogeneze, a mogu biti i posljedica različite doze (TONNESEN i sur., 2000.; PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.).

PDGF je važan faktor za proces angiogeneze jer potiče proizvodnju VEGFA i modulira proliferaciju i regrutiranje pericita. Porodica PDGF sastoji se od četiri različite izoforme (PDGFA, PDGFB, PDGFC i PDGFD) koji tvore homodimere ili heterodimere. Receptori za PDGF uključuju receptore faktora rasta dobivene iz trombocita α i β (engl. *platelet-derived growth factor receptor- α/β* , PDGFR- α/β), receptore tirozinske kinaze. Vezanje liganda vodi do autofosforilacije receptora na tirozinskim ostacima što inducira aktivaciju različitih signalnih molekula. Uloga PDGFB/PDGFR β signalizacije je od iznimne važnosti za nastanak funkcionalnih krvnih žila zbog regrutiranja i stabiliziranja perivaskularnih stanica. Isto tako, VEGFA povećava ekspresiju endotelnog PDGFB, dok FGF2 povećava ekspresiju perivaskularnog PDGFR β pa stimulacija VEGF i FGF2 uzorkuje značajno regrutiranje perivaskularnih stanica *in vitro* i formiranje funkcionalne vaskulature *in vivo* (RAICA i CIMPEAN, 2010.).

Angiopoetini su jedini poznati faktori rasta koji su u velikoj mjeri specifični za vaskularni endotel. Angiopoetini, između ostalih, uključuju prirodni agonist, angiopoetin-1, kao i prirodni antagonist, angiopoetin-2, koji djeluju pomoću Tie receptora (TONNESEN i sur., 2000.). Ang2 u nekim uvjetima može također biti proangiogen (KARAR i MAITY, 2011.). Tie-1 i Tie-2 su receptorske tirozinske kinaze (engl. *tyrosine*

kinase with immunoglobulin i EGF homology domains) eksprimirane na endotelnim stanicama krvnih žila i nužne za embrionalni razvoj krvnih žila te njihovu čvrstoću i stabilnost. Tie-1 je važan za strukturalnu cjelovitost krvnih žila, a Tie-2 za formaciju njihove mreže (SATO i sur., 1995.). Angiopoetin-1 može aktivirati PI3K/AKT signali put (kao i Angiopoetin 2, ali sa slabijim učinkom) i izazvati fosforilaciju eNOS i sintezu NO, važnu za vazodilataciju i propusnost krvnih žila (KARAR i MAITY, 2011.).

Hipoksija također potiče angiogenezu. Faktor koji izaziva hipoksiju (engl. *hypoxia-inducible factor*, HIF) transkripcijski je faktor sastavljen od dvije podjedinice, konstitutivno aktivne HIF-1 β podjedinice i podjedinice osjetljive na kisik HIF1 α . Pod normoksijom, HIF-1 α se sintetizira i razgrađuje, dok hipoksija dovodi do nakupljanja HIF-1 α . HIF-1 α dimerizira s HIF-1 β i vezuje za DNA čime se aktivira transkripcija brojnih ciljanih gena, uključujući mnoge faktore koji su uključeni u regulaciju angiogeneze kao što su VEGF, PlGF, Ang1, Ang2 i PDGF (PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.).

Ekstracelularni matriks rane koja cijeli prolazi brze promjene jer se se fibrinski ugrušak zamjenjuje fibronektinom i hijaluronanom, a potom kolagenom tipa I i III (CLARK, 1996.). Nakupljanje kolagena uzrokuje smanjenje gustoće krvnih žila prisutnih u sloju granulacijskog tkiva. Prijelazi iz privremenog matriksa bogatog fibrinom u privremeni matriks drugog reda pa u kolageni ožiljak su strogo vremenski i prostorno regulirani. Ekstracelularni matriks na rubu rane se razlikuje od ECM-a smještenog u središnjem dijelu, a regulacija brzog razvoja novog tkiva u cijeljenju rana ovisi ne samo o prisutnim stanicama i citokinima, već i o mikrokolišu ECM-a. Složena interakcija i kontrola povratnih informacija stanica/citokina/matriksa naziva se dinamički reciprocitet. Za angiogenezu je, osim faktora rasta i kemotaktičkih faktora, važan i odgovarajući ECM. Prisutnost fibrina u ECM-u, kao i VEGF-a i FGF2, nužna je za aktivno promicanje angiogeneze (TONNESEN i sur., 2000.).

Prisutnost mastocita na mjestima kapilarnog klijanja ukazuje na povezanost između mastocita i angiogeneze na način da mastociti djeluju na mjestima formiranja novih žila izlučivanjem triptaze, koja tada djeluje kao snažan faktor angiogeneze (BLAIR i sur., 1997.).

2.4. BPC 157

Želudac je važan organ za odgovor organizma na stres i u stanju je pokrenuti, posredovati i organizirati odgovor protiv štetnih događaja. Takav je odgovor moguće i pojačati prikladnom primjenom odgovarajućih organoprotektivnih sredstava, a prilikom traganja za dodatnim posrednicima definiranog odgovora na stres u ovim uvjetima pronađen je protein BPC. Radi se o proteinu dobivenom iz ljudskog želučanog soka (molekularna težina određena gel kromatografijom iznosi 40000; engl. *molecular weight*, M.W.) koji je imao ulogu zaštite sluznice i široki raspon organoprotektivnih učinaka. Njegov fragment od 15 aminokiselina (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419) nazvan BPC 157 (poznat još i kao PL-10, PLD-116, odnosno PL 14736) prvi je put opisan 1993. godine (SIKIRIĆ i sur., 1993.), a pošto nije zapažena homologija sekvencije s poznatim peptidima crijeva, zaključeno je da je upravo BPC 157 ključan za djelovanje cjelokupnog peptida. Od tada su njegovi različiti zaštitni učinci na gastrointestinalni trakt i druge organe postali predmet brojnih istraživanja. BPC 157 je topljiv u vodi pri vrijednosti pH 7.0 i stabilan je u želučanom soku. Prilikom aplikacije, BPC 157 se otopi u vodi ili fiziološkoj otopini i koristi se bez nosača (SIKIRIĆ i sur., 1993.). Sama njegova aplikacija je dokazano učinkovita bilo da se radi o sistemske (oralno u vodi za piće, putem injekcije) ili lokalnoj (u kremama) primjeni (CEROVECKI i sur., 2010.).

Brojnim je studijama dokazano da BPC 157 ima pospješujući učinak, između ostalog, na proces cijeljenja (SEIWERTH i sur., 1997.; STUPNISEK i sur., 2012.; GWYER i sur., 2019.). Korišteni su razni modeli u kojima se BPC 157 pokazao učinkovit, između ostalih na lezijama i opekotinama kože (MIKUS i sur., 2001.), kod cijeljenja lomova kostiju (ŠEBEČIĆ i sur., 1999.), kod cijeljenja lezija tetiva (CHANG i sur., 2011.) ligamenata i mišića (BRCIC i sur., 2009.), kod ozljeda oka (MASNEC i sur., 2015.) i dr. Pozitivan učinak ima i na ozljede mozga (TUDOR i sur., 2010.) i leđne moždine (PEROVIC i sur., 2015.). BPC 157 ima pospješujući učinak i na cijeljenje kod lezija gornjeg probavnog sustava (CESAREC i sur., 2013), odnosno kod ulceroznog kolitisa, za što su napravljene i kliničke studije bez dokazane letalne doze (SIKIRIĆ i sur., 2012.), a osim cijeljenja, ima i dokazano staničnoprotektivno i organoprotektivno djelovanje (BÓDIS i sur., 1997.; SIKIRIĆ i sur., 2010.). Molekularni mehanizam kojim BPC 157 djeluje na proces cijeljenja još je u fazi istraživanja i nije u potpunosti poznat.

U procesu cijeljenja iznimno je važna uloga sustava NO, a tijekom procesa cijeljenja, ovisno o fazi i tipu ozljede, proizvodi se više vrsta NOS (SCHÄFFER i sur., 1996.). Dokazan je utjecaj BPC 157 na sustav NO gdje dovodi do otpuštanja NO i interferira s učincima agonista (L-arginina, supstratne molekule za NO) i antagonista sustava NO (L-NAME, inhibitora NOS) (GRABAREVIC i sur., 1997.; DRMIC i sur., 2018.). Istraživanje koje je analiziralo razinu ekspresije mRNA u modelu cijeljenja ezofagokutane fistule kod Wistar štakora dokazalo je djelovanje BPC 157 na gensku ekspresiju: kod BPC 157 tretiranih životinja su uočene povećane razine ekspresije inducibilne sintaze dušikovog monoksida, *iNos/Nos2* (engl. *inducible nitric oxide synthase*) i inducibilne ciklooksigenaze *Cox2* (engl. *cyclooxygenase*), poznate i kao *Prgs2* (sintaza prostaglandin-endoperoksida 2, engl. *prostaglandin-endoperoxide synthase 2*), enzima odgovornog za poticanje upalne reakcije, dok je ekspresija gena *eNos/Nos3* smanjena, za razliku od onih kod kontrolnih životinja kod kojih su sva tri parametra značajno povećana (CESAREC i sur., 2013.). Uloge NOS3 su brojne: vazodilatacija, inhibicija agregacije i adhezije trombocita i leukocita na stijenke krvnih žila, kontrola proliferacije stanica glatkih mišića krvnih žila, stimulacija angiogeneze i dr. (FÖRSTERMANN i SESSA, 2012.). Aktivacija NOS3 se, između ostalog, događa i zahvaljujući VEGF – signalnom proteinu koji stimulira rast krvnih žila. Vezanjem VEGF-a na VEGFR2 dolazi do aktivacije signalnog puta i aktivacije NOS3 preko proteina AKT1/PKB, važnog regulatora NOS3. U studiji *in vivo* dokazan je aktivacijski učinak BPC 157 na signalni put VEGFR2-AKT-eNOS te pojačana ekspresija mRNA gena *Vegfr2* (HSIEH i sur., 2017.).

Utjecaj BPC 157 na cijeljenje ogleda se u pojačanoj vaskularizaciji rane, brzim razvojem granulacijskog tkiva, njegovim sazrijevanjem i degradacijom, kao i poboljšanoj epitelizaciji. (MIKUS i sur., 2001.). Dokazan je snažni angiogenetski i angioprotektivni učinak kod stvaranja kolateralnih krvnih žila (SEIWERTH i sur., 1997.). Navedeni podatci potkrijepljeni su i istraživanjima koja su analizirala ekspresiju mRNA gena *VEGF* metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom i njenu povezanost s proteinskom ekspresijom na modelu cijeljenja *in vivo*. Rezultati su pokazali da BPC 157 vodi do ranije i bolje kontrolirane sinteze VEGF-a i boljeg cijeljenja (BATELJA VULETIĆ, 2007.).

BPC 157 u uvjetima *in vitro* stimulira stvaranje mRNA gena *EGR1*. Obzirom da *EGR1* inducira proizvodnju citokina i faktora rasta te formaciju kolagena, to objašnjava pozitivni efekt BPC 157 na cijeljenje. Osim toga, dokazan je i stimulacijski učinak na

stvaranje mRNA njegovog represora, proteina NAB2 (engl. *NGFI-A binding protein 2/EGR1 binding protein 2*) (TKALČEVIĆ i sur., 2007.). Navedeno objašnjava činjenica da EGR1 inducira ekspresiju NAB2 (KUMBRINK i sur., 2005.).

U modelu *in vitro*, kod istraživanja u kojima su kultivirane stanice fibroblasta tetiva, dokazano je da BPC 157 potiče rast fibroblasta, preživljenje stanica u uvjetima stresa i njihovu migraciju. Metodom westernskog otiska nađeno je da je kod stanica tretiranih BPC 157 nađena veća količina fosforiliranih proteina Fak/Ptk2 i Pxn. Navedeni proteini imaju značajnu ulogu kod stanične adhezije i migracije (CHANG i sur., 2011.).

Uz već navedene dokazane pozitivne učinke BPC 157 na upalne procese (KEREMI i sur., 2009.), krvožilni sustav i dr. dokazana je njegova učinkovitost i kod edema (STAMBOLIJIA i sur., 2016.).

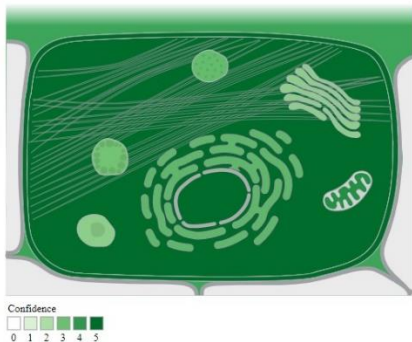
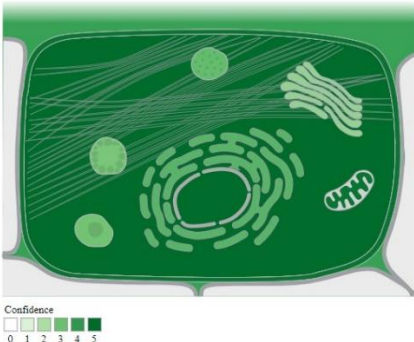
2.5. GENI UKLJUČENI U ANGIOGENEZU

Pošto je angiogeneza složeni niz događaja koji zahtijevaju pažljivu dinamičku, vremenski i prostorno reguliranu interakciju između različitih stanica i molekula, postoje brojeni geni čiji proteinski produkti su direktno i/ili indirektno uključeni u taj proces.

2.5.1. *AKT1*

Gen *AKT1* (*PKB*) kodira za protein AKT1 koji je jedna od tri usko povezane serinske treoninske proteinske kinaze (AKT1, AKT2 i AKT3) (Tablica 2). AKT kinaze reguliraju mnoge procese, uključujući metabolizam, proliferaciju, angiogenezu, stanično preživljenje, rast i staničnu migraciju, između ostalog vidljivu u procesu klijanja tijekom angiogeneze. Navedeni se događaji posreduju kroz fosforilaciju serina i/ili treonina brojnih nizvodnih supstrata. AKT1 ima značajnu ulogu u brojnim signalnim putovima između ostalih i onima uključenima u proces angiogeneze poput PI3K-AKT-mTOR (potiče metabolizam, proliferaciju, stanično preživljenje, rast i angiogenezu) i EGFR (regulira transkripciju i angiogenezu) signalnih putova ([GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 2. Osnovni podatci gena *AKT1* i *Akt1* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

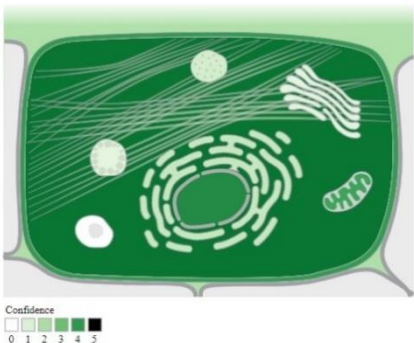
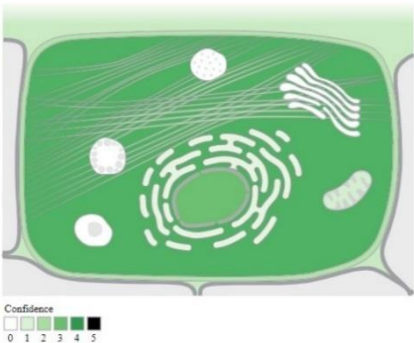
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>AKT1</i>	<i>Akt1</i>
Naziv	AKT1 serinska treoninska kinaza	AKT1 serinska treoninska kinaza
Sinonimi	AKT; PKB; RAC; PRKBA; PKB-alpha; RAC-alpha	Akt; PKB; PKB alpha; RAC-PK alpha
ID	NCBI: 207 Ensembl: ENSG00000142208 RGD: 732909 UniProtKB: P31749	NCBI: 24185 Ensembl: ENSRNOG00000028629 RGD: 2081 UniProtKB: P47196
KL	14q32.33	6q32
GL	GRCh38: 104,769,349 - 104,795,748 (-)	Rnor_6.0: 137,218,398 - 137,239,970 (-)
Sekvencija	NC_000014.9	NC_005105.4
Broj eksona	14	14
Duljina pp	480 aminokiselina	480 aminokiselina
Masa pp	55686 Da	55735 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.5.2. *BRAF*

BRAF protoonkogen (engl. *B-Raf proto-oncogene*) kodira protein koji pripada Raf porodici serinskih/treoninskih proteinskih kinaza (Tablica 3). Raf kinaze su dio RAS-MAPK signalne kaskade i fosforiliraju MEK. *BRAF* protein je važan za regulaciju MAPK/ERK signalnog puta koji se aktivira uslijed stanične diobe, diferencijacije i sekrecije. Uključen je u transdukciju mitogenih signala od stanične membrane do jezgre ([GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 3. Osnovni podatci gena *BRAF* i *Braf* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>BRAF</i>	<i>Braf</i>
Naziv	B-raf protoonkogen	B-raf protoonkogen
Sinonimi	B-RAF1; BRAF1; B-Raf; RAFB1	B-Raf
ID	NCBI: 673 Ensembl: ENSG00000157764 RGD: 735645 UniProtKB: P15056	NCBI: 114486 Ensembl: ENSRNOG00000010957 RGD: 619908 UniProtKB: F1M9C3
KL	7q34	4q22
GL	GRCh38: 140,719,331 - 140,924,929 (-)	Rnor_6.0: 67,389,331 - 67,520,549 (-)
Sekvencija	NC_000007.14	NC_005103.4
Broj eksona	23	21
Duljina pp	766 aminokiselina	712 aminokiselina
Masa pp	84437 Da	79653 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.5.3. *EGFR*

Gen *EGFR* kodira za receptor epidermnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*) (Tablica 4). To je transmembranski glikoprotein, član porodice proteinskih kinaza. EGFR (ErbB1, HER1) pripada ErbB/HER porodici receptora tirozinske kinaze (engl. *erythroblastic oncogene B/human epidermal growth factor receptor*). EGFR je receptor za članove porodice epidermalnih faktora rasta, a vezanje liganda (EGF, TGFA i dr.) na protein inducira njegovu dimerizaciju i autofosforilaciju tirozina. To vodi do aktivacije nekoliko važnih signalnih putova: RAS-RAF-MEK-ERK, PI3K-AKT, PLC γ -PKC, STAT (engl. *signal transducer and activator of transcription*) i NF- κ B (engl. *nuclear factor κ B*) ([GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 4. Osnovni podatci gena *EGFR* i *Egfr* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

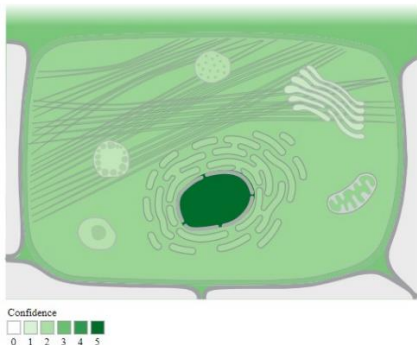
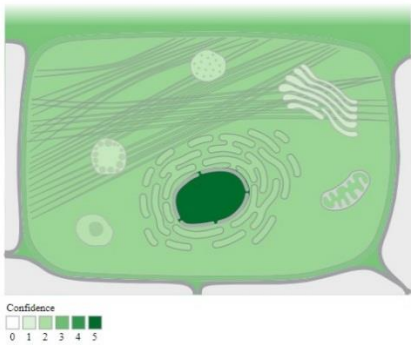
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>EGFR</i>	<i>Egfr</i>
Naziv	Receptor epidermnog faktora rasta	Receptor epidermnog faktora rasta
Sinonimi	ERBB, ERBB1, HER1, NISBD2, PIG61, mENA	ERBB1, ErbB-1, Errp
ID	NCBI: 1956 Ensembl: ENSG00000146648 RGD: 69152 UniProtKB: P00533	NCBI: 24329 Ensembl: ENSRNOG00000004332 RGD: 2543 UniProtKB: Q9QX70
KL	7p11	14q22
GL	GRCh38: 55,019,017 - 55,211,628 (+)	Rnor_6.0: 99,919,485 - 100,104,136 (+)
Sekvencija	NC_000007.14	NC_005113.4
Broj eksona	31	31
Duljina pp	1210 aminokiselina	1209 aminokiselina
Masa pp	134277 Da	134891 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.5.4. *EGR1*

Gen *EGR1* kodira protein iz porodice C2H2-tipa proteina cinkova prsta (Tablica 5). Radi se o proteinu koji se može naći u jezgri i koji funkcionira kao regulator transkripcije. Prepoznaje i vezuje se na određenu sekvenciju DNA, tzv. EGR-mjesto u promotorskoj regiji. Na taj način aktivira transkripciju određenih gena čiji produkti sudjeluju u mitogenezi i diferencijaciji. Igra i važnu ulogu u regulaciji odgovora na faktore rasta, oštećenja DNA, ishemiju, a regulira i stanično preživljenje, proliferaciju i smrt ([GeneCards, 1997] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 5. Osnovni podatci gena *EGR1* i *Egr1* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

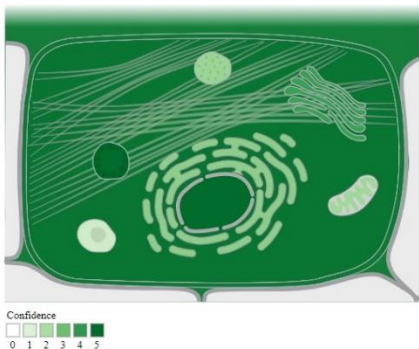
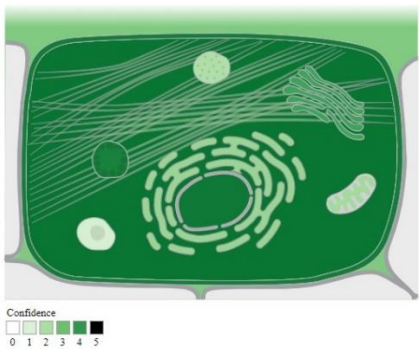
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>EGR1</i>	<i>Egr1</i>
Naziv	Faktor ranog odgovora na rast 1	Faktor ranog odgovora na rast 1
Sinonimi	AT225, G0S30, KROX-24, NGFI-A, ZIF-268, ZNF225	Krox-24, NGFI-A, Ngf1, Ngfi, zif-268
ID	NCBI: 1958 Ensembl: ENSG00000120738 RGD: 737111 UniProtKB: P18146	NCBI: 24330 Ensembl: ENSRNOG00000019422 RGD: 2544 UniProtKB: P08154
KL	5q31.2	18p12
GL	GRCh38: 138,465,479 - 138,469,303 (+)	Rnor_6.0: 27,657,903 - 27,660,101 (+)
Sekvencija	NC_000005.10	NC_005117.4
Broj eksona	2	2
Duljina pp	543 aminokiselina	508 aminokiselina
Masa pp	57507 Da	53935 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.5.5. *GRB2*

GRB2 je gen koji kodira za protein koji se vezuje za EGFR (Tablica 6). Taj protein predstavlja ključnu vezu između receptora faktora rasta na površini stanice i Ras signalnog puta. Postoje dvije različite izoforme ovog proteina, a izoforma 2 se ne vezuje na fosforilirani EGFR već inhibira transaktivaciju RAS preko EGF-a. Osim toga, izoforma 2 *GRB2* proteina se ponaša kao njegov negativni protein jer suprimirajući proliferativne signale može potaknuti aktivaciju programirane stanične smrti. Sudjeluje u brojnim staničnim signalnim putovima, od kojih su neki jako važni za proces angiogeneze, posebno EGFR i MAPK signalni putovi ([GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 6. Osnovni podatci gena *GRB2* i *Grb2* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

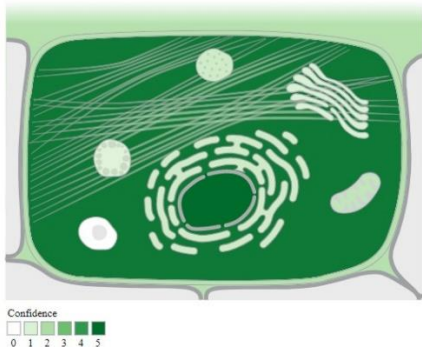
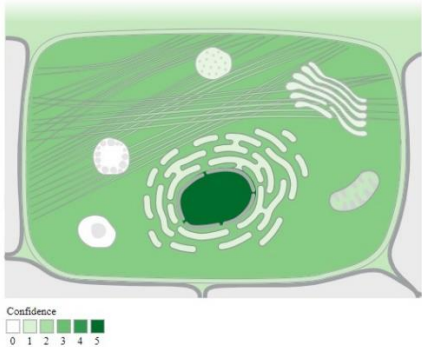
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>GRB2</i>	<i>Grb2</i>
Naziv	Protein 2 vezan na receptor faktora rasta	Protein 2 vezan na receptor faktora rasta
Sinonimi	ASH, EGFRBP-GRB2, Grb3-3, MST084, MSTP084, NCKAP2	Ash-psi
ID	NCBI: 2885 Ensembl: ENSG00000177885 RGD: 732473 UniProtKB: P62993	NCBI: 81504 Ensembl: ENSRNOG00000003990 RGD: 619758 UniProtKB: P62994
KL	17q25.1	10q32.1
GL	GRCh38: 75,318,076 - 75,405,709 (-)	Rnor_6.0: 104,193,953 - 104,263,071 (-)
Sekvencija	NC_000017.11	NC_005109.4
Broj eksona	6	6
Duljina pp	217 aminokiselina	217 aminokiselina
Masa pp	25206 Da	25206 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.5.6. *HDAC7*

HDAC7 je gen koji kodira protein histonsku deacetilazu (Tablica 7). Histoni igraju ključnu ulogu u transkripcijskoj regulaciji, progresiji staničnog ciklusa i razvoju. Acetilacija i deacetilacija histona mijenja strukturu kromosoma i na taj način utječe na pristup transkripcijskih faktora DNA, odnosno ostavlja epigenetski trag. Histonske deacetilaze djeluju formirajući velike multiproteinske komplekse. *HDAC7* je odgovoran za deacetilaciju ostataka lizina na N-terminalnom kraju centralnih histona. Uključen je u sazrijevanje mišića, upalni odgovor organizma i brojne druge procese ([GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 7. Osnovni podatci gena *HDAC7* i *Hdac7* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

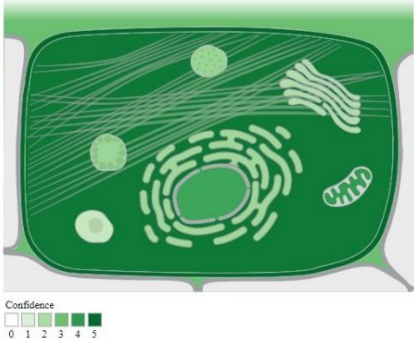
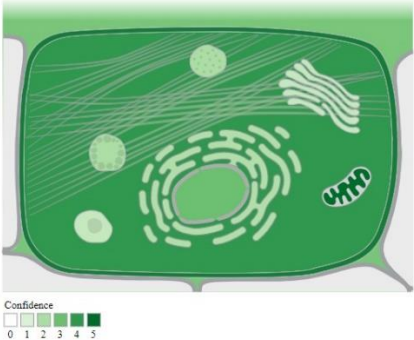
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>HDAC7</i>	<i>Hdac7</i>
Naziv	Histonska deacetilaza 7	Histonska deacetilaza 7
Sinonimi	HD7, HD7AA, HDAC7	Hdac7a
ID	NCBI: 51564 Ensembl: ENSG00000061273 RGD: 1349346 UniProtKB: Q8WUI4	NCBI: 84582 Ensembl: ENSRNOG00000055597 RGD: 619982 UniProtKB: Q99P96
KL	12q13.11	7q36
GL	GRCh38: 47,782,722 - 47,820,612 (-)	Rnor_6.0: 139,280,396 - 139,319,108 (-)
Sekvencija	NC_000012.12	NC_005106.4
Broj eksona	31	26
Duljina pp	952 aminokiselina	* 238 aminokiselina
Masa pp	102927 Da	* 26101 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase); *, fragment

2.5.7. KRAS

Gen *KRAS* kodira za protein produkt homologa onkogeno Kirstenova virusa sarkoma (engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) (Tablica 8). Član je porodice GTPaza koje mijenjaju GTP – gvanozin-trifosfat (engl. *guanosine triphosphate*) u GDP – gvanozin-difosfat (engl. *guanosine diphosphate*). Pripada i Ras porodici onkogeno te ima važnu ulogu u staničnoj diobi, proliferaciji, diferencijaciji, i apoptozi. Postoje dvije izoforme ovog proteina. KRAS je uključen u brojne stanične signalne putove: PI3K-AKT-mTOR, EGFR, VEGF (regulira vaskulogenezu i angiogenezu), Jak-Stat (uključen je u procese stanične diobe i smrti, imunološkog odgovora organizma i dr.), MAPK/ERK (uključen u procese odgovora na stres, diferencijacije i proliferacije) i TGF- β signalni put (uključen u održavanje homeostaze, stanični rast, diferencijaciju, apoptozu i dr.) ([GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 8. Osnovni podatci gena *KRAS* i *Kras* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

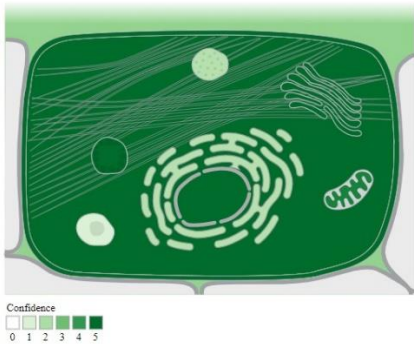
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>KRAS</i>	<i>Kras</i>
Naziv	Homolog onkogeni Kirstenovi virusa sarkoma	Homolog onkogeni Kirstenovi virusa sarkoma
Sinonimi	K-Ras, K-Ras 2, KRAS2, RAS2, c-Ki-ras, cKRAS	Kras2, c-Ki-ras, p21
ID	NCBI: 3845 Ensembl: ENSG00000133703 RGD: 1350859 UniProtKB: P01116	NCBI: 24525 Ensembl: ENSRNOG00000009338 RGD: 2981 UniProtKB: P08644
KL	12p12.1	4q44
GL	GRCh38: 25,205,246 - 25,250,929 (-)	Rnor_6.0: 179,482,562 - 179,515,483 (-)
Sekvencija	NC_000012.12	NC_005103.4
Broj eksona	6	7
Duljina pp	189 aminokiselina	189 aminokiselina
Masa pp	21656 Da	21656 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.5.8. MAPK1

MAPK1/ERK2 je gen koji kodira za kinazu 1 koja se aktivira mitogenima, poznatu i kao kinaza 2 koja se regulira izvanstaničnim signalima (engl. *mitogen-activated protein kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 2*), a član je porodice MAP-kinaza/ERK (Tablica 9). MAP kinaze su uključene u brojne stanične procese: regulaciju transkripcije, proliferaciju, diferencijaciju i razvoj. Njihova aktivacija zahtjeva fosforilaciju uzvodnih kinaza, a nakon aktivacije se sele u jezgru stimulirane stanice gdje fosforiliraju mete od kojih je veliki broj transkripcijskih faktora. MAPK1, osim što ima kinazno djelovanje, može se ponašati i kao represor transkripcije. Postoje dvije opisane izoforme. Uz MAPK3 igra jako važnu ulogu u MAPK/ERK signalnom putu koji regulira transkripciju, translaciju i citoskeletnu preraspodjelu te na taj način sudjeluje u različitim biološkim funkcijama kao što je stanični rast, adhezija, diferencijacija i preživljenje. Osim toga igra ulogu i u inicijaciji i regulaciji staničnih dioba – mejoze i mitoze ([GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 9. Osnovni podatci gena *MAPK1* i *Mapk1* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

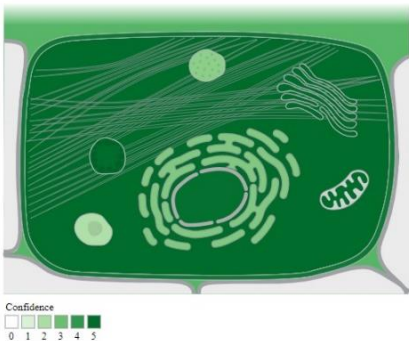
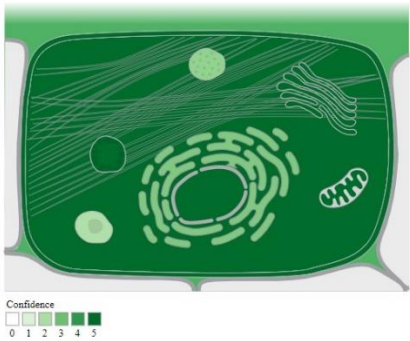
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>MAPK1</i>	<i>Mapk1</i>
Naziv	Kinaza koja se aktivira mitogenima 1	Kinaza koja se aktivira mitogenima 1
Sinonimi	ERK, ERK-2, ERK2, ERT1, MAPK2, P42MAPK, PRKM1, PRKM2, p38, p40, p41, p41mapk	ERK-2, ERT1, Erk2, p42-MAPK
ID	NCBI: 5594 Ensembl: ENSG00000100030 RGD: 732502 UniProtKB: P28482	NCBI: 116590 Ensembl: ENSRNOG00000001849 RGD: 70500 UniProtKB: P63086
KL	22q11.22	11q23
GL	GRCh38: 21,759,657 - 21,867,680 (-)	Rnor_6.0: 88,203,863 - 88,273,301 (-)
Sekvencija	NC_000022.11	NC_005110.4
Broj eksona	9	11
Duljina pp	360 aminokiselina	358 aminokiselina
Masa pp	41390 Da	41276 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.5.9. MAPK3

MAPK3/ERK1 kodira za kinazu 3 koja se aktivira mitogenima, poznatu i kao kinaza 1 koja se regulira izvanstaničnim signalima (engl. *mitogen-activated protein kinase 3/extracellular signal-regulated kinase 1*) i član je porodice MAP-kinaza/ERK (Tablica 10). Zahvaljujući alternativnom prekrajanju, postoje različite izoforme MAPK3. Uz MAPK1 igra jako važnu ulogu u MAPK/ERK signalnoj kaskadi. Sudjeluje i u signalnoj kaskadi potaknutoj aktiviranim KIT proteinom što može aktivirati nekoliko različitih signalnih putova (PI3K-AKT-mTOR, STAT) ([GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 10. Osnovni podatci gena *MAPK3* i *Mapk3* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>MAPK3</i>	<i>Mapk3</i>
Naziv	Kinaza koja se aktivira mitogenima 3	Kinaza koja se aktivira mitogenima 3
Sinonimi	ERK-1, ERK1, ERT2, P44ERK1, P44MAPK, PRKM3, p44-MAPK	ERK1, ERT2, Erk-1, MAPK1, Prkm3, p44, p44erk1, p44mapk
ID	NCBI: 5595 Ensembl: ENSG00000102882 RGD: 619570 UniProtKB: P27361	NCBI: 50689 Ensembl: ENSRNOG00000053583 RGD: 3046 UniProtKB: P21708
KL	16p11.2	1q36
GL	GRCh38: 30,114,105 - 30,123,309 (-)	Rnor_6.0: 198,192,773 - 198,198,975 (+)
Sekvencija	NC_000016.10	NC_005100.4
Broj eksona	10	9
Duljina pp	379 aminokiselina	380 aminokiselina
Masa pp	43136 Da	43081 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.5.10. MAPK14

Gen *MAPK14/p38* kodira za kinazu 14 koja se aktivira mitogenima (engl. *mitogen-activated protein kinase 14*), člana porodice MAP-kinaza/ERK (Tablica 11). Postoje četiri različite izoforme MAPK14. MAPK14 se aktivira različitim stresnim faktorima i proupalnim citokinima i ima važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa i odgovoru organizma na stres, a uzrokuje aktivaciju transkripcijskih faktora. U citoplazmi je p38 MAPK signalni put važan regulator obnavljanja proteina. Važan supstrat MAPK p38 je receptor faktora rasta fibroblasta 1 (engl. *fibroblast growth factor receptor 1*, FGFR1) koji se može translocirati iz izvanstaničnog prostora u citosol, a potom u jezgru stanica i na taj način regulirati procese kao što su stanični rast i sinteza ribosomske ribonukleinske kiseline (engl. *ribosomal ribonucleic acid*, rRNA) ([GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 11. Osnovni podatci gena *MAPK14* i *Mapk14* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

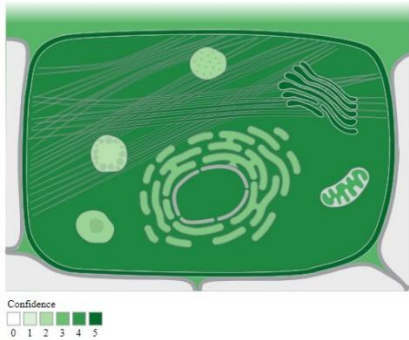
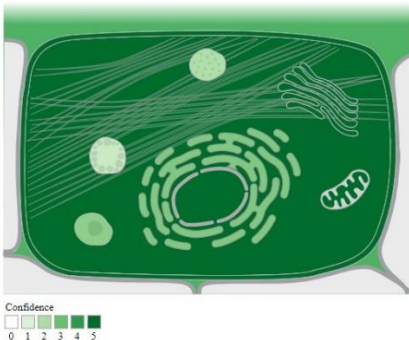
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>MAPK14</i>	<i>Mapk14</i>
Naziv	Kinaza koja se aktivira mitogenima 14	Kinaza koja se aktivira mitogenima 14
Sinonimi	CSBP, CSPB1, EXIP, Mxi2, PRKM14, PRKM15, RK, SAPK2A, p38, p38ALPHA	CRK1, CSBP, CSPB1, Exip, Hog, Mxi2, Prkm14, Prkm15, RK, Sapk2A, p38, p38alpha
ID	NCBI: 1432 Ensembl: ENSG00000112062 RGD: 619564 UniProtKB: Q16539	NCBI: 81649 Ensembl: ENSRNOG00000000513 RGD: 70496 UniProtKB: P70618
KL	6p21.31	20p12
GL	GRCh38: 36,027,677 - 36,122,964 (+)	Rnor_6.0: 5,933,290 - 5,995,137 (+)
Sekvencija	NC_000006.12	NC_005119.4
Duljina pp	360 aminokiselina	360 aminokiselina
Masa pp	41293 Da	41321 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.5.11. *NOS3*

Gen *NOS3* kodira za protein sintazu dušikova monoksida endotela (Tablica 12). NO je reaktivni slobodni radikal koji se ponaša kao biološki posrednik u nekoliko procesa, a sintetizira se iz L-arginina zahvaljujući NOS. Postoji nekoliko različitih izoformi od kojih izoforma eNOS13C nema aktivnost NOS3 te može djelovati kao njen negativni oblik i suprimirati njenu aktivnost stvarajući heterodimere s izoformom 1. Produkt NOS3, NO je uključen u opuštanje glatkih vaskularnih mišića i posreduje angiogenezu induciranu VEGF-om u krvnim žilama te potiče zgrušavanje krvi aktivacijom trombocita. Vezanje VEGF na receptor 2 – VEGFR2 dolazi do aktivacije PI3K-AKT-eNOS-VEGF signalnog puta ([GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 12. Osnovni podatci gena *NOS3* i *Nos3* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

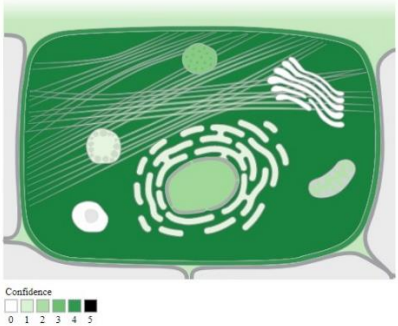
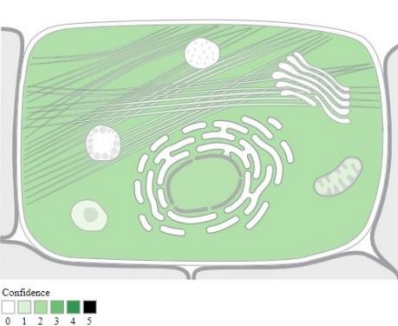
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>NOS3</i>	<i>Nos3</i>
Naziv	Sintaza dušikovog monoksida 3	Sintaza dušikovog monoksida 3
Sinonimi	ECNOS, eNOS	eNos
ID	NCBI: 4846 Ensembl: ENSG00000164867 RGD: 735618 UniProtKB: P29474	NCBI: 24600 Ensembl: ENSRNOG00000009348 RGD: 3186 UniProtKB: Q62600
KL	7q36.1	4q11
GL	GRCh38: 150,991,017 - 151,014,588 (+)	Rnor_6.0: 7,321,908 - 7,342,404 (-)
Sekvencija	NC_000007.14	NC_005103.4
Broj eksona	28	26
Duljina pp	1203 aminokiselina	1202 aminokiselina
Masa pp	133275 Da	133290 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.5.12. *PIK3CD*

PIK3CD (engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit δ*) je gen koji kodira za izoformu PI3K s katalitičkom podjedinicom δ (Tablica 13). Uključen je u imunološki odgovor i uglavnom se javlja u leukocitima. PI3K fosforilacijom fosfatidilinozitol 4,5-difosfata (engl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*, PIP2) proizvodi fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfat (engl. *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*, PIP3) koji ima ključnu ulogu u privlačenju određenih proteina (AKT1) k membrani, aktivirajući signalne putove uključene u stanični rast, proliferaciju, pokretljivost i stanično preživljenje. Posreduje u imunološkom odgovoru, potiče proizvodnju citokina, uključen je u prezentaciju antigena B stanicama i u njihov kemotaktični odgovor, a važan je i za T limfocite kojima je potreban za proliferaciju, signaliziranje i proizvodnju citokina. Uključen je u razvoj i migraciju NK stanica na mjesto upale te u njihovo sazrijevanje, proizvodnju citokina i aktivaciju njihovih receptora ([GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 13. Osnovni podatci gena *PIK3CD* i *Pik3cd* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

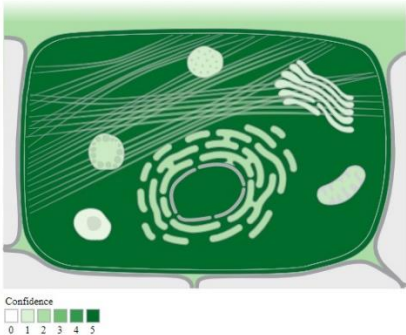
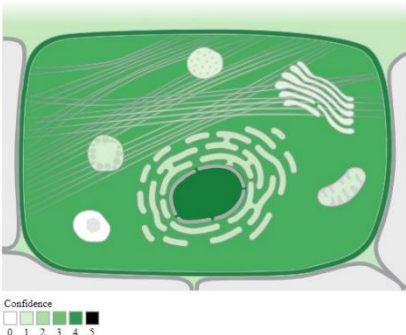
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>PIK3CD</i>	<i>Pik3cd</i>
Naziv	Kinaza koja fosforilira fosfatidilinozitolni fosfat na položaju 3 s katalitičkom podjedinicom δ	Kinaza koja fosforilira fosfatidilinozitolni fosfat na položaju 3 s katalitičkom podjedinicom δ
Sinonimi	APDS, IMD14, P110DELTA, PI3K, p110D	
ID	NCBI: 5293 Ensembl: ENSG00000171608 RGD: 1322205 UniProtKB: O00329	NCBI: 366508 Ensembl: ENSRNOG00000016846 RGD: 1310990 UniProtKB: D4A5Q1
KL	1p36.22	5q36
GL	GRCh38: 9,629,889 - 9,729,114 (+)	Rnor_6.0: 166,602,053 - 166,628,028 (-)
Sekvencija	NC_000001.11	NC_005104.4
Broj eksona	30	22
Duljina pp	1044 aminokiselina	944 aminokiselina
Masa pp	119479 Da	107903 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.5.13. *PLCG1*

PLCG1 (engl. *phospholipase C γ 1*) je gen koji kodira protein koji katalizira stvaranje inozitol 1,4,5-trisfosfata, IP3 (engl. *inositol 1,4,5-trisphosphate*) i diacilglicerola (DAG) iz fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfata (Tablica 14). Ta je reakcija iznimno značajna za regulaciju unutarstaničnih signalnih kaskada. Postoje dvije različite transkripcijske varijante, odnosno dvije različite proteinske izoforme. *PLCG1* se aktivira kao odgovor na aktivaciju tirozinskih kinaza receptorskog tipa posredovanu ligandima (PDGFRA, PDGFRB, FGFR1, FGFR2, FGFR3 i FGFR4). Igra važnu ulogu i u reorganizaciji aktina i staničnoj migraciji ([GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 14. Osnovni podatci gena *PLCG1* i *Plcg1* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

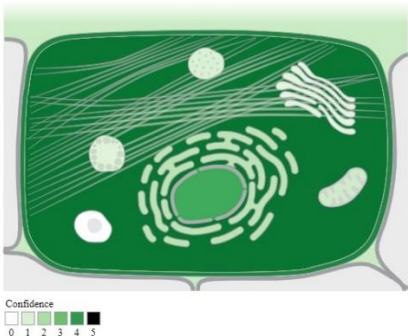
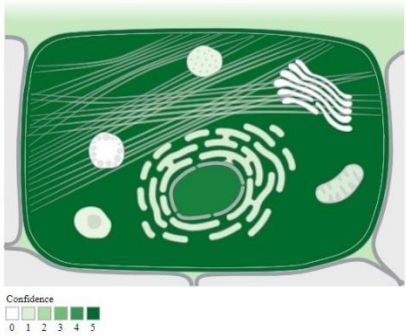
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>PLCG1</i>	<i>Plcg1</i>
Naziv	Fosfolipaza C γ 1	Fosfolipaza C γ 1
Sinonimi	NCKAP3, PLC-II, PLC1, PLC148, PLCgamma1	PPLCA
ID	NCBI: 5335 Ensembl: ENSG00000124181 RGD: 735936 UniProtKB: P19174	NCBI: 25738 Ensembl: ENSRNOG00000051490 RGD: 3347 UniProtKB: P10686
KL	20q12	3q42
GL	GRCh38: 41,137,519 - 41,177,626 (+)	Rnor_6.0: 156,727,642 - 156,758,307 (+)
Sekvencija	NC_000020.11	NC_005102.4
Broj eksona	32	32
Duljina pp	1290 aminokiselina	1290 aminokiselina
Masa pp	148532 Da	148548 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.5.14. *PRKCG*

Gen *PRKCG* (engl. *protein kinase C γ*) je gen koji kodira za protein koji pripada porodici proteinskih kinaza C, serinskim/treoninskim specifičnim proteinskim kinazama (Tablica 15). Fosforiliraju veliki broj proteina i uključene su u značajan broj signalnih putova. Postoje dvije različite izoforme ovog proteina. *PRKCG* je uglavnom eksprimiran u neuronima i ima ulogu u osjetljivosti na bol i određene supstancije. Važan je za funkciju i preživljenje stanica nakon oksidativnog stresa. Osim toga, može fosforilirati p53/TP53 i promovirati p53/TP53-ovisnu apoptozu kao odgovor na oštećenje DNA ([GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 15. Osnovni podatci gena PRKCG i Prkcg te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

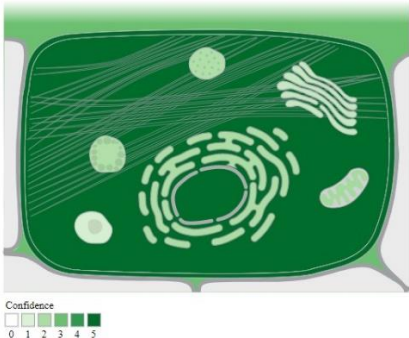
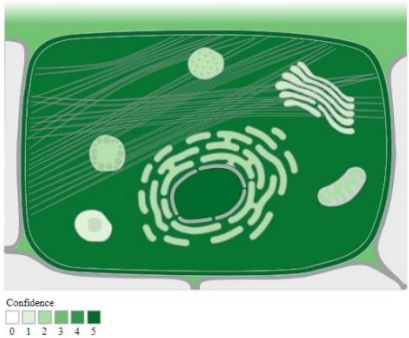
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>PRKCG</i>	<i>Prkcg</i>
Naziv	Proteinska kinaza C γ	Proteinska kinaza C γ
Sinonimi	PKC-gamma, PKCC, PKCG, PKCI(3), PKCgamma, SCA14	PKC, PKCI, Prkc, Prkcc, RATPKCI
ID	NCBI: 5582 Ensembl: ENSG00000126583 RGD: 732858 UniProtKB: P05129	NCBI: 24681 Ensembl: ENSRNOG00000054371 RGD: 3397 UniProtKB: P63319
KL	19q13.42	1q12
GL	GRCh38: 53,882,197 - 53,907,652 (+)	Rnor_6.0: 64,407,098 - 64,433,698 (-)
Broj eksona	18	18
Duljina pp	697 aminokiselina	697 aminokiselina
Masa pp	78448 Da	78358 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.5.15. *PTK2*

PTK2/FAK je gen koji kodira za protein tirozinsku kinazu (Tablica 16). Taj se protein može naći u velikom broju prilikom fokalne adhezije stanica koje rastu u prisutnosti sastavnica izvanstaničnog matriksa. *PTK2* je član *FAK* porodice tirozinskih kinaza. Postoji u više različitih izoformi. *PTK2* je tirozinska kinaza koja ima važnu ulogu u regulaciji stanične migracije, adhezije i širenja, reorganizacije aktinskog citoskeleta, sklapanju i rasklapanju fokalnih adhezija, staničnog ciklusa, proliferacije i apoptoze. Važan je za angiogenezu, razvoj srca, živčanog sustava i za osteogenezu. Stvara signalne komplekse sa *SRC* i članovima *SRC* porodice i regulira brojne signalne putove (*PI3K-AKT-mTOR*, *MAPK* i dr.) ([GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 16. Osnovni podatci gena *PTK2* i *Ptk2* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

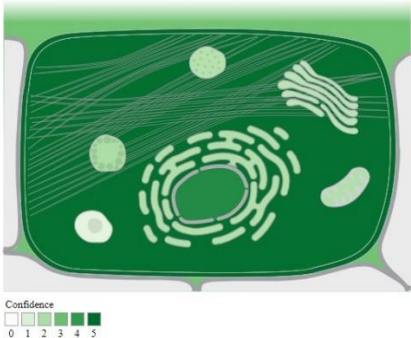
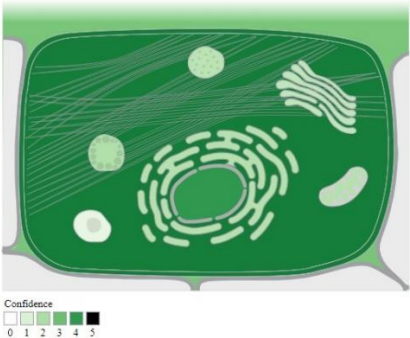
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>PTK2</i>	<i>Ptk2</i>
Naziv	Proteinska tirozinska kinaza 2	Proteinska tirozinska kinaza 2
Sinonimi	FADK, FAK, FAK1, FRNK, PPP1R71, p125FAK, pp125FAK	FAK, FRNK, p125FAK
ID	NCBI: 5747 Ensembl: ENSG00000169398 RGD: 732757 UniProtKB: Q05397	NCBI: 25614 Ensembl: ENSRNOG00000007916 RGD: 3443 UniProtKB: O35346
KL	8q24.3	7q34
GL	GRCh38: 140,657,900 - 141,002,079 (-)	Rnor_6.0: 114,436,419 - 114,611,317 (-)
Sekvencija	NC_000008.11	NC_005106.4
Broj eksona	44	36
Duljina pp	1052 aminokiselina	1055 aminokiselina
Masa pp	119233 Da	119717 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.5.16. *PXN*

Protein paksilin kodira gen *PXN*. Paksilin je citoskeletni protein uključen u aktin-membranske veze na mjestima stanične adhezije na izvanstanični matriks – fokalne adhezije (Tablica 17). Postoje različite transkripcijske varijante koje kodiraju za različite proteinske izoforme koje imaju različiti obrazac ekspresije i različita biokemijska i fiziološka svojstva. Brojni se proteini vezuju na *PXN*, poput regulatora organizacije aktina i strukturalnih proteina. Osim toga, nakon stimulacije faktorom rasta ili djelovanjem integrina, tirozinske kinaze SRC i PTK2 fosforiliraju *PXN* čime se pokreće PTK2(FAK)-SRC-*PXN* signalizacija ([GeneCards, 1997] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 17. Osnovni podatci gena *PXN* i *Pxn* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>PXN</i>	<i>Pxn</i>
Naziv	Paksilin	Paksilin
Sinonimi		
ID	NCBI: 5829 Ensembl: ENSG00000089159 RGD: 1313984 UniProtKB: P49023	NCBI: 360820 Ensembl: ENSRNOG00000001149 RGD: 1305759 UniProtKB: Q66H76
KL	12q24.23	12q16
GL	GRCh38: 120,210,439 - 120,265,771 (-)	Rnor_6.0: 46,797,953 - 46,845,107 (-)
Sekvencija	NC_000012.12	NC_005111.4
Broj eksona	20	14
Duljina pp	591 aminokiselina	586 aminokiselina
Masa pp	64505 Da	64019 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.5.17. SRC

SRC (engl. *SRC proto-oncogene*) je gen koji spada u skupinu protoonkogeni (Tablica 18). Igra važnu ulogu u regulaciji embrionalnog razvoja i staničnog rasta. Postoje dvije transkripcijske varijante ovog gena. SRC je tirozinska kinaza koja se aktivira uključivanjem različitih vrsta staničnih receptora poput receptora imunološkog odgovora, receptora tirozinskih kinaza, citokinskih receptora i dr. Sudjeluje u signalnim putovima koji kontroliraju različite biološke aktivnosti, uključujući transkripciju gena, imunološki odgovor, staničnu adheziju, napredovanje staničnog ciklusa (regulira organizaciju citoskeleta), apoptozu, migraciju i transformaciju. SRC je jedna od primarnih kinaza koja se aktivira nakon uključivanja receptora i igra ulogu u aktivaciji ostalih skupina proteinskih tirozin kinaza (PTK). Uključena je u brojne signalne putove: PTK2(FAK)-SRC, STAT, EGFR/RAS i dr. ([GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 18. Osnovni podatci gena *SRC* i *Src* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

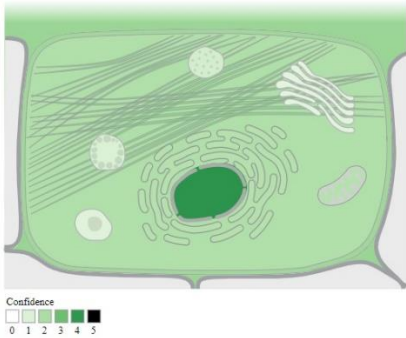
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>SRC</i>	<i>Src</i>
Naziv	Protoonkogen Src	Protoonkogen Src
Sinonimi	ASV1, THC6, c-SRC, p60-Src, SRC	
ID	NCBI: 6714 Ensembl: ENSG00000197122 RGD: 1350530 UniProtKB: P12931	NCBI: 83805 Ensembl: ENSRNOG00000009495 RGD: 620795 UniProtKB: Q9WUD9
KL	20q11.23	3q42
GL	GRCh38: 37,344,685 - 37,405,432 (+)	Rnor_6.0: 153,547,807 - 153,595,643 (+)
Sekvencija	NC_000020.11	NC_005102.4
Broj eksona	17	19
Duljina pp	536 aminokiselina	536 aminokiselina
Masa pp	59835 Da	59973 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.5.18. *SRF*

Gen *SRF* kodira za protein jezgre koji stimulira staničnu proliferaciju i diferencijaciju (Tablica 19). Član je MADS porodice transkripcijskih faktora. Postoje dvije različite izoforme *SRF*. Vezuje se na element reakcije na serum (engl. *serum response element*, SRE) u promotorskoj regiji ciljanog gena. *SRF* regulira aktivnost mnogih gena ranog odgovora, kao primjerice *FOS* i na taj način sudjeluje u regulaciji staničnog rasta i diferencijacije, staničnog ciklusa i apoptozi. *SRF* sudjeluje kao nizvodna meta u mnogim signalnim putovima (MAPK) ([GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 19. Osnovni podatci gena *SRF* i *Srf* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>SRF</i>	<i>Srf</i>
Naziv	Faktor koji reagira na serum	Faktor koji reagira na serum
Sinonimi	MCM1	RGD1559787
ID	NCBI: 6722 Ensembl: ENSG00000112658 RGD: 1321393 UniProtKB: P11831	NCBI: 501099 Ensembl: ENSRNOG00000018232 RGD: 1559787 UniProtKB: D3ZHH8
KL	6p21.1	9q12
GL	GRCh38: 43,171,269 - 43,181,506 (+)	Rnor_6.0: 16,737,637 - 16,747,226 (+)
Sekvencija	NC_000006.12	NC_005108.4
Broj eksona	8	8
Duljina pp	508 aminokiselina	504 aminokiselina
Masa pp	51593 Da	51175 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.5.19. VEGFA

VEGFA (engl. *vascular endothelial growth factor A*) je gen koji kodira za faktor rasta vaskularnog endotela A, člana porodice PDGF/VEGF receptora rasta (Tablica 20). *VEGFA* je faktor rasta koji inducira proliferaciju i migraciju vaskularnih endotelih stanica i nužan je za fiziološku i patološku angiogenezu. Postoje različite varijante alternativnog prekrajanja koje kodiraju za različite izoforme. *VEGFA* je aktivan u angiogenezi, vaskulogenezi i rastu endotelih stanica. Inducira proliferaciju endotelih stanica, potiče migraciju stanica, inducira propusnost krvnih žila i inhibira apoptozu. *VEGFA* se vezuje se za VEGFR1 i VEGFR2 i druge receptore čime pokreće signalne kaskade (VEGF) ([GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

Tablica 20. Osnovni podatci gena *VEGFA* i *Vegfa* te njihovih proteinskih produkata ([NCBI, 1988.] NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018.; [GENECARDS, 1997.] STELZER i sur., 2016.; [ENSEMBL, 1999.] YATES i sur. 2020.; [RGD, 1999.] SMITH i sur. 2020.; [COMPARTMENTS, s. a.] BINDER i sur., 2014.; [UNIPROT, s. a.] THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021.).

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Simbol	<i>VEGFA</i>	<i>Vegfa</i>
Naziv	Faktor rasta vaskularnog endotela	Faktor rasta vaskularnog endotela
Sinonimi	MVCD1, VEGF, VPF	VEGF-A, VEGF111, VPF, Vegf
ID	NCBI: 7422 Ensembl: ENSG00000112715 RGD: 731072 UniProtKB: P15692	NCBI: 83785 Ensembl: ENSRNOG00000019598 RGD: 619991 UniProtKB: P16612
KL	6p21.1	9q12
GL	GRCh38: 43,770,209 - 43,786,487 (+)	Rnor_6.0: 17,340,341 - 17,355,681 (+)
Sekvencija	NC_000006.12	NC_005108.4
Broj eksona	9	8
Duljina pp	232 aminokiselina	214 aminokiselina
Masa pp	27042 Da	25239 Da
Lokalizacija pp		

KL, kromosomska lokacija; GL, genomska lokacija; ID, identifikacijske oznake; pp, proteinski produkt; Da, Dalton (jedinica atomske mase)

2.6. SIGNALNI PUTOVI

Stanična signalizacija uključuje složenu interakciju brojnih proteina, peptida, lipida, iona i malih molekula. Postoje različiti tipovi provođenja signala, a veliki broj kinaza, fosfataza, proteaza i proteina koji vežu nukleotide doprinose unutarstaničnom širenju signala. Mnoge od tih molekula međusobno unakrsno interagiraju i izmjenjuju se njihova aktivna i neaktivna stanja čime se omogućuje regulacija trajanja i intenziteta signala (MCCUDDEN i sur., 2005.).

Angiogeneza je složeni proces u kojem se isprepliću brojne interakcije različitih faktora poput VEGF, FGF, PGF, PDGF, EGF, TNF- α , TGF- β , angiopotetina i mnogih drugih (KELLY i sur., 2003.; CÉBE-SUAREZ i sur., 2006.). Proizvode ih različite vrste stanica uključujući endotelne stanice, fibroblasti, stanice glatkih mišića, trombociti i upalne stanice. Faktori rasta uspostavljaju složenu signalnu mrežu vezanjem na specifične receptore i pokreću različite signalne putove poput RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT/mTOR i PKC, a svaki od njih ima specifične mehanizme aktivacije, različite signalne molekule uključene u transdukciju signala i različite funkcije (FALLAH i sur., 2019.).

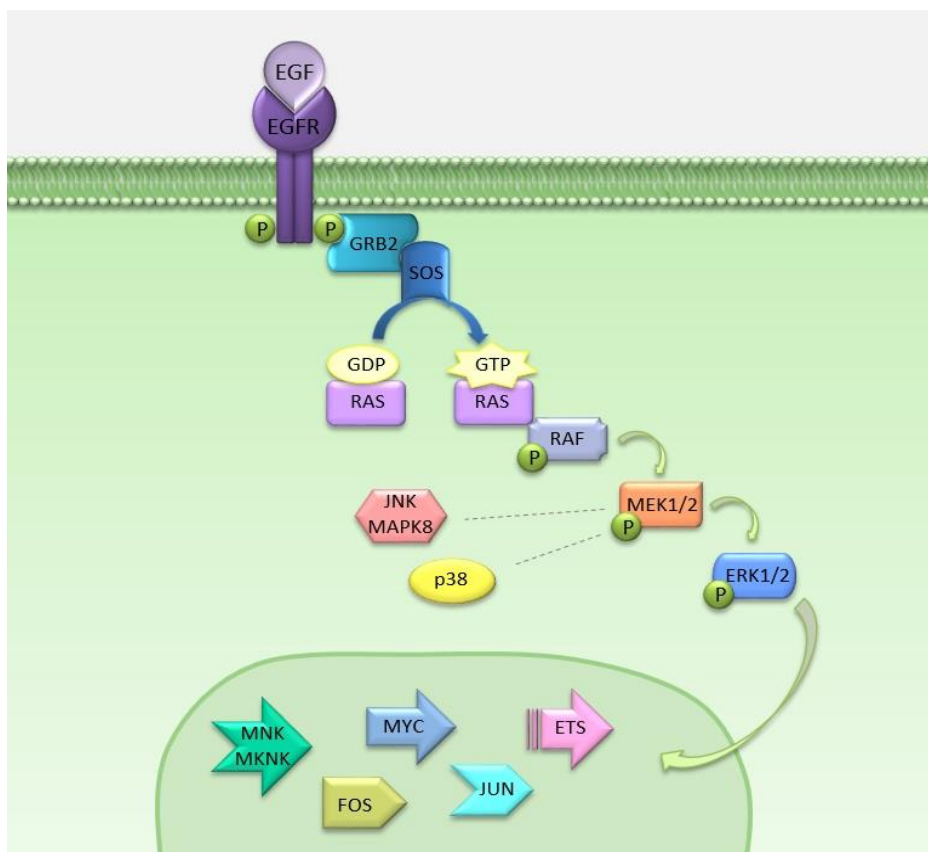
2.6.1. RAS-RAF-MEK-ERK/MAPK

MAPK stanični signalni put je jako složen, s mnogo interakcija i brojnim mehanizmima regulacije. Postoji nekoliko inačica MAPK signalnog puta (MAPKERK1/2, MAPKJNK, MAPKp38 i MAPKERK5), ali najprepoznatljiviji je RAS-RAF-MEK-ERK signalni put. Njegova je funkcija prenošenje signala iz izvanstaničnog okoliša u stanicu, a potom i u jezgru gdje se aktiviraju specifični geni za rast, diobu, diferencijaciju, proliferaciju i migraciju stanica. Osim toga, može stimulirati angiogenezu na način da utječe na ekspresiju gena uključenih u razvoj novih krvnih žila, a ima ulogu i u preživljenju stanica (WIDMANN i sur. 1999.; MOLINA i ADJEI, 2006.; MUNSHI i RAMESH, 2013.).

MAPK signalizacija uključuje modul s tri kinaze koje uspostavljaju aktivacijski put: MAPK kinazu kinazu (MKKK), MAPK kinazu (MKK) i MAPK. Aktivacija MAPK signalnog puta može se dogoditi uslijed različitih stimulansa kao što su citokini, zračenje,

stres, a uglavnom se to događa zahvaljujući faktorima rasta koji se vezuju na receptore tirozinske kinaze (engl. *receptor tyrosine kinase*, RTK). Različite signalizacijske karike variraju ovisno o podražaju, ali osnovne komponente uključuju skup adaptera (GRB2, CRK) koji omogućuju povezivanje receptora s faktorom razmjene nukleotida gvanina (engl. *guanine-nucleotide exchange factor*, GEF), SOS (engl. *son of sevenless*). On aktivira male G-proteine koji vežu GTP (RAS, RAP). To omogućuje fosforilaciju, odnosno aktivaciju sljedećih enzima: MAPKKK (RAF) kinazu MAPK-kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*), zatim MAPKK (MEK1/2) – kinazu MAP-kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*) i naposljetku MAPK (ERK1/2). Aktivirani ERK može regulirati mete u citosolu, ali se također može i translocirati u jezgru gdje fosforilira različite transkripcijske faktore koji reguliraju ekspresiju gena (Slika 10) (WIDMANN i sur., 1999.; MCCAIN, 2013.; BRAICU i sur., 2019.).

Tirozinske kinaze s receptorima, poput EGFR, aktiviraju se izvanstaničnim ligandima, primjerice EGF. Vezanje EGF-a na EGFR uzorkuje dimerizaciju i aktivaciju citoplazmatske domene receptora tirozinske kinaze. EGFR se fosforilira na tirozinskim ostacima što omogućuje vezanje adapterske molekule GRB2. GRB2 sadrži domenu 2 homolognu „Src“ (engl. *Src homology 2 domain*, SH2). Ta je domena ključna za interakciju proteina jer im omogućuje vezanje na fosforilirane ostatke tirozina na drugim proteinima. Osim SH2, GRB2 sadrži i dvije domene 3 homologne „Src“ (engl. *Src homology 3 domain*, SH3) koje su također uključene u proteinsku interakciju na način da omogućuju proteinima vezanje na dijelove bogate prolinima na drugim proteinima. GRB2 se dakle vezuje na fosfotirozinske ostatke aktiviranog EGFR-a zahvaljujući SH2 domeni, a na njega se vezuje faktor razmjene nukleotidnog gvanina SOS pomoću dvije SH3 domene. Stvaranje tog kompleksa uzrokuje aktivaciju SOS koji uzrokuje uklanjanje GDP-a s člana RAS porodice (K-ras, N-ras, H-ras). RAS proteini su odgovorni za regulaciju mnogih staničnih događaja i aktivni su u različitim signalnim kaskadama pa su, osim u MAPK, uključeni i u PI3K i JNK signalizaciju. RAS u neaktivnom stanju vezuje GDP, a njegovim uklanjanjem i vezanjem GTP-a, RAS postaje aktivan (WIDMANN i sur., 1999.; MOLINA i ADJEI, 2006.; BRAICU i sur., 2019.).



Slika 10. Aktivacija RAS-RAF-MEK-ERK/MAPK stanične signalizacije. RAS-RAF-MEK-ERK, odnosno MAPK signalni put se aktivira vezanjem liganda (primjerice EGF) na izvanstaničnu domenu odgovarajućeg receptora tirozinske kinaze (EGFR) koji se potom dimerizira i omogućuje fosforilaciju na unutarstaničnoj domeni receptora. To aktivira receptor i omogućuje vezanje posredničke signalne molekule GRB2 na koju se vezuje molekula SOS na koju se pak vezuje RAS i koja pomaže uklanjanje GDP-a i vezanje GTP-a čime se RAS aktivira. RAS potom aktivira RAF koji može aktivirati nizvodne signalne molekule MEK i ERK. Aktivirana ERK molekula se transportira u jezgru gdje može aktivirati različite transkripcijske faktore (MYC, MKNK, ETS, FOS, JUN).

Nakon aktivacije RAS proteina, regrutira se RAF, član porodice MAPKKK serin/treoninskih kinaza, (ARAF, BRAF, CRAF/RAF1). RAF se vezuje se na njegovu odgovarajuću domenu i potiče signalnu kaskadu fosforilacijom MAPKK proteina (MEK1 i MEK2), enzima koji imaju dvostruku specifičnost za tirozinske i za serin/treoninske aminokiselinske ostatke – svojstvo koje je ključno za prepoznavanje tzv. aktivacijske petlje te fosforilaciju trećeg, finalnog enzima u kaskadi – MAPK (ERK1 i ERK2). Aktivacijom ERK1 i ERK2 omogućena je njihova dimerizacija i translokacija u jezgru gdje fosforiliraju serinske i treoninske ostatke i aktiviraju različite faktore transkripcije i kinaze, uključujući

MYC, ETS1, SAP1, ELK1, FOS, JUN, SRC1, i dr. ERK1 i ERK2 mogu i indirektno djelovati na transkripciju nekih gena, primjerice fosforilacijom kinaze ribosomskog proteina S6 (engl. *90 kDa ribosomal protein S6 kinases*, p90RSK) koji ima važnu ulogu u regulaciji transkripcije, translokaciji u jezgru i fosforilaciji proteina FOS, SRF i CREB. Protein p90RSK ima važnu ulogu i u staničnom preživljenju fosforilacijom proteina BAD – Bcl2 antagonista stanične smrti (engl. *Bcl2-Antagonist of Cell Death*). Osim navedenog, ERK1 i ERK2 mogu aktivirati neke citoskeletne proteine (paksilin), proteinske kinaze i fosfolipaze, ali mogu i fosforilirati proteine aktivne uzvodno u navedenoj kaskadi, kao što su EGFR, SOS, RAF i MEK. Smatra se da na taj način mehanizmom povratne sprege mogu kontrolirati aktivnosti regulatora MAPK signalnog puta. (WIDMANN i sur., 1999.; ROUX i BLENIS, 2004.; MOLINA i ADJEI, 2006.; AVRUCH, 2007.; MEBRATU i TESFAIGZI 2009., BRAICU i sur., 2019.)

2.6.2. PI3K-AKT-eNOS-VEGF

PI3K/AKT signalni put je, kao i već spomenuti MAPK, jako složen i ima veliki broj faktora uključenih i druge signalne putove. Igra ključnu ulogu u brojnim staničnim funkcijama, uključujući proliferaciju, adheziju, migraciju, invaziju, metabolizam, preživljavanje, regulaciju staničnog ciklusa i angiogenezu (BONONI i sur., 2011.; KARAR i MAITY, 2011.).

PI3K su lipidne kinaze koje fosforiliraju hidroksilnu grupu na položaju 3 inozitolnog prstena fosfatidilinozitola, a razlikujemo tri njihova razreda (I, II i III). PIP3 je važan lipidni glasnik koji nastaje zahvaljujući PI3K, a koji je važan za nekoliko putova transdukcije signala. PIP3 aktivira serin/treoninske kinaze PDK1 i AKT (BONONI i sur., 2011.; KARAR i MAITY, 2011.).

Vežanje liganda na odgovarajući receptor može aktivirati (fosforilirati) PI3K/AKT signalni put, kao primjerice kod vežanja VEGF, angiogenog faktora čiji učinci na endotelne stanice se dijelom posreduju putem PI3K. Neki tipovi PI3K s određenim podjedinicama se mogu aktivirati receptorima uparenim s G-proteinima, ili direktno preko podjedinica G-proteina, ili indirektno, preko primjerice Ras proteina, vežanjem na Gtp-Ras kompleks. Kako je već navedeno, u procesu angiogeneze najčešće se opisuje vežanje VEGF na VEGFR2 (KARAR i MAITY, 2011.; PAL i MANDAL, 2012.).

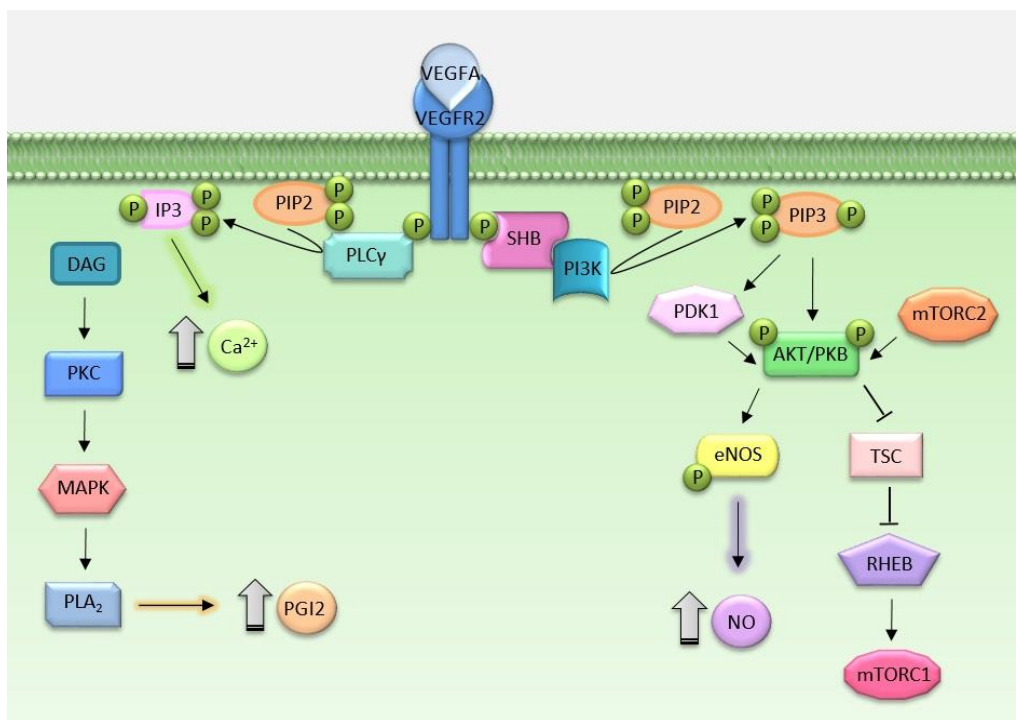
VEGF svoj učinak prvenstveno ostvaruje kroz proizvodnju vazodilatacijskih medijatora. Kada se veže ligand, VEGFR2 se dimerizira te se aktivira unutarstanična domena receptora tirozin kinaze što rezultira njenom autofosforilacijom tirozinskih ostataka. To može dovesti do aktiviranja različitih signalnih putova (PANDEY i sur., 2018.). Src se može vezati na receptor uslijed čega se SHB, zahvaljujuću svojoj SH2 domeni, može vezati na fosforilirani tirozinski ostatak (a može se vezati i bez posrednika). Src fosforilira SHB što omogućava aktivaciju PI3K (WELSH i sur., 2016.). Aktivirani PI3K fosforilira PIP2 u PIP3 koji potom vezuje AKT i omogućava njegovu fosforilaciju od strane proteinske kinaze ovisne o fosfoinozolidu, PDK1 (engl. *phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) (HEMMINGS i RESTUCCIA, 2012.). Proteinska kinaza dvostruke specifičnosti, PTEN (engl. *phosphatase and tensin homolog*) negativno regulira PI3K signalizaciju defosforilacijom, uklanjanjem fosfata s položaja 3 inozitolnog trifosfata, čime opet nastaje PIP2. Na taj način se smanjuje količina AKT koji inhibira apoptozu, kontrolira sintezu proteina i rast stanica (BONONI i sur., 2011.; KARAR i MAITY, 2011.). AKT se može aktivirati i zahvaljujući kompleksu kinaze mTOR2, mete rapamicina kod sisavaca (engl. *mammalian target of rapamycin*). Fosforiliranjem i aktiviranjem AKT, on fosforilira kompleks tuberozne skleroze (engl. *tuberous sclerosis complex*, TSC) čime ga inhibira. Uloga TSC je inhibicija RHEB proteina, GTPaze koji u neaktivnom stanju ima vezanu GDP skupinu koja se zamjenjuje GTP-om, RHEB se aktivira i vezuje na mTOR1 kompleks. Kroz transkripcijske, translacijske i postranslacijske mehanizme posredovane substratima kompleksa mTOR1, uključujući kinaze ribosomalnog proteina S6, mTORC1 stimulira biosintezu 3 glavne vrste makromolekula; proteina, lipida i nukleinskih kiselina (HUANG i MANNING 2009.; DIBBLE i CANTLEY, 2015.).

Nakon vezanja VEGFR i aktivacije VEGFR2 te posljedičnog pokretanja PI3K/AKT signalizacije, povećava se razina kalcija unutar stanice. To aktivira kalmodulin, protein koji veže kalcij i koji aktivira eNOS što vodi do sinteze NO. Povećanje proizvodnje NO potiče vazodilataciju, vaskularnu propusnost i preživljavanje endotelnih stanica, a njegova se proizvodnja pažljivo regulira višestruko međuovisnim kontrolnim mehanizmima i signalnim putovima kako bi mogao odgovoriti na različite fiziološke podražaje. Sinteza NO regulirana je enzimima NOS od kojih prepoznajemo tri izoforme: nNOS/NOS1 (neuralna sintaza dušikovog monoksida, engl. *neuronal nitric oxide synthase*) i eNOS/NOS3 koji su konstitutivno izraženi, dok je ekspresija treće izoforme, iNOS/NOS2, inducibilna i aktivira se po potrebi. PI3K/AKT nizvodna signalizacija

također može dovesti do fosforilacije eNOS-a, što osigurava održivi, o kalciju neovisan podražaj za povećanje aktivnost eNOS. VEGF signalizacija također dovodi po povećanja razine eNOS mRNA i proteina čime se pojačava dugotrajna ekspresija eNOS-a. (DUDZINSKI i MICHEL, 2007.; PANDEY i sur., 2018.). Metabolički stres uslijed kojeg se razgrađuje ATP stimulira adenosin-monofosfat (engl. *adenosine monophosphate*, AMP) kinazu što vodi do aktivacije eNOS. Hipoksija također može povećati eNOS fosforilaciju vezanjem HSP90 na eNOS i aktiviranjem PI3K/AKT puta (KARAR i MAITY 2011.).

Fosforilirani tirozinski ostatak na unutarstaničnoj domeni VEGFR2 može poslužiti kao vezujuće mjesto za PLC γ zahvaljujući njenoj SH2 domeni (ima dvije SH2 domene i jednu SH3 domenu). Time se PLC γ aktivira i može pretvoriti PIP2 u DAG i IP3, a događa se i povećanje razine kalcija unutar stanice. DAG može aktivirati proteinsku kinazu C koja potom preko mitogenom aktiviranih proteinskih kinaza (MAPK) utječe na transkripciju različitih gena, ali i aktivira fosfolipazu A2 (engl. *phospholipase A*, PLA2) što u konačnici dovodi do povećanih razina prostaciklina koji povećava vaskularnu propusnost i vazorelaksaciju, a kao i NO, može antagonizirati učinke vazokonstriktivnih medijatora kao što je endotelin-1. IP3 sudjeluje kao posrednik u povećanju unutarstanične razine kalcija (omogućuje regrutaciju kalcija iz endoplazmatskog retikuluma) (PANDEY i sur., 2018.) (Slika 11).

Jedan od najsnažnijih podražaja za pojačanu proizvodnju VEGF-a je hipoksija. Sniženi pO₂ dovodi do aktivacije inducibilnog faktora hipoksije 1 (HIF-1), faktora transkripcije koji se veže za brojne odgovarajuće promotore, što dovodi do transkripcije desetaka ciljanih gena, uključujući *VEGF*. Donori NO-a mogu povećati ekspresijsku i transkripcijsku aktivnost HIF-1, što rezultira indukcijom mRNA VEGF-a. Vezanje transduktora signala i aktivatora transkripcije 3 (engl. *Signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3) na VEGF promotor je također važno za povećavanje transkripcije mRNA *VEGF* u uvjetima hipoksije. Aktivacija određenih signalnih putova isto tako može povećati ekspresiju *VEGF* (KARAR i MAITY 2011.).



Slika 11. Aktivacija PI3K-AKT-eNOS-VEGF stanične signalizacije. Prilikom vezanja liganda VEGFA na VEGFR2, receptor se dimerizira, pokreće se aktivnost tirozinske kinaze što rezultira autofosforilacijom unutarstaničnih domena. Time se otvara mogućnost aktivacije različitih signalnih putova. Pokretanjem PI3K/AKT signalizacije povećava se unutarstanična razina kalcija što aktivira kalmodulin koji se veže na NOS3 koji započinje sintezu NO. AKT također može inhibirati TSC kompleks koji inače drži RHEB protein u neaktivnom (GDP) stanju. RHEB se aktivira (GTP) i aktivira mTOR signalizaciju što vodi do aktivacije translacije. VEGFR2 signalizacija vođe voditi do aktivacije PLC γ , koja pretvara PIP2 u DAG i IP3. IP3 također može posredovati povećanje unutarstaničnog kalcija, dok DAG može aktivirati PKC koja, putem MAPK može aktivirati PLA₂ što će rezultirati povećanom količinom prostaciklina.

2.6.3. PTK2(FAK)-SRC-PXN

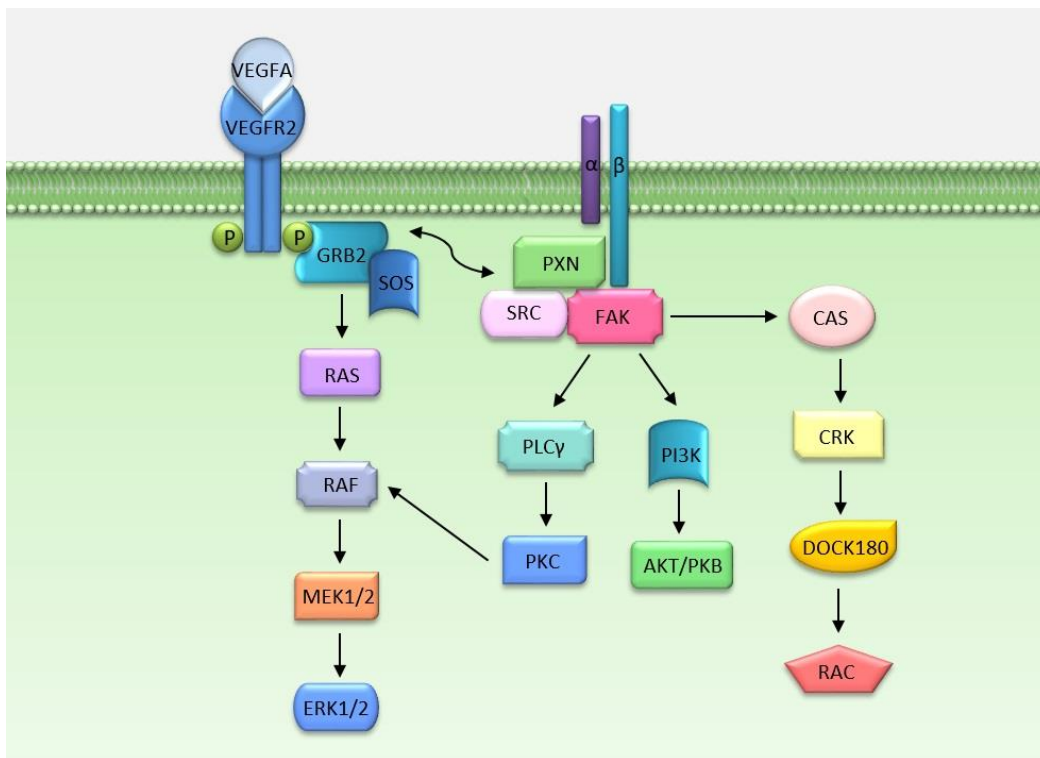
Osim pokretanja staničnih signalnih putova koje se događa vezanjem liganda na receptor tirozinske kinaze, u procesu cijeljenja je od iznimne važnosti i njihovo pokretanje zahvaljujući integrinskoj aktivaciji. Integrini su heterodimerni transmembranski proteini koji služe za staničnu adheziju (s dr. stanicama ili ECM) i koji se sastoje od α i β podjedinice koje imaju veći broj poznatih izoformi. Prijenos signala kod integrina malo se

razlikuje od prijenosa signalizacije receptora faktora rasta koji su tirozinske kinaze. Među njima se često događa komunikacija, uzajamna signalizacija i suradnja u regulaciji različitih staničnih procesa kao što su proliferacija, adhezija, migracija i preživljenje stanica (VACHON, 2011.).

Iako i integrini reagiraju na ligande, za razliku od većine receptora za faktore rasta, oni nemaju kinazno djelovanje te zbog toga trebaju svojevrzne posrednike koji će provesti signal nakon njihove aktivacije. Primjerice, citoplazmatska β podjedinica integrina može regrutirati i aktivirati SRC protein koji će aktivirati FAK, dok će citoplazmatska $\beta 1$ podjedinica regrutirati i aktivirati FAK protein koji će pak aktivirati SRC. PTK2(FAK)-SRC signalizacija je jako važna za sastavljanje fokalnih adhezija zahvaljujući interakcijama s velikim brojem partnera (npr. paksilin, talin i vinkulin), kako bi se osigurala komunikacija ECM-a i stanica te za regulaciju stabilnosti aktinskog citoskeleta (VACHON, 2011.). Zahvaljujući PTK2(FAK)-SRC-PXN signalizaciji, regrutiraju se i drugi proteini do staničnog ruba gdje se spajaju aktinski filamenti oko integrina i čine tzv. stanična sidra. Ti kompleksi pomažu sastavljanje i učvršćivanje veza između aktinskog citoskeleta i ECM, važnih u moduliranju stanične adhezije i migracije i transdukciju signala tijekom angiogeneze (ZHAO i GUAN, 2011.; TOUTOUNCHIAN i sur., 2017.).

Vezanje liganda ECM-a, primjerice fibronektina, vitronektina, laminina ili kolagena, na integrin omogućuje regrutiranje i aktivaciju FAK/PTK2. FAK je proteinska kinaza ključna za signalizaciju posredovanu integrinom i RTK koja je uključena u staničnu adheziju i migraciju i koja se može naći u većem broju na mjestima fokalnih adhezija (mjesto sidrenja st. membrane, odnosno mjesto sastavljena od većeg broja proteina na membrani kroz koje se prenosi signali između ECM-a i stanice). FAK protein se sastoji od nekoliko domena: N domene koja je važna za interakciju s integrinima, receptorima faktora rasta i aktinskim citoskeletom; centralne domene koja ima katalitičku aktivnost te C domene gdje se nalaze mjesta interakcije proteina kao što su paksilin i talin, a koja ima domenu koja usmjerava FAK prema kompleksima fokalne adhezije (engl. *focal adhesion targeting*, FAT). Kako je navedeno, nakon angažmana integrina, FAK se (auto)fosforilira i povećava se njegova katalitička aktivnost. Olakšano je vezanje signalnih molekula preko njihovih SH2 i SH3 skupina. Jedan od značajnijih proteina koji se veže zahvaljujući svojoj SH2 domeni je već navedena SRC kinaza. Može se vezati i PI3K (direktno ili indirektno, putem SRC), a u svakom slučaju se aktivira AKT što dalje pokreće signalizaciju. Isto tako, mogu se vezati PLC γ , adaptorski proteini GRB2, GRB7, SCH, CAS (p130CAS) i CRK,

male GTPaze (RAS, RHEB) ili njihovi regulatori (ASAP, GRAF), kinaze (CAS) i dr. Vežanje GRB2-SOS kompleksa (također može biti direktno ili indirektno, opet preko SRC) dovodi do aktivacije RAS, odnosno MAPK signalnog puta (Slika 12) (PARSONS, 2003.; WESTHOFF i sur., 2004.; HUVENEERS i DANEN 2009.; VACHON, 2011.; WELSH i sur., 2016.).



Slika 12. Aktivacija PTK2(FAK)-SRC-PXN stanične signalizacije. Prilikom vezanja liganda izvanstaničnog matriksa na integrin, pokreću se različiti događaji u stanici koji uključuju vezanje FAK čime se omogućuje vezanje SRC, potom i paksilina. FAK/SRC kompleks privlači više signalnih molekula čime se pokreće veći broj signalnih putova: aktivacija MAPK, PI3K/AKT, PLC γ /PKC i CAS/CRK/DOCK180/RAC kaskada. Navedeni događaji su međusobno isprepleteni, a vode do stvaranja fokalnih adhezija važne za komunikaciju stanica i izvanstaničnog matriksa. Opisani signalni putovi su važni za regulaciju transkripcije gena, translacije proteina, njihovu organizaciju i interakciju, odnosno na razini stanice, na organizaciju matriksa, staničnu proliferaciju, pokretljivost i preživljenje.

Paksilin, važna komponenta fokalnih adhezija koji djeluje uglavnom kao adaptor proteina, stvarajući niz veznih mjesta za druge proteine i omogućujući stvaranje multiproteinskih kompleksa, se može i izravno vezati na citoplazmatski dio integrina.

Takvo vezanje uzrokuje fosforilaciju paksilina i omogućuje regrutiranje proteina uključenih u stvaranje fokalne adhezije kao što su FAK, talin, vinkulin, tenzin i transdukciju signala. Kroz navedene interakcije paksilin ima ključnu ulogu u raznim fiziološkim procesima kao što su ekspresija gena, organizacija matriksa, pregradnja tkiva, stanična proliferacija, stanično preživljavanje i stanična pokretljivost (ZHAO i GUAN, 2011.; LÓPEZ-COLOMÉ i sur., 2017.).

Vezanje p130CAS na FAK preko SH3 domene potiče vezanje adapterskog proteina CRK preko SH2 domene na p130CAS, što aktivira posrednika citokineze DOCK180 (engl. *dedicator of cytokinesis*), GEF za male G-proteine porodice Rho, što u ovom slučaju aktivira protein RAC koji je uključen u stvaranje lamelipodija i migraciju stanica (GUAN, 1997.; PARSONS i sur., 2000.; ZHAO i GUAN, 2011.).

2.6.4. SRC-PLC-PKC-MEK-ERK

Iako je u procesu angiogeneze glavno mjesto zauzela signalizacija koja se odvija zahvaljujući staničnim receptorima i ligandima kao što su VEGF i FGF, receptori povezani s G-proteinom (engl. *G-protein-coupled receptors*, GPCR) i njihovi agonisti poput trombina i angiotenzina II također su važni za provođenje i kontrolu brojnih angiogenih signala (RICHARD i sur., 2001.).

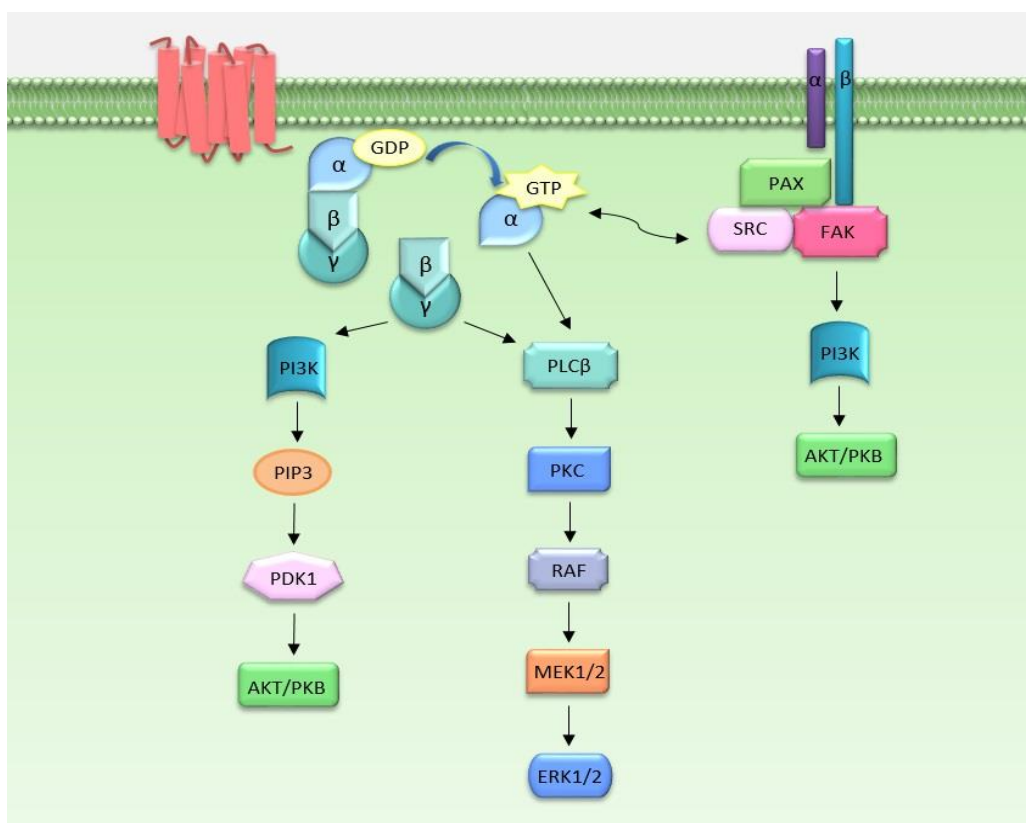
Receptori povezani s G-proteinom su najveća porodica transmembranskih proteina. Sastavljeni su od sedam α -zavojnica koje se protežu membranom, a između kojih se nalaze unutarstanične i izvanstanične omče. Uloga GPCR-ova je odgovoriti na vezanje agonista aktivacijom određenog G-proteina što vodi do moduliranja nizvodnih efektorskih proteina i signalnih putova. GPCR-ovi se klasificiraju na temelju njihove sekvencije i strukturne sličnosti, a unatoč zajedničkim osobinama, pojedini GPCR-ovi imaju jedinstvene kombinacije transdukcije signala koje uključuju više podtipova G-proteina, kao i signalne putove neovisne o G-proteinima i složene mehanizme regulacije (ROSENBAUM i sur., 2009.).

G-proteini su proteini koji vežu nukleotid gvanin (engl. *Guanine nucleotide-binding proteins*) i radi se o GTP-azama. Postoje dvije osnovne skupine: heterotrimerni G-proteini sastavljeni od tri podjedinice (α , β i γ) s velikim brojem varijanti a time i

međusobnih kombinacija svrstanih u 4 porodice (Gs, Gi, Gq i G12) te mali monomerni G-proteini (RAS, RHO, RAB, RAN i ARF) (HUROWITZ i sur., 2000.; MCCUDDEN i sur., 2005.; WENNERBERG i sur., 2005.). Različiti tipovi G-proteina na različit način komuniciraju s određenim molekulama što se odražava na staničnu signalizaciju. G-proteini različitim mehanizmima reguliraju mitogenom aktivirane signalne putove (ERK1/2, JNK, p38MAPK, ERK5 i ERK6) (GOLDSMITH i DHANASEKARAN, 2007.). Heterotrimerni G-proteini interagiraju s GPCR-ovima, a aktivnost mogu zahvaliti α podjedinici koja ima GTPaznu aktivnost. U neaktivnom stanju GDP je vezan za $G\alpha$ podjedinicu koja je blisko povezana s heterodimerom $G\beta\gamma$ podjedinica. Vezanjem liganda na GPCR, mijenja se njegova konformacija čime može interagirati s G-proteinom te se ponaša kao faktor izmjene nukleotida gvanina i mijenja GDP za GTP na $G\alpha$ podjedinici te se ona odvaja od $G\beta\gamma$ podjedinice. Obje novonastale podjedinice: $G\alpha$ -GTP i $G\beta\gamma$ mogu aktivirati različite signalne putove, dok aktivirani GPCR može nastaviti aktivirati G-proteine (do utišavanja arestinom, primjerice) (HUROWITZ i sur., 2000.; MCCUDDEN i sur., 2005.; LUTTRELL, 2006.; HANLON i ANDREW, 2015.; WEIS i KOBILKA, 2019.).

Aktivirani G-protein, odnosno njegove podjedinica $G\alpha$ može regulirati i djelovati na brojne efektorske molekule poput kalcija, adenilatne ciklaze i fosfolipaze C- β . Aktiviranjem adenilatne kinaze katalizira se sinteza cikličkog AMP (cAMP) iz molekule ATP. Cikličke AMP aktiviraju RAP1 proteine (male GTP-aze) koji tvore aktivni kompleks s BRAF proteinom što rezultira aktivacijom MEK1/2 pa ERK1/2. Cikličke AMP mogu aktivirati i PKA (proteinsku kinazu A), što aktivira RAP1, a potom i BRAF/MEK/ERK signalizaciju. Aktivacija PLC β povećava razinu unutarstaničnog kalcija, aktivira PKC i također potiče RAS/RAF-1/MEK/ERK, a može rezultirati i pretvaranjem PIP2 molekule u DAG i IP3 koji također mogu aktivirati PKC (GOLDSMITH i DHANASEKARAN, 2007.; NEW i WONG, 2007.; TUTEJA, 2009.). PKC može aktivirati kompleks sastavljen od proteina SRC i tirozinsku kinazu bogatu prolinom, PTK2B, inače člana porodice FAK proteina koji aktivira GRB2, koji je također uključen u aktivaciju ERK. Inače, mehanizmi aktivacije SRC proteina su izrazito heterogeni i dobro oslikavaju složenost međudodosa signalnih molekula: mogu ih aktivirati G-proteini, odnosno njihove podjedinice, moguća je njihova aktivacija direktnom interakcijom s GPCR, ali može ih se aktivirati i zahvaljujući unakrsnoj interakciji GPCR-a i drugih receptora te kompleksa fokalnih kinaza koji mogu regrutirati SRC. Aktivacija SRC se događa kroz SH2 ili SH3 domenama posredovane

interakcije i stvaranja signalnih kompleksa koji se mogu sastojati od velikog broja signalnih proteina (paksilin, CRK/C3G, GRB2/SOS, RAS) ili primjerice preko vezanja na spoj β -arestina i GPCR. Upravo su arestini važna komponenta u prijenosu i regulaciji različitih signalnih aktivnosti ne samo s receptora na nizvodne komponente, već i obrnuto (CHO i sur., 2005.; LUTTRELL i LUTTRELL, 2004.; MCGARRIGLE i HUANG, 2007.). $G\beta\gamma$ podjedinica je također pozitivan regulator kalijevih kanala i velikog broja efektora kao što su adenilil ciklaza, $PLC\beta$, $PLA2$ i $PI3K$, kao i $G\alpha$ podjedinica, a može djelovati i kao njen aktivator. Osim navedenih signalnih kaskada, opisani događaji mogu djelovati i na JNK, p38, $NF-\kappa\beta$, STAT i dr. signalne putove (Slika 13) (GOLDSMITH i DHANASEKARAN, 2007.; NEW i WONG, 2007.; TUTEJA, 2009.).



Slika 13. Aktivacija SRC-PLC-PKC-MEK-ERK stanične signalizacije. Vezanje liganda na GPCR mu omogućuje aktivaciju G-proteina, odnosno razdvajanje njegovih $G\alpha$ i $G\beta\gamma$ podjedinica zahvaljujući čemu one mogu djelovati na brojne efektorske molekule i pokrenuti različite signalne putove kao što su SRC-PLC-PKC-MEK-ERK, $PI3K$ -AKT, JNK, p38 i $NF-\kappa\beta$. Signalne molekule uključene u navedene signalne putove komuniciraju i reguliraju staničnu signalizaciju važnu za njenu proliferaciju.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

3.1. HIPOTEZA

Pretpostavlja se da će primjena pentadekapeptida BPC 157 na modelu cijeljenja rane kod štakora najvjerojatnije imati aktivacijski učinak na ekspresiju gena povezanih s angiogenezom i da će potaknuti jedan ili više signalnih putova koji sudjeluju u procesu angiogeneze: RAS-RAF-MEK-ERK/MAPK, PI3K-AKT-eNOS-VEGF, PTK2(FAK)-SRC- PXN i SRC-PLC-PKC-MEK-ERK.

3.2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je istražiti učinak peptida BPC 157 na razinu ekspresije gena povezanih s angiogenezom nakon izazivanja rana u štakora, potvrditi djelovanje BPC 157 na ekspresiju tih gena, pokazati njegov angiogenetski učinak na molekularnoj razini, identificirati zahvaćene signalne putove i dijelom rasvijetliti mehanizam djelovanja peptida BPC 157.

Specifični ciljevi istraživanja bili su:

- odrediti razliku u ekspresiji gena povezanih s angiogenezom kod cijeljenja rana kontrolnih životinja i životinja tretiranih s peptidom BPC 157,
- utvrditi vremena trajanja u kojem se događa promjena u količini mRNA,
- identificirati signalne putove na koje BPC 157 ima aktivacijsko djelovanje,
- otkriti potencijani molekularni mehanizam djelovanja peptida BPC 157 na angiogenezu.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

Istraživanje je napravljeno na ukupno 42 ženke Wistar albino štakora, prosječne tjelesne mase od oko 250 grama i dobi od 12-14 tjedana. Životinje su bile smještene u nastambi za laboratorijske životinje na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (broj odobrenja: HR-POK-007). Laboratorijske životinje su bile smještene u standardne kaveze (2/kavez) u prozračenu i klimatiziranu prostoriju temperature 22-24°C i relativne vlage od 30-70 %. Ciklusi svjetlosti i tame izmjenjivali su se svakih 12 sati s dnevnim ciklusom od 08:00 do 20:00. Životinje su se hranile peletima koji su bili dostupni *ad libitum*, kao i voda.

Istraživanje je odobreno od strane Povjerenstva za etiku u veterinarstvu Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Klasa: 640-01/18-17/01, Ur. broj: 251-61-44/168-18/23), Etičkog povjerenstva Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (Klasa: UP/I-322-01/17-01/107, Ur. broj: 525-10/0255-18-6, EP 123/2018) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Klasa: 641-01/17-02/01, Ur. broj: 380-59-10106-17-100/212).

Svi postupci provedeni su u skladu sa Standardnim operativnim postupcima za laboratorijske životinje uzimajući u obzir Zakon o zaštiti životinja (NN 102/17), a osiguranje etičkih načela u ispitivanju osigurano je pridržavanjem Pravilnika o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13), Direktive 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća, preporuke Europske asocijacije za laboratorijske životinje FELASA-e te preporukama povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, preporukama Etičkog povjerenstva Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske i preporukama Etičkog povjerenstva Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.2. EKSPERIMENTALNE SUPSTANCIJE

1. Pentadekapeptid BPC 157 (aminokiselinski slijed: GEPPPGKPADDAGLV, Mr = 1419) dio je BPC peptida. Sintetizira ga Diagen (Ljubljana, Slovenija), prema patentu EPO 57268. Visokotlačna tekućinska kromatografija daje spoj 99 % -tne čistoće s 1-des-Gly peptidom kao nečistoćom. U ovom istraživanju korišten je BPC 157 otopljen u fiziološkoj otopini (2 µg/mL) u dozi od 10 µg/kg tjelesne mase (t.m.) kod eksperimentalnih životinja
2. Natrijev klorid, NaCl, 0.9 % otopina za infuziju (B. Braun, Njemačka); primjenjena doza 5 ml/kg t.m. za životinje kontrolnih skupina
3. Tiopental (Pliva, Hrvatska); 40 mg/kg
4. Diazepam (Krka, Slovenija); 10 mg/kg
5. Cytocool II (Richard-Allan Scientific, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD)
6. RNase-Erase (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD)
7. 96 % Etanol, p.a. (Kemika, Hrvatska)

4.3. REAGENSI ZA MOLEKULARNU ANALIZU

1. TRIzol Reagent (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD)
2. Kloroform, p.a. (Kemika, Hrvatska)
3. 2-propanol, p.a. (Kemika, Hrvatska)
4. Apsolutni etanol, p.a. (Kemika, Hrvatska)
5. Voda molekularne čistoće bez DNA-za i RNA-za, Nuclease-Free Water Molecular Biology Grade (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD)
6. Kit za lančanu reakciju polimerazom kojoj prethodi reverzna transkripcija (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR) u jednom koraku, QIAGEN One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Nizozemska)
7. Početnice za provjeru RNA (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD)
8. Molekularni marker, Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs, Massachusetts, SAD)

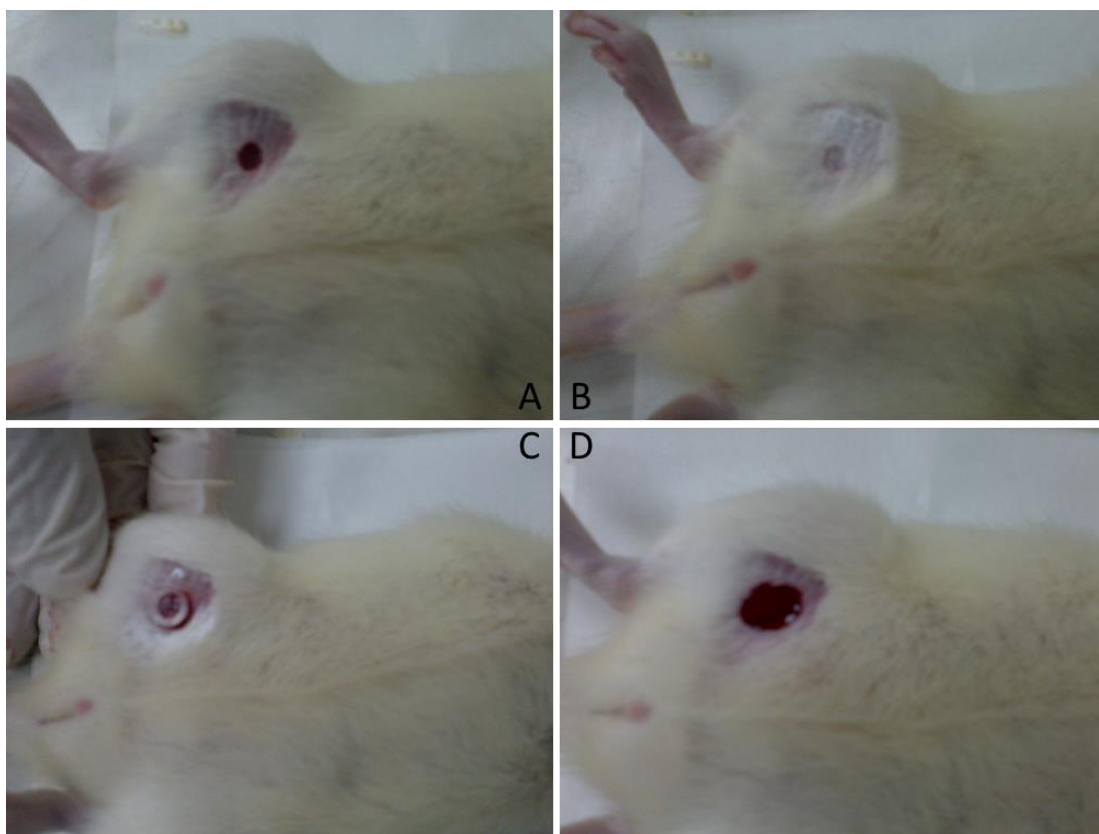
9. Kit za reverznu transkripciju (engl. *reverse transcription*, RT), High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD)
10. Inhibitor RNAza, RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD)
11. Reagens za analizu genske ekspresije, TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD)
12. Testovi za analizu genske ekspresije, TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD)

4.4. EKSPERIMENTALNI PROTOKOL

Životinje su nasumično podijeljene u 7 skupina u kojima je bilo po 6 jedinki. Nakon raspodjele životinja u skupine, anestetizirane su koristeći natrijev tiopental (40 mg/kg t.m.) i diazepam (10 mg/kg t.m.), a potom su izvagane, označene i podvrgnute operacijskom zahvatu. Tvari korištene u ovom istraživanju aplicirane su u trbušnu šupljinu (intraperitonealno). U supinacijskom položaju životinje pažljivo smo škarama odstranili dlake i 70 %-tni etilnim alkoholom očistili kožu unutarnjeg dijela stražnjeg desnog ekstremiteta. Napravili smo ekscizijsku ranu okruglim nožićem za biopsije promjera 5 mm (engl. *biopsy punch*) (Slika 14) u punoj debljini kože i potkožja noge nakon čega je odmah intraperitonealno aplicirana otopina BPC 157 u fiziološkoj otopini (2 µg/mL) u dozi od 10 µg/kg t.m. kod eksperimentalnih životinja, odnosno fiziološka otopina u dozi od 5 mL/kg t.m. kod kontrolne skupine, nakon čega je mjereno vrijeme od dvije, pet, odnosno 10 minuta. Za to je vrijeme rana bila nepokrivena. Nakon protoka određenog vremena, rana je lokalno smrznuta koristeći Cytocool II sprej kako bismo zaustavili fiziološke procese. Nakon toga je uzet uzorak kože i potkožja u obliku prstena oko rane koristeći okrugli nožić za biopsije promjera 8 mm (Slika 15). Odmah po uzorkovanju, tkivo je smrznuto u tekućem dušiku i pohranjeno do izolacije RNA, odnosno molekularne analize. Jedna od skupina – intaktna, odnosno “nulta kontrola” nije bila tretirana ničim od navedenog i tim je životinjama tkivo uzeto nakon aplikacije anestezije, u nultom vremenu, bez davanja fiziološke otopine, odnosno otopine BPC 157.



Slika 14. Okrugli nožići za biopsije promjera 5 mm (lijevo), odnosno 8 mm (desno).



Slika 15. Protokol s fazama izazivanja rane (A), lokalnog smrzavanja rane (B), izrezivanja prstena (C) i uzorkovanja materijala (D).

4.5. IZOLACIJA RNA IZ TKIVA

Uzorci tkiva su spremljeni u tekući dušik na na -196°C do izolacije RNA. Prije ekstrakcije ukupne RNA, tkivo je homogenizirano korištenjem homogenizatora Bio-Gen PRO200 (PRO Scientific, Oxford, Connecticut, SAD) u 1000 μl TRIzol Reagenta (Slika 16). Nakon 10 minuta na sobnoj temperaturi, homogenatu je dodano 200 μl kloroforma i suspenzija je snažno miješana 15 sekundi nakon čega je ostavljena na sobnoj temperaturi 5 minuta. Potom je uslijedilo centrifugiranje na 12000 x g, 15 minuta na $+4^{\circ}\text{C}$ (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Njemačka). Nakon centrifugiranja pažljivo je izdvojena vodena faza te je na nju dodano 500 μl 2-propanola i uzorak je ostavljen na sobnoj temperaturi 10 minuta pa ponovno centrifugiran na 12000 x g, 10 minuta na $+4^{\circ}\text{C}$. Nakon centrifugiranja, talog je 2 puta ispran koristeći po 1000 μl 75 %-tnog etilnog alkohola te je potom uslijedilo centrifugiranje na 7500 x g, 5 minuta. Supernatant je odstranjen, a talog RNA je ostavljen u otvorenoj epruvetici 10 minuta na sobnoj temperaturi kako bi ishlapio preostali alkohol. RNA je potom otopljena u 50 μl destilirane vode bez RNAza/DNAza. Izolati RNA su pohranjeni na -20°C do određivanja koncentracije.



Slika 16. Homogenizacija uzorka.

4.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE RNA

Koncentracija RNA uzoraka izmjerena je pomoću Nano Drop ND-1000 spektrofotometra (Nano Drop Technologies, Massachusetts, SAD). Izračunata je srednja vrijednost nakon 2 mjerenja, a dobiveni su podatci iskorišteni za izradu proračuna za reakciju reverzne transkripcije.

4.7. PROVJERA KAKVOĆE I ČISTOĆE RNA

Prije izvođenja reverzne transkripcije za qPCR, napravljena je RT-PCR analiza u jednom koraku za internu, tj. endogenu kontrolu *Gapdh*. Korišten je QIAGEN One-Step RT-PCR Kit, a reakcijska smjesa je sadržavala 13 µl destilirane vode bez RNAza/DNAza, 5 µl 5x RT-PCR pufera, 1 µl mješavine deoksinukleotida (engl. *deoxynucleotide*, dNTP), 1 µl RT-PCR mješavine enzima, 1 µl 10 µM uzvodne početnice (engl. *forward primer*, F) i 1 µl 10 µM nizvodne početnice (engl. *reverse primer*, R) (Tablica 21) te 3 µl RNA izolata. Reakcijske smjese su stavljene u uređaj za izvođenje lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), ProFlex PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD) na sljedeći program: 30 min na 50°C; 15 min na 95°C; 40 ciklusa od 1 min na 94°C, 1 min na 56°C i 1 min na 72°C; 10 min na 72°C; ∞ na 4°C. Po završetku RT-PCR reakcije produkti su provjereni na 2 %-tnom agaroznom gelu obojanom etidijevim bromidom. Svrha ovog koraka je provjera kvalitete RNA izolata – osim što se vidi je li RNA dobre kakvoće, vidi se i postoji li kontaminacija RNA izolata molekulama DNA.

Tablica 21. Podatci o početnicama za RT-PCR.

Gen	Sekvencija početnica	NCBI referentna sekvencija
<i>Gapdh</i>	F: 5'-CGGCAAGTTCAACGGCACAGT-3' R: 5'-TTTGGCCCCACCCTTCAGGT-3'	NM_017008.4

4.8. REVERZNA TRANSKRIPCIJA

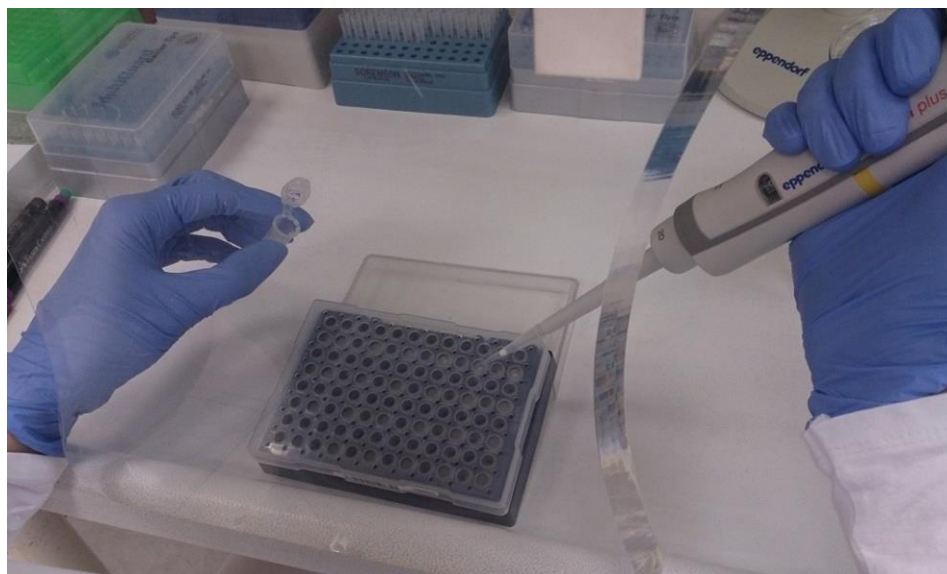
Za reverznu transkripciju je korišten High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, a reakcijska je smjesa bila sastavljena od 1 µg RNA, 2 µl 10 x pufera za RT, 2 µl nasumičnih početnica za RT, 0.8 µl 25x mješavine dNTP, 1 µl MultiScribe reverzne transkriptaze, 1 µl inhibitora RNaza i destilirane vode bez RNAza/DNAza do konačnog volumena od 20 µl. Reakcija je izvedena u stroju ProFlex PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD) prema programu: 10 min na 25°C; 120 min na 37°C; 5 min na 85°C; ∞ na 4°C.

4.9. KVANTITATIVNA LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM

Sintetizirana komplementarna deoksiribonukleinska kiselina, cDNA (engl. *complementary deoxyribonucleic acid*) je iskorištena za analizu kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu pomoću hidrolizirajućih proba TaqMan specifičnih za odabrane gene. Korišten je uređaj Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD) s pripadajućim programom prema uputama proizvođača. Kako bi se smanjila mogućnost greške u usporedbi i analizi uzoraka, korištene su tri endogene kontrole, odnosno kontrolna gena (engl. *housekeeping gene*) koji su služili za normalizaciju rezultata. Endogene kontrole su *Gapdh*, gen koji kodira za gliceraldehid-3-fosfatnu dehidrogenazu, *Actb*, gen koji kodira za β-aktin i *Rn18s*, gen koji kodira za 18S ribosomsku RNA. Analizirana je relativna ekspresija gena u odnosu na ekspresiju endogenih kontrola. Istraživani geni su: *Akt1*, *Braf*, *Egr1*, *Egfr*, *Grb2*, *Hdac7*, *Kras*, *Mapk1*, *Mapk3*, *Mapk14*, *Nos3*, *Pik3cd*, *Plcg1*, *Prkcg*, *Ptk2*, *Pxn*, *Src*, *Srf* i *Vegfa* (Tablica 22). Reakcijska smjesa za jednu reakcijsku jažicu sastojala se od 8 µl destilirane vode bez RNAza/DNAza, 10 µl TaqMan Gene Expression Master Mix (2x), 1 µl TaqMan Gene Expression Assay (20x) i 1 µl cDNA. Reakcije su napravljene u duplikatu (Slika 17).

Tablica 22. Specifikacije korištenih TaqMan hidrolizirajućih proba.

Gen	TaqMan Assay ID	NCBI referentna sekvencija	Duljina fragmenta (bp)
<i>Actb</i>	Rn00667869_m1	NM_031144.3	91
<i>Akt1</i>	Rn00583646_m1	NM_033230.2	87
<i>Braf</i>	Rn01500563_m1	XM_006236357.2	60
<i>Egfr</i>	Rn01434447_m1	NM_031507.1	59
<i>Egr1</i>	Rn00561138_m1	NM_012551.2	64
<i>Gapdh</i>	Rn01775763_g1	NM_017008.4	174
<i>Grb2</i>	Rn01471339_mH	D49847.1	146
<i>Hdac7</i>	Rn01533232_m1	XM_006242364.2	58
<i>Kras</i>	Rn00580460_m1	NM_031515.3	125
<i>Mapk1</i>	Rn00671828_m1	NM_053842.1	102
<i>Mapk3</i>	Rn00820922_g1	NM_017347.2	91
<i>Mapk14</i>	Rn00578842_m1	NM_031020.2	87
<i>Nos3</i>	Rn02132634_s1	NM_021838.2	117
<i>Pik3cd</i>	Rn01516709_m1	NM_001108978.1	63
<i>Plcg1</i>	Rn00566108_m1	NM_013187.1	63
<i>Prkcg</i>	Rn00440861_m1	NM_012628.1	89
<i>Ptk2</i>	Rn01505115_m1	NM_013081.2	81
<i>Pxn</i>	Rn01499294_m1	NM_001012147.1	71
<i>Rn18s</i>	Rn03928990_g1	NR_046237.1	61
<i>Src</i>	Rn00583063_m1	NM_031977.1	75
<i>Srf</i>	Rn01757240_m1	NM_001109302.1	65
<i>Vegfa</i>	Rn01511601_m1	NM_001110333.2	69
ID, identifikacijska oznaka korištenih testova; NCBI, baza podataka (engl. National Center for Biotechnology Information); bp, parova baza, oznaka za duljinu sintetiziranog fragmenta			



Slika 17. Priprema pločice za qRT-PCR.

4.10. ANALIZA PODATAKA DOBIVENIH KVANTITATIVNOM LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZOM

Za određivanje razlike ekspresije istraživanih gena u uzorcima životinja tretiranih s BPC 157 uspoređivanih s uzorcima kontrolnih životinja napravljena je analiza relativne kvantifikacije ekspresije. Korištena je $\Delta\Delta C_t$ metoda koja koristi formulu $2^{-\Delta\Delta C_t}$. C_t (engl. *threshold cycle*), odnosno C_p (engl. *crossing point*) vrijednost označava broj ciklusa koji je potreban da fluorescencija signalnih molekula testa za sekvenciju određenog gena povezana s njenom amplifikacijom dosegne prag detekcije (u našem je slučaju ta vrijednost bila 0.2). C_t vrijednost je obrnuto proporcionalna početnoj količini amplikona u uzorku. Normalizacija ekspresije gena od interesa, odnosno ciljanih gena napravljena je pomoću endogenih kontrola, referentnih gena *Gapdh*, *Actb*, i *Rn18s*:

$$\Delta C_t = C_t(\text{ciljanog gena}) - C_t(\text{referentnog gena})$$

$\Delta\Delta C_t$ označava vrijednost razlike C_t ispitivanog (tretiranog s BPC 157) i kontrolnog uzorka, uzevši u obzir njihove ciljane i referentne gene:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{ispitivanog uzorka}) - \Delta C_t (\text{kontrolnog uzorka})$$

Konačni se rezultat prikazuje kao $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrijednost – faktor promjene ekspresije gena (engl. *fold-change*), broj koji označava koliko puta je promijenjena ekspresija gena ispitivanog uzorka u odnosu na kontrolni uzorak (LIVAK i SCHMITTGEN, 2001.; PFAFFL, 2001.; SCHMITTGEN i LIVAK, 2008.).

4.11. STATISTIČKA ANALIZA

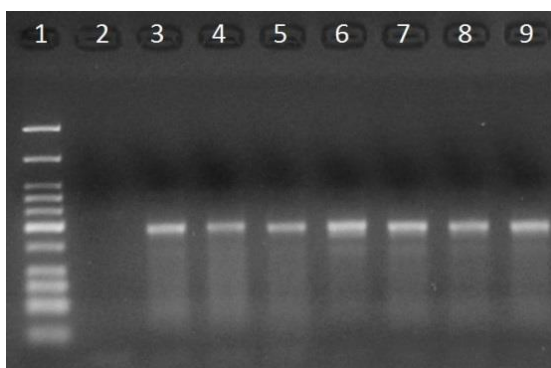
Za statističku obradu dobivenih podataka korišten je program R i RStudio ([RSTUDIOTEAM, 2015.]). Power test analizom učinjenom u programu R ($\alpha = 0.05$, $\pi = 0.80$, $d = 1.2$) se potvrdilo da je 6 životinja po grupi dostatno za otkrivanje statistički značajne razlike. Distribucija uzorka je testirana Shapiro/Wilksovim testom. Pošto se radilo o normalnoj distribuciji, korišten je Student T-test. Podatci su prezentirani grafički kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD). Vrijednost $p < 0,05$ smatrala se statistički značajnom.

5. REZULTATI

5.1. KAKVOĆA RNA IZOLATA

Koncentracije izolirane ukupne RNA iz uzoraka tkiva kože i potkožja varirale su između 48.62 i 360.44 ng/ μ L. U određivanju čistoće izolata provjerene su vrijednosti apsorbancija $A_{260/280}$ (ukazuju na kontaminaciju proteinima, fenolskim i dr. komponentama) i $A_{260/230}$ (pokazatelj su kontaminacije fenolom, gvanidinom, EDTA, solima i sl.). $A_{260/280}$ vrijednosti izolata su se uglavnom kretale u rasponu 1.70-1.90, dok su zabilježene vrijednosti $A_{260/230}$ bile uglavnom između 1.85-2.0.

Prije izvođenja reverzne transkripcije za qRT-PCR, napravljena je RT-PCR analiza u jednom koraku za internu kontrolu – gen *Gapdh* kako bi se provjerila uspješnost izolacije RNA, odnosno kakvoća izoliranih RNA molekula. Osim toga, navedenom metodom vidi se i postoji li kontaminacija RNA izolata molekulama DNA. Očekivani fragmenti dobiveni iz čistog izolata RNA veličine su 193 parova baza (engl. *base pairs*, bp), a ukoliko postoji kontaminacija DNA molekulama, očekivani fragmenti su 369 bp. Duljina odabranih fragmenata za gen *Gapdg* u kontrolnoj RT-PCR analizi je veća od fragmenata koji se analiziraju odabranim TaqMan probama što nam osigurava uspješnost qRT-PCR analize. Rezultati su pokazali da je RNA uspješno izolirana iz svih uzoraka, da je dobre kakvoće te da nema kontaminacije izolata DNA molekulama (Slika 18).



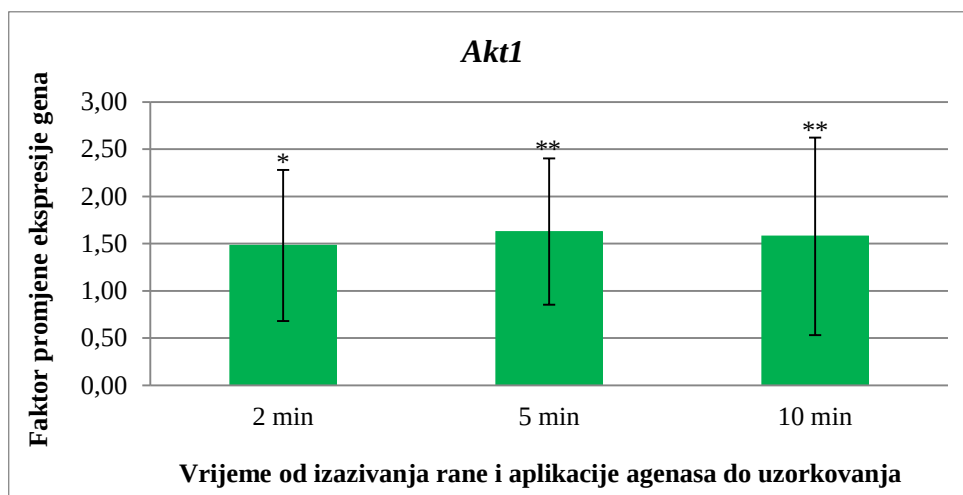
Slika 18. Fotografija gela nakon provjere produkata RT-PCR-a elektroforezom na 2 %-tnom agaroznom gelu obojanom etidij bromidom: 1 – molekularni marker; 2 – negativna kontrola (sterilna ultra čista voda); 3 – pozitivna kontrola; 4-9 – analizirani uzorci.

5.2. EKSPRESIJA ANALIZIRANIH GENA

Analizom relativne kvantifikacije ekspresije istraživanih gena u uzorcima životinja tretiranih s BPC 157 u odnosu na uzorke kontrolnih životinja u određenim vremenskim točkama (dvije, pet, odnosno 10 minuta) pomoću $\Delta\Delta C_t$ metode dobivene su vrijednosti faktora promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Vrijednost faktora promjene gena < 1 znači smanjenu ekspresiju gena, a vrijednost faktora promjene ekspresije gena > 1 znači povećanu ekspresiju gena u uzorcima životinja tretiranih s BPC 157 u odnosu na uzorke kontrolnih životinja.

5.2.1. *Akt1*

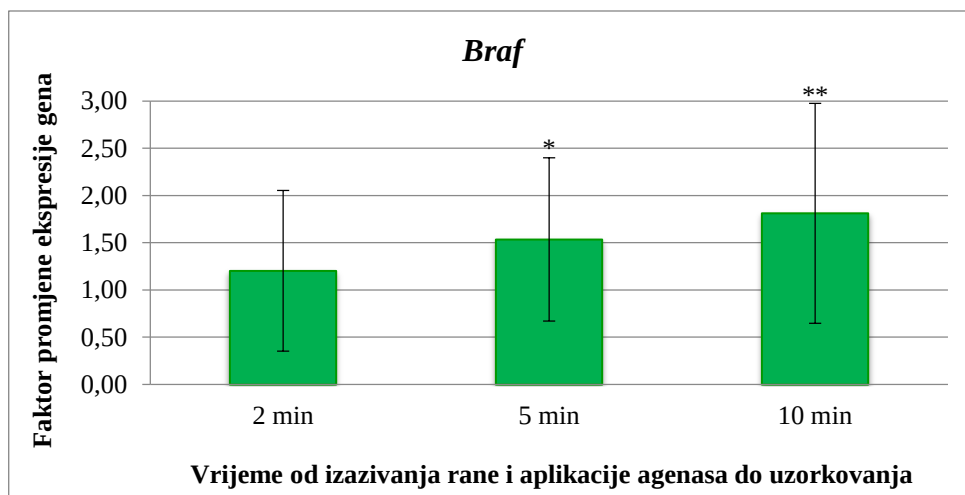
Nakon dvije minute zabilježena je povećana ekspresija gena *Akt1* (vrijednost relativne ekspresije gena je 1.48 ± 0.80), kao i nakon pet (1.63 ± 0.78), odnosno deset (1.58 ± 1.04) minuta. Dobiveni rezultati su statistički značajni (Slika 19).



Slika 19. Usporedba ekspresije gena *Akt1* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.2. *Braf*

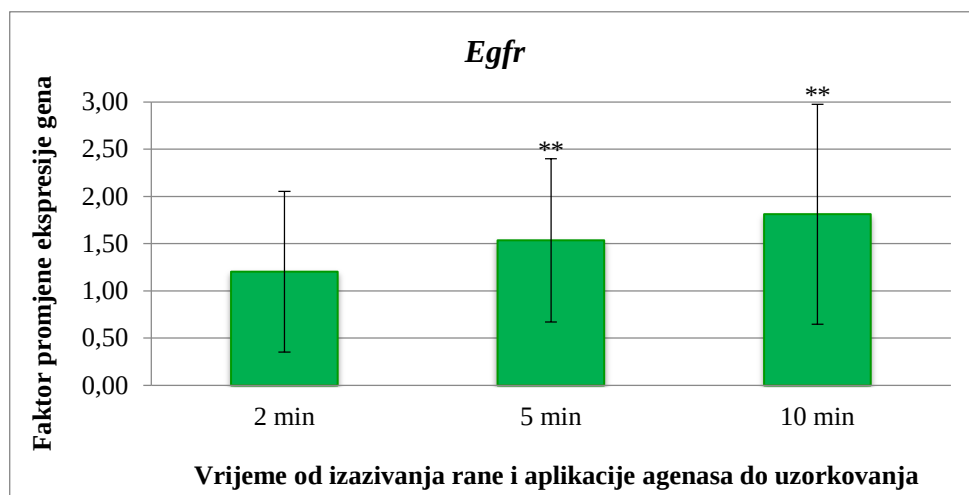
Dvije minute nakon izazivanja rane, odnosno aplikacije BPC 157 nije utvrđena statistički značajna promjena u ekspresiji gena *Braf* (0.98 ± 0.85), ali nakon pet (1.35 ± 0.87) i deset (1.94 ± 1.16) minuta zabilježen je statistički značajan porast ekspresije gena (Slika 20).



Slika 20. Usporedba ekspresije gena *Braf* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.3. *Egfr*

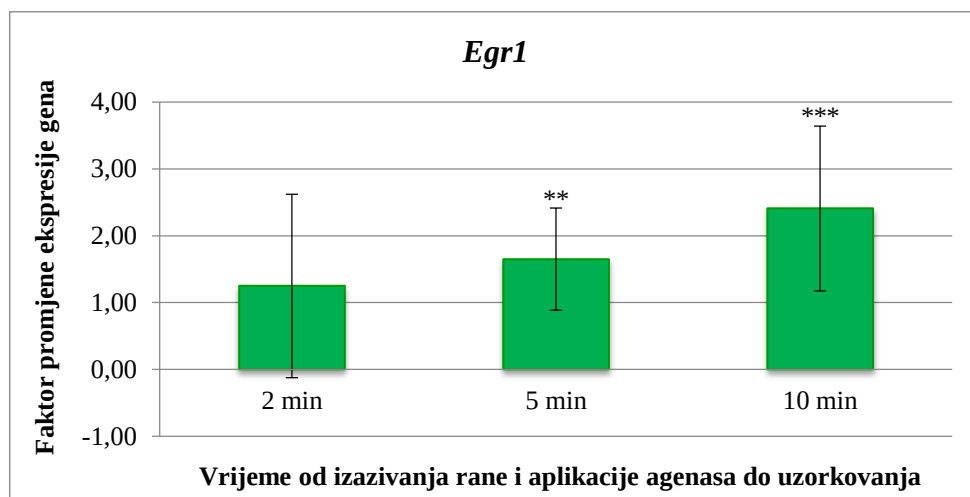
Analiza ekspresije gena *Egfr* pokazala je da nakon dvije minute nije utvrđena statistički značajna promjena u ekspresiji (1.20 ± 1.23). Međutim, nakon pet (1.54 ± 0.84) i deset (1.81 ± 1.06) minuta uočena je povećana ekspresija gena (Slika 21).



Slika 21. Usporedba ekspresije gena *Egfr* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.4. *Egr1*

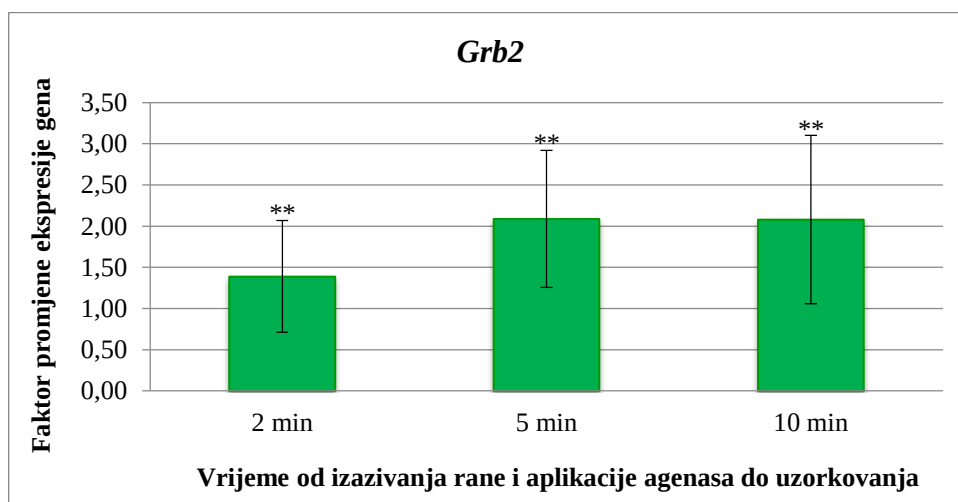
U vremenu od dvije minute nije zapažena značajna promjena ekspresije gena *Egr1* (1.25 ± 1.37), ali nakon pet minuta (1.65 ± 0.76) zabilježeno je povećanje u ekspresiji gena koje se osobito vidi nakon deset minuta (2.41 ± 1.23) (Slika 22).



Slika 22. Usporedba ekspresije gena *Egr1* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.5. *Grb2*

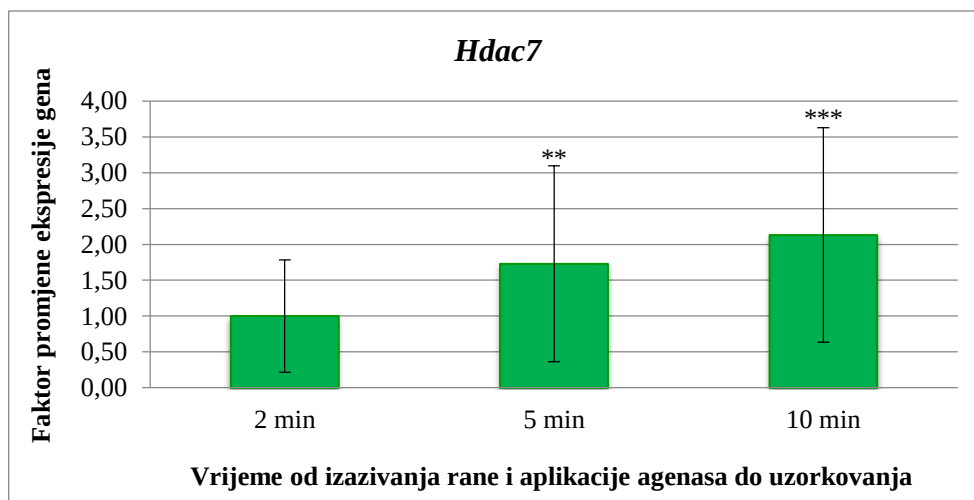
Nakon dvije minute zabilježeno je statistički značajno povećanje ekspresije gena *Grb2* (1.39 ± 0.68), kao i nakon pet (2.09 ± 0.83) te deset (2.08 ± 1.02) minuta (Slika 23).



Slika 23. Usporedba ekspresije gena *Grb2* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.6. *Hdac7*

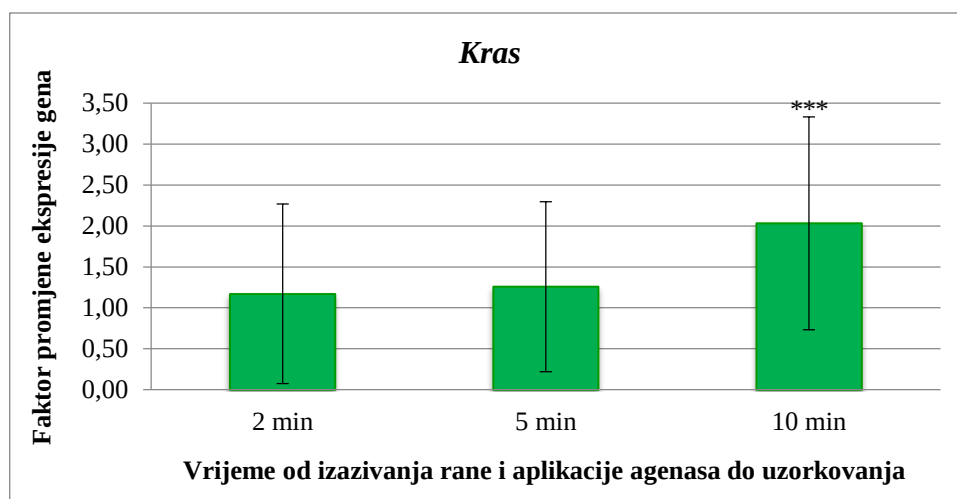
Analiza ekspresije gena *Hdac7* pokazala je da nakon dvije minute nije utvrđena statistički značajna promjena u ekspresiji (1.0 ± 0.79). Međutim, nakon pet minuta (1.73 ± 1.37), a pogotovo nakon deset minuta (2.13 ± 1.50) uočena je statistički značajna povećana ekspresija gena (Slika 24).



Slika 24. Usporedba ekspresije gena *Hdac7* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.7. *Kras*

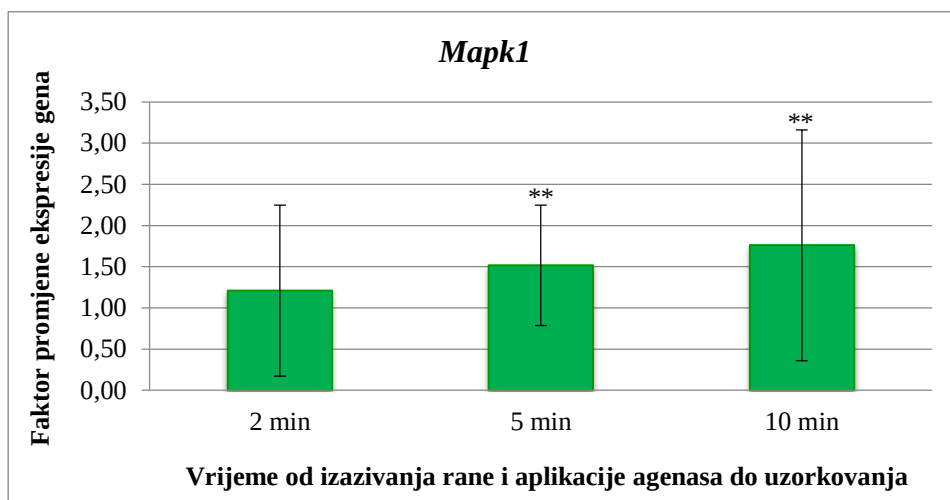
Nakon dvije, odnosno pet minuta nije utvrđena statistički značajna promjena u ekspresiji gena *Kras* (1.17 ± 1.10 , odnosno 1.26 ± 1.04), ali u vremenskoj točki od deset minuta (2.03 ± 1.30) minuta zabilježen je statistički značajan porast ekspresije gena (Slika 25).



Slika 25. Usporedba ekspresije gena *Kras* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost ± SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.8. *Mapk1*

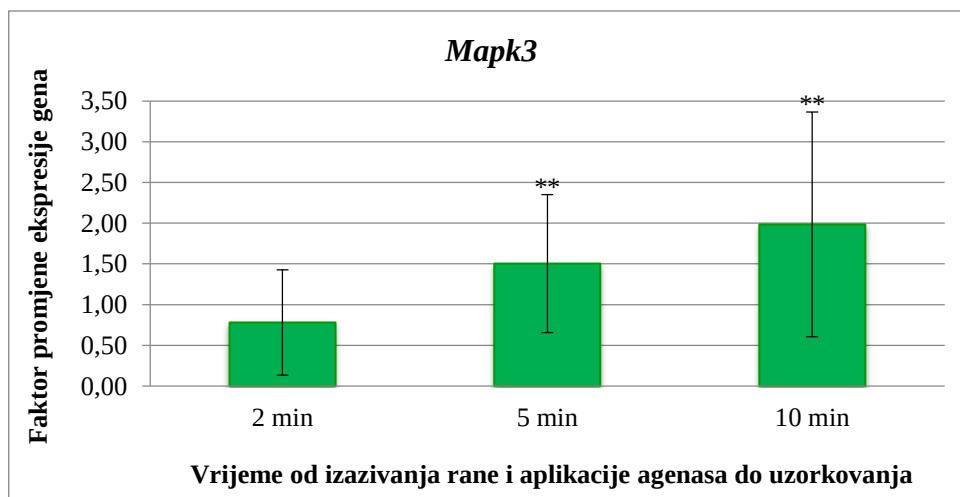
U vremenu od dvije minute nije zapažena značajna promjena ekspresije gena *Mapk1* (1.21 ± 1.04), ali nakon pet minuta (1.52 ± 0.73) zabilježeno je povećanje u ekspresiji gena koje se vidi i nakon deset minuta (1.76 ± 1.40) (Slika 26).



Slika 26. Usporedba ekspresije gena *Mapk1* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.9. *Mapk3*

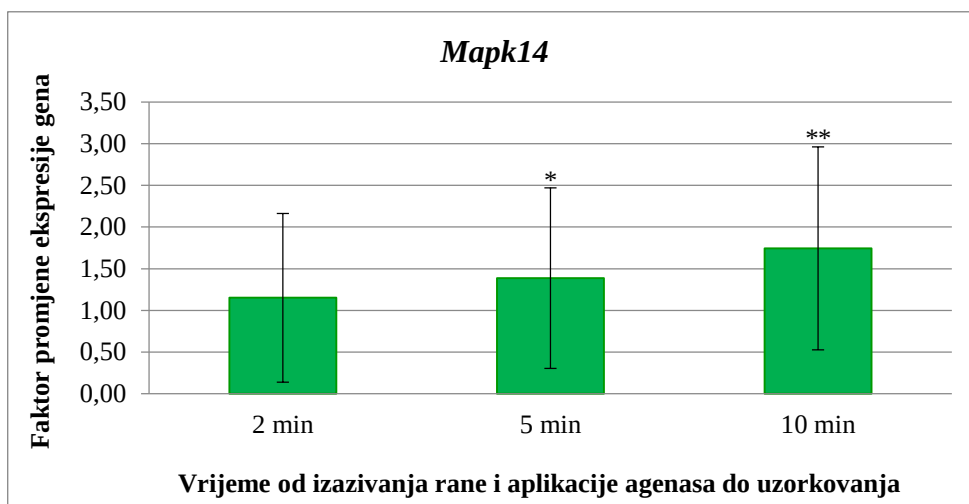
Analizom ekspresije gena *Mapk3* uočeno je da nakon dvije minute nema statistički značajne promjene u njegovoj ekspresiji (0.78 ± 0.65). Međutim, nakon pet minuta (1.50 ± 0.85) te pogotovo nakon deset minuta (1.99 ± 1.38) zabilježeno je značajno povećanje ekspresije (Slika 27).



Slika 27. Usporedba ekspresije gena *Mapk3* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.10. *Mapk14*

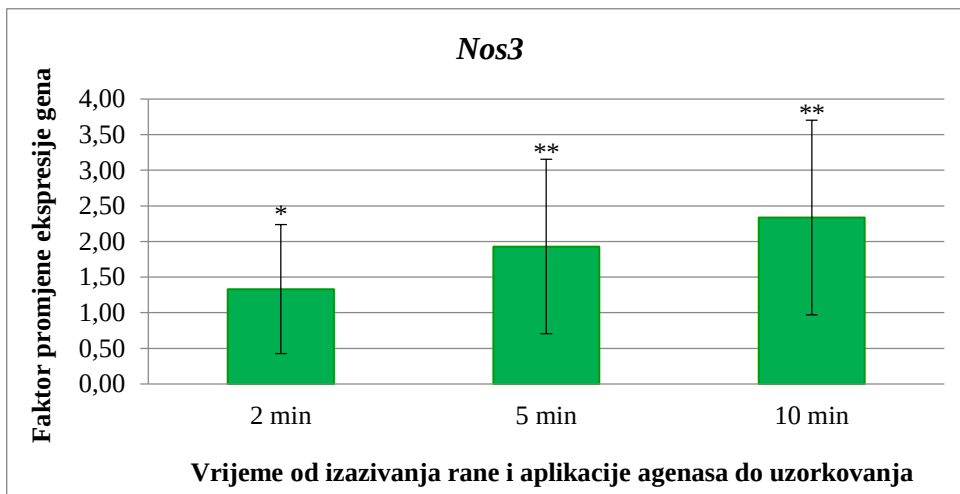
Nakon dvije minute nije zabilježeno statistički značajno povećanje ekspresije gena *Mapk14* (1.15 ± 1.01), ali nakon pet (1.39 ± 1.08) i deset (1.74 ± 1.22) minuta vidi se povećana ekspresija (Slika 28).



Slika 28. Usporedba ekspresije gena *Mapk14* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.11. *Nos3*

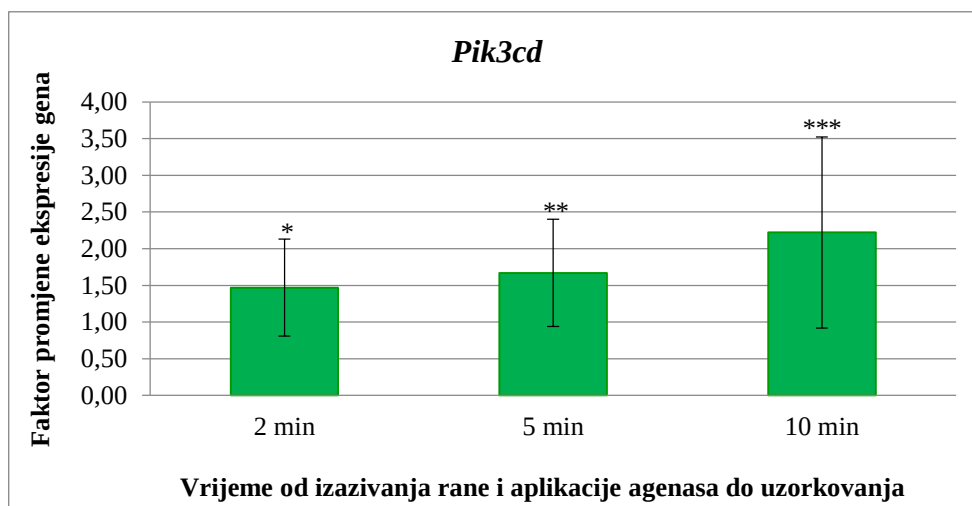
U vremenu od dvije minute vidi se statistički značajan blagi porast ekspresije gena *Nos3* (1.33 ± 0.91), a nakon pet (1.93 ± 1.22) i deset (2.34 ± 1.37) minuta zabilježeno je osjetnije povećanje njegove ekspresije (Slika 29).



Slika 29. Usporedba ekspresije gena *Nos3* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.12. *Pik3cd*

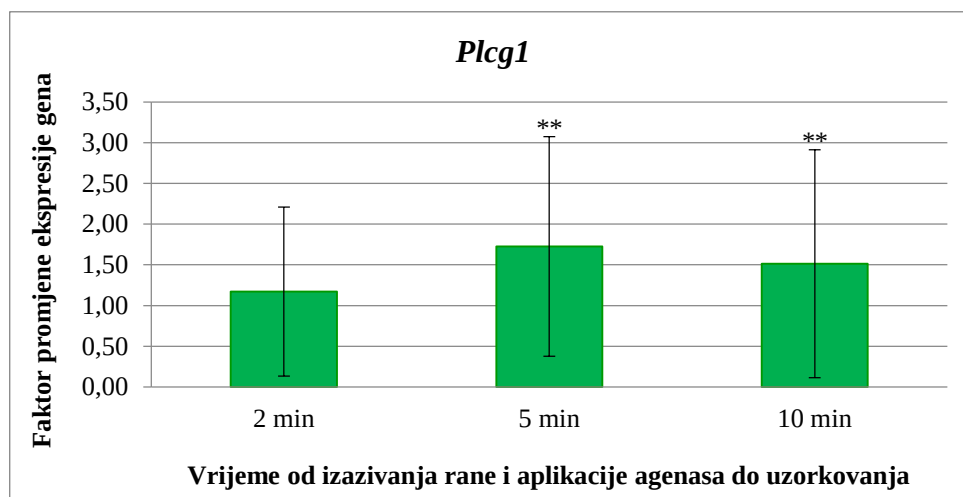
Analiza ekspresije gena *Pik3cd* pokazala je da se nakon dvije (1.47 ± 0.66), pet (1.67 ± 0.73) i deset (2.22 ± 1.30) uočava statistički značajna promjena u ekspresiji (Slika 30).



Slika 30. Usporedba ekspresije gena *Pik3cd* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.13. *Plcg1*

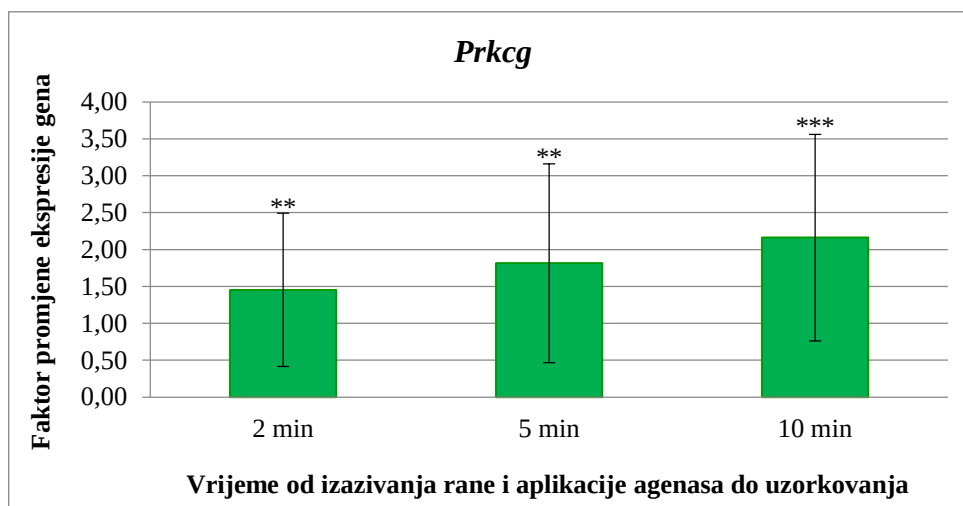
Ekspresija gena *Plcg1* nije se značajno promijenila u vremenskoj točki od dvije minute (1.17 ± 1.04). Međutim, nakon pet (1.73 ± 1.35) i deset (1.51 ± 1.40) minuta uočeno je statistički značajno povećanje ekspresije gena (Slika 31).



Slika 31. Usporedba ekspresije gena *Plcg1* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.14. *Prkcg*

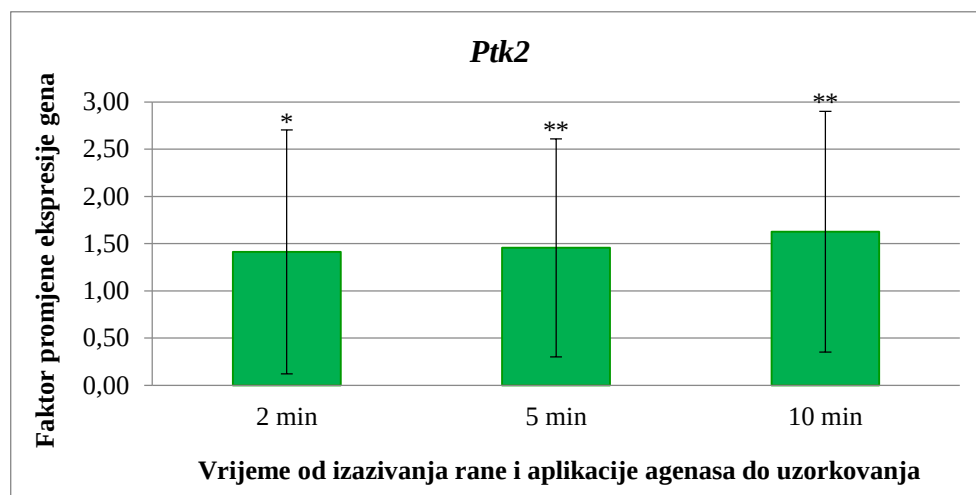
U vremenskoj točki od dvije minute vidi se statistički značajan porast ekspresije gena *Prkcg* (1.45 ± 1.03), a nakon pet (1.81 ± 0.89) i deset (2.16 ± 1.09) zabilježeno je još primjetnije povećanje njegove ekspresije (Slika 32).



Slika 32. Usporedba ekspresije gena *Prkcg* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.15. *Ptk2*

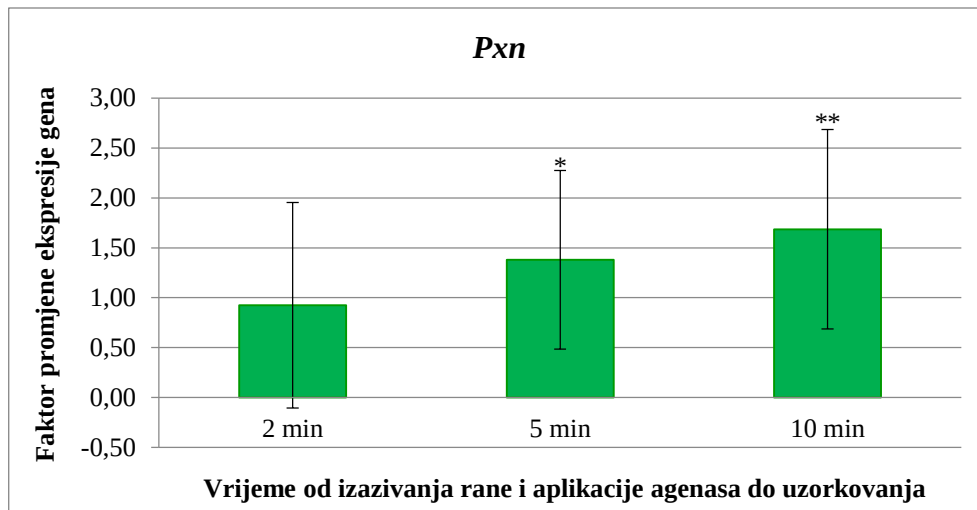
U vremenu od dvije minute vidi se statistički značajan blagi porast ekspresije gena *Ptk2* (1.41 ± 1.29), koji je zabilježen i nakon pet (1.46 ± 1.15) i deset (1.63 ± 1.27) minuta (Slika 33).



Slika 33. Usporedba ekspresije gena *Ptk2* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.16. *Pxn*

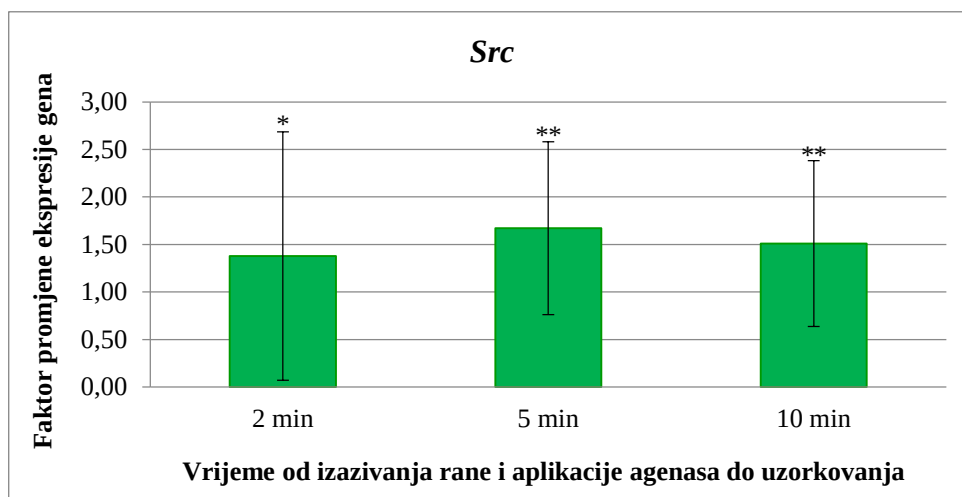
Analizom ekspresije gena *Pxn* uočeno je da nakon dvije minute nema statistički značajne promjene u njegovoj ekspresiji (0.93 ± 1.03). Međutim, nakon pet minuta (1.38 ± 0.89) vidi se da dolazi do njegove povećane ekspresije, kao i nakon deset minuta (1.69 ± 1.00) (Slika 34).



Slika 34. Usporedba ekspresije gena *Pxn* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.17. *Src*

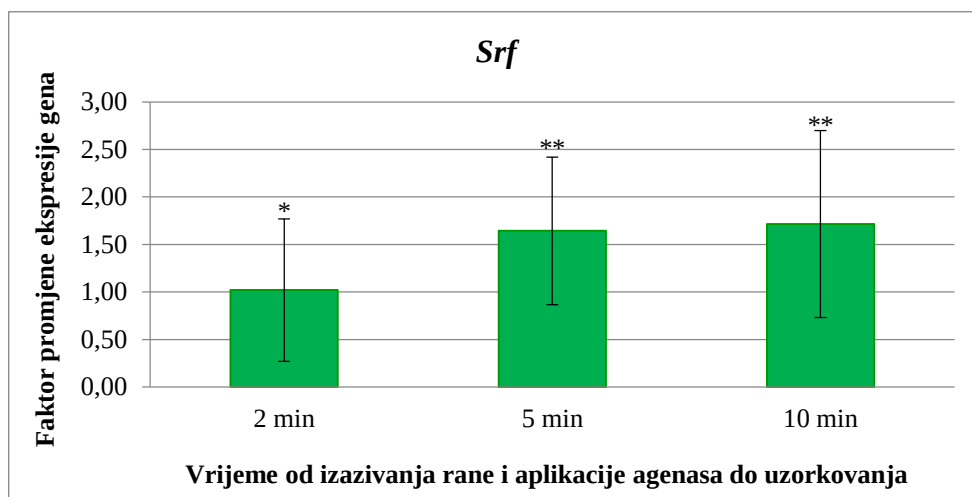
U vremenu od dvije minute vidi se statistički značajan blagi porast ekspresije gena *Src* (1.38 ± 1.31), koji je uočen i nakon pet (1.67 ± 0.91) i deset (1.51 ± 0.87) minuta (Slika 35).



Slika 35. Usporedba ekspresije gena *Src* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.18. *Srf*

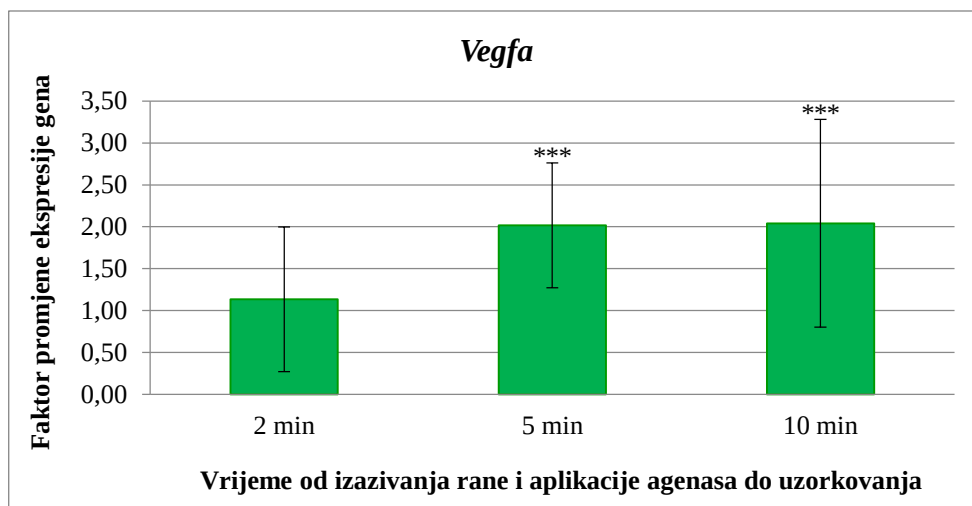
Nakon dvije minute nije utvrđena statistički značajna promjena u ekspresiji gena *Srf* (1.02 ± 0.75), ali analiza uzoraka vremenskih točki od pet (1.64 ± 0.78) i deset (1.72 ± 0.98) minuta zabilježena je povećana ekspresija gena (Slika 36).



Slika 36. Usporedba ekspresije gena *Srf* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

5.2.19. *Vegfa*

Analiza ekspresije gena *Vegfa* pokazala je da nakon dvije minute nije utvrđena statistički značajna promjena u ekspresiji (1.14 ± 0.86). Međutim, nakon pet (2.02 ± 0.74) i deset (2.04 ± 1.24) minuta uočena je statistički značajna povećana ekspresija gena (Slika 37).



Slika 37. Usporedba ekspresije gena *Vegfa* u uzorcima životinja tretiranih fiziološkom otopinom i onih tretiranih s BPC 157, uzorkovanih u različitim vremenskim točkama (nakon dvije, pet, odnosno 10 minuta) i analiziranih qRT-PCR metodom. Dobiveni podatci su izraženi kao faktor promjene ekspresije gena (srednja vrijednost $\pm$ SD). Oznake statističke značajnosti: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

6. RASPRAVA

Učinak BPC 157 na pojačanu ekspresiju svih navedenih gena vidi se tijekom analiziranog razdoblja od 10 minuta. Zanimljive su vremenske točke kada se taj utjecaj vidi za pojedini gen. Pojačana ekspresija gena *Akt1*, *Grb2*, *Nos3*, *Pik3cd*, *Prkcg*, *Ptk2* i *Src* javlja se već nakon dvije minute, a vidi se i kroz pet i deset minuta. Za gene *Braf*, *Egfr*, *Egr1*, *Hdac7*, *Mapk1*, *Mapk3*, *Mapk14*, *Plcg1*, *Prkcg*, *Ptk2*, *Pxn*, *Src*, *Srf* i *Vegfa* pojačana ekspresija je uočena nakon 5, a također se vidi i kroz 10 minuta, dok je povećana ekspresija gena *Kras* uočena nakon 10 min.

Navedeni rezultati potvrđuju veći dio podataka dobivenih prethodnim istraživanjima. Aktivacija ekspresije gena *Akt1*, *Nos3*, *Pik3cd* i *Vegfa* ide u prilog podatku da BPC 157 aktivira PI3K-AKT-eNOS-VEGF signalni put (HSIEH i sur., 2017.). Navedeni signalni put je, između ostalog, ključan i za proliferaciju, migraciju i adheziju stanica te angiogenezu. VEGFA je angiogeni faktor koji se može vezati na VEGFR2 koji je glavni posrednik staničnih odgovora na VEGF. Aktivacija VEGFR2 može dovesti do aktiviranja PI3K-AKT signalizacije, zahvaljujući kojoj se aktivira eNOS/NOS3 što rezultira povećanom produkcijom NO. On igra važnu ulogu u regulaciji upale: u normalnim fiziološkim uvjetima ima protuupalni učinak, dok se kod patoloških stanja ponaša kao proupalni faktor (SHARMA i sur., 2007.; FÖRSTERMANN i SESSA, 2012.). U dosadašnjim istraživanjima učinka BPC 157 na ekspresiju *Nos3* pokazan je aktivirajući učinak (VUKOJEVIĆ i sur., 2018.; VUKOJEVIĆ i sur., 2020.) dok je u drugoj studiji pokazano da smanjuje ekspresiju *Nos3* (CESAREC i sur., 2013.). Razlog navedenim kontradiktornim podacima može se naći u studijama koje opisuju utjecaj BPC 157 na NO-sustav gdje on interferira s učincima agonista (L-arginina, supstratne molekule za NO) i antagonista NO-sustava (L-NAME, inhibitora NOS) (GRABAREVIC i sur., 1997.) (DRMIC i sur., 2018.). Iz navedenih se studija može zaključiti da BPC 157 na neki način regulira količinu NO ovisno o situaciji u sustavu. Osim toga, uzorkovanja i analize su napravljene u različitim vremenskim periodima: nakon sat vremena od izazivanja rane i nakon 24 sata (povećana ekspresija *Nos3*) (VUKOJEVIĆ i sur., 2018.; VUKOJEVIĆ i sur., 2020.), u vrijeme kada započinje upalna faza, odnosno nakon četiri dana (smanjena ekspresija *Nos3*) (CESAREC i sur., 2013.) kada bi upalna faza trebala ući u silaznu putanju.

Spomenute studije VUKOJEVIĆA i suradnika ispitivale su i učinak BPC 157 na ekspresiju dodatnih gena. U *in vivo* studiji iz 2018. god. ispitivan je učinak BPC 157 na ligaciju donje šuplje vene s desnom ovarijskom venom kod štakora što predstavlja rekapitulaciju Virchowove trijade: ligacija dovodi do ozljede žila, smanjenja protoka krvi i tromboze. Zaključeno je da je BPC 157 smanjio ili suzbio navedene događaje. U navedenoj su studiji metodom qRT-PCR ispitivane promjene u ekspresiji gena značajnih za staničnu migraciju, proliferaciju i preživljenje te za formiranje reaktivnih oblika kisika – događaja važnih za prevladavanje inducirane ozljede. Ispitivanja su rađena na uzorcima uzetima 1 sat i 24 sata nakon ozljede i zaključeno je da BPC 157 ima utjecaja na ekspresiju gena *Egr*, *Nos3*, *Srf*, *Plcy*, *Vegfr2* i *Kras*. Pojačava ekspresiju gena *Egr* (1 sat) i gena *Nos3*, *Srf*, *Kras* (1 sat i 24 sata) i smanjuje ekspresiju gena *Egr* (24 sata), *Vegfr2* (1 sat i 24 sata) i *Plcy*, (24 sata) dok je ekspresija gena *Akt1* ostala nepromijenjena. (VUKOJEVIĆ i sur., 2018.). Studija iz 2020. bavila se njegovim učinkom na ishemijsko/reperfuzijske ozljede u mozgu štakora gdje je spriječila rana i odgođena neuralna oštećenja hipokampusu, dok je qRT-PCR analiza 1 sat i 24 sata nakon ozljede pokazala povećanu ekspresiju gena *Egr1*, *Akt1*, *Kras*, *Src*, *Foxo*, *Srf*, *Vegfr2*, *Nos3* i *Nos1*, smanjenu ekspresiju gena *Nos2* i *Nfkb*, dok učinak na ekspresiju gena *Mapk1* nije zabilježen (VUKOJEVIĆ i sur., 2020.). Promjene u ekspresiji navedenih gena upućuju na potencijalne signalne putove koji mogu biti uključeni u postizanje ravnoteže zahvaljujući BPC 157.

Analizom utjecaja BPC 157 na ekspresiju VEGFA u dosadašnjim je studijama dokazano njegovo djelovanje. U istraživanju na modelu kožne rane kod štakora u različitim vremenskim točkama nakon izazivanja ozljede (4, 6, 12, 24, 48, 72, 120 i 168 sati) kod tretiranih je životinja zabilježeno sinusoidno kretanje količine mRNA s pozitivnim (6, 72 i 168 sati) i negativnim (48 i 120 sati) amplitudama koje su se izmjenjivale u različitim vremenskim točkama u odnosu na kontrole čije vrijednosti prate poznatu dinamiku cijeljenja (maksimalna ekspresija zabilježena je šest, odnosno 48 sati nakon ozljede) (BATELJA VULETIĆ, 2007.). U ovom je istraživanju također dokazan učinak BPC 157 na ekspresiju gena *Vegfa* te je zabilježena povećana ekspresija nakon 5 i 10 minuta.

Opsežno istraživanje učinka BPC 157 na angiogenezu na više različitih modela potvrdilo je njegov proangiogeni učinak kod ishemične ozljede mišića zahvaljujući poboljšanju protoka krvi. Isto je potvrđeno istraživanjem njegova *in vivo* učinka na razvoj korioalantoijske membrane kod pilića, gdje je povećao broj krvnih žila, ali i *in vitro*

istraživanjem na HUVEC (engl. *human umbilical vascular endothelial cell*) staničnim kulturama gdje je uočen veći broj žilnih pregrada boljeg oblika. Na HUVEC stanicama je napravljeno i istraživanje učinka BPC 157 na ekspresiju mRNA i proteina. Analizirana je ekspresija mRNA VEGFA RT-PCR metodom, a ekspresija odgovarajućeg proteina ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) metodom u vremenskim razdobljima od 3, 6, 12 i 24 sata nakon tretmana. Nije zabilježena promjena u ekspresiji VEGFA, ni na razini mRNA, ni na razini proteina. Međutim, napravljena je i RT-PCR analiza ekspresije mRNA za VEGFR2 te analiza ekspresije proteina westernskom metodom otiska, a dobiveni rezultati su ukazali na zabilježeno povećanje ekspresije na obje razine nakon šest sati s vrhuncem ekspresije nakon 12 sati za mRNA (analizirane vremenske točke: 3, 6, 12 i 24 sata), odnosno 9 sati za proteine (analizirane vremenske točke: 3, 6, 9, 12 i 24 sata). Isto istraživanje je pokazalo, korištenjem imunofluorescencijske tehnike, da BPC 157, baš kao i VEGF, potiče internalizaciju VEGFR2 na HUVEC stanicama. Pošto nakon internalizacije VEGFR2 slijedi aktivacija Akt i eNOS, odnosno pokretanje VEGFR2-Akt-eNOS signalnog puta koji je jako važan za cijeljenje i angiogenezu, napravljena je analiza ekspresije proteina VEGFR2, Akt i eNOS te njihovih fosforiliranih (aktiviranih) oblika westernskom metodom otiska u vremenskim točkama od 10, 15 i 30 minuta. Rezultati su pokazali da BPC 157 uzrokuje fosforilaciju VEGFR2 jako brzo, već u prvoj analiziranoj vremenskoj točki od 10 minuta i detektiranim vrhuncem u vremenu od 15 minuta. Isto tako, fosforilacija Akt je zabilježena već nakon 10 minuta s vrhuncem u razdoblju od 30 minuta, dok je fosforilacija eNOS zabilježena nakon 15 minuta, također s vrhuncem u vremenu od 30 minuta (HSIEH i sur., 2017.). Iz navedenih podataka može se zaključiti da BPC 157 ima iznimno brzo djelovanje ne samo na ekspresiju gena *Akt1* i *Nos3*, koja se očitava kao povećana količina mRNA već nakon dvije minute od izazivanja ozljede, već i na pojačanu fosforilaciju proteinskih produkata što je vidljivo već nakon 10 minuta.

Aktivacija VEGFR2 signalizacije potiče i *Plcg1* koja je odgovorna za aktivaciju *Prkcg*, čije nizvodne mete signalizacije su članovi MAPK signalnog puta (RAF, RAS, MEK, ERK2-1/MAPK1-3) (PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.). Taj signalni put, između ostalog, može stimulirati angiogenezu na način da utječe na ekspresiju gena uključenih u razvoj novih krvnih žila, uključen je u cijeljenje, staničnu migraciju i u regulaciju staničnog ciklusa. Iz podataka ove studije vidljivo je da BPC 157 ima aktivirajući učinak na ekspresiju gena *Prkcg* već nakon dvije minute, dok je povećana ekspresija *Plcg1* zabilježena nakon pet minuta. U prethodnoj je studiji zapažen inhibirajući učinak BPC 157

na ekspresiju gena *Plcg1* nakon 1 sat, odnosno 24 sata (VUKOJEVIĆ i sur., 2018.). Aktivacija MAPK navedenog signalnog puta očituje se u povećanoj ekspresiji *Braf*, *Mapk1* i *Mapk3* koja se vidi u petoj minuti, a za *Kras* se jednaki efekt vidi nakon 10 minuta. Zabilježeni učinak BPC 157 na povećanje ekspresije gena *Kras* u korelaciji je s prethodnim *in vivo* studijama gdje je jednaki efekt zabilježen nakon jednog sata i nakon 4 sata (VUKOJEVIĆ i sur., 2020.).

Osim kod VEGFR2, aktivacija EGFR signalizacije također uključuje komponente MAPK signalnog puta, odnosno PI3K-AKT signalnog puta. Analiza ekspresije *Egfr* pokazala je učinak BPC 157 na povećanje njegove ekspresije zabilježene nakon pet minuta. Vezanjem liganda na EGFR aktivira se tirozinska kinaza citoplazmatske domene receptora na što se može vezati GRB2 protein što posljedično može dovesti do aktivacije MAPK signalne kaskade. Osim nje, može aktivirati i PI3K-AKT, PLC γ -PKC i dr. signalne putove (WIDMANN i sur. 1999.). Iz toga je razloga proučavan gen *Grb2* i dokazana je njegova povećana ekspresija zahvaljujući djelovanju BPC 157 i to već u drugoj minuti.

Signalni put MAPK p38 (Mapk14) također je jako važan u procesu cijeljenja, posebno u upalnoj fazi (kontrolira otpuštanje citokina), ali i kod regulacije angiogeneze i stanične pokretljivosti zahvaljujući regulaciji MMP (CUENDA i ROUSSEAU, 2007.). Analizom ekspresije gena mitogenom aktiviranih proteinskih kinaza istraživanih u ovoj studiji (Mapk1, Mapk3 i Mapk14) uočena je njihova povećana ekspresija detektirana nakon pet minuta. Analiza ekspresije *Mapk1* u prethodnoj *in vivo* studiji nije pokazala značajnije promjene u ekspresiji analiziranoj jedan sat, odnosno 24 sata nakon izazivanja ozljede (VUKOJEVIĆ i sur., 2020.) što se može pripisati različitim vremenskim točkama i/ili različitom modelu ozljede.

U prethodnoj *in vitro* studiji je proučavan učinak BPC 157 na rast i proliferaciju stanica fibroblasta tetiva. Dokazana je povećana brzina migracije stanica fibroblasta tetiva ovisna o dozi BPC 157. Navedeni učinak se povezao s aktivacijom PTK2(FAK)-SRC-PXN signalnog puta koji ima važnu ulogu u moduliranju stanične adhezije i migracije. Navedeno je dokazano upotrebom westernske metode otiska kojom je utvrđeno da primjena BPC 157 nije imala učinak na povećanu količinu Fak/Ptk2 proteina i paksilina, ali je pospješila njihovu fosforilaciju (CHANG i sur., 2011.). Do istih su zaključaka, ali za Src protein došli i HSIEH i suradnici u *in vitro* studiji gdje su proučavali utjecaj BPC 157 na krvne žile, odnosno vaskularne endotelne stanice i SRC-CAV1-eNOS signalizaciju.

Osim njegovog dokazanog utjecaja na indukciju vazorelaksacije aktivacijom eNOS/NO signalizacije i na poticanje migracije vaskularnih endotelnih stanica, BPC 157 je aktivirao SRC-CAV1-eNOS signalni put. HUVEC stanice su tretirane s 1.0 µg/ml BPC 157 pa je nakon 30 i 60 minuta westernskom metodom otiska analizirana ekspresija proteina SRC, CAV1, eNOS i njihovih fosforiliranih oblika. BPC 157 je izazvao povećanje fosforiliranog SRC proteina nakon 30 minuta i osobito nakon 60 minuta dok je količina ukupnog proteina SRC ostala nepromijenjena. Slično se dogodilo s pCAV1 proteinom, ali je količina ukupnog proteina CAV1 bila smanjena. Veća količina fosforiliranog oblika eNOS proteina je također zabilježena s vrhuncem nakon 30 minuta od tretiranja s BPC 157, dok je ukupna količina eNOS proteina bila približno jednaka. Primjena Src inhibitora (SKI-1) značajno je smanjila utjecaj BPC 157 na fosforilaciju SRC, CAV1 i eNOS. Kako je već navedeno, BPC 157 potiče nastanak NO i fosforilaciju eNOS. Kako je aktivnost eNOS regulirana vezanjem s CAV1 (povećana aktivnost eNOS je povezana sa smanjenim vezanjem na CAV1), ispitan je utjecaj BPC 157 na CAV1-eNOS spoj: smanjuje vezanje za 50 % i na taj način pojačava aktivaciju eNOS (HSIEH i sur., 2020.). Navedeno je istraživanje potvrdilo važnu ulogu SRC proteina koji surađuje s brojnim receptorima tirozinskih kinaza i može aktivirati brojne signalne putove pa je, osim u spomenutoj SRC-CAV1-eNOS signalizaciji, važan i za PI3K/AKT, STAT3 te FAK(PTK2)-PXN signalne putove (HAURA, 2006.). U ovoj je studiji analizirana ekspresija gena *Ptk2*, *Src* i *Pxn*, a dobiveni podatci su pokazali da je primjena BPC 157 povećala ekspresiju gena *Ptk2* i *Src* već nakon dvije minute dok je jednaki učinak na *Pxn* zabilježen nakon pet minuta.

Značajnu ulogu tijekom angiogeneze igraju stanični citoskeletni proteini obzirom da su oni odgovorni za stanični oblik, staničnu adheziju i staničnu pokretljivost. Jedan od glavnih regulatora ekspresije proteina citoskeleta je SRF. SRF je faktor transkripcije koji regulira veći broj gena koji su uključeni u stanični rast, migraciju i organizaciju citoskeleta i ima ključnu ulogu tijekom angiogeneze (FRANCO i LI, 2009.). SRF je važan za aktivaciju nekih gena važnih za endotelnu proliferaciju, kao što su *FOS* i *EGR1* pa u slučaju SRF deficijencije, Vegf-om potaknuta signalizacija neće moći aktivirati ekspresiju *FOS* i *EGR1*. Za VEGF aktivaciju SRF uključuju se i MEK-ERK i RHO signalni putovi (CHAI i sur., 2004.). Analiza utjecaja BPC 157 na ekspresiju *Srf* u ovom je istraživanju pokazala povećanje zabilježeno od pete minute, a jednaki, pospješujući učinci na ekspresiju gena *Srf* su dokazani i u prethodnim studijama gdje su proučavani vremenski

periodi od jednog i 24 sata, a navedeni je učinak zabilježen u obje vremenske točke (VUKOJEVIĆ i sur., 2018.; VUKOJEVIĆ i sur., 2020.).

Aktivacija signalnih putova proteinske kinaze C uključuje indukciju transkripcijskih faktora, NFAT, odnosno EGR1 i aktivaciju angiogenog odgovora. EGR1 inducira citokine i proizvodnju faktora rasta te ranu formaciju kolagena, odnosno ekstracelularnog matriksa te je, kao i SRF, jako važna komponenta procesa cijeljenja i angiogeneze. *In vitro* studija na Caco-2 stanicama (stanična linija nastala od primarnog kolorektalnog karcinoma; engl. *colorectal adenocarcinoma cells*) pokazala je da BPC 157 pojačava ekspresiju *EGR1*. Analiza je napravljena RT-PCR metodom gdje su istraživani vremenski periodi od 0, 15, 30, 45, 60, 90 i 120 minuta, a uočena je značajna razlika već nakon 15 minuta, što je bio i vrhunac. Za analizu proteina korištena je metoda westernskog otiska gdje su stanice tretirane s BPC 157 u vremenskim periodima od 0, 0.5, 1, 2 i 24 sata. Dokazana je stimulacija ekspresije *Egr1* nakon jednog sata (jači signal) te nakon dva sata (nešto slabiji signal) (TKALČEVIĆ i sur., 2007.). Navedeni su podatci u korelaciji s rezultatima dobivenima ovom studijom gdje je dokazana povećana ekspresija gena *Egr1* već nakon 5 minuta. Prethodne studije gdje je analiziran utjecaj BPC 157 na ekspresiju *Egr1* se većim dijelom podudaraju s ovim podacima jer je dokazana povećana ekspresija *Egr1* nakon jednog sata (VUKOJEVIĆ i sur., 2018.; VUKOJEVIĆ i sur., 2020.), odnosno 24 sata (VUKOJEVIĆ i sur., 2020.).

Opsežna studija iz 2018. godine Kanga i suradnika na *in vivo* modelu tumorske kaheksije u kojoj se pokazalo da je BPC 157 onemogućio kaheksiju ublažavajući atrofiju mišića, upalu i katabolizam također je analizirala molekularne mehanizme i, između ostalih molekula, neke transkripcijske faktore. Studija je napravljena na miševima kojima su uzeti uzorci mišića i na kojima se RT-PCR metodom analizirala ekspresija mRNA gena Atrogin-1 i MuRF-1, mišićnih ubikvitinskih ligaza čija je pojačana ekspresija zabilježena kod životinja s kaheksijom, dok je kod onih životinja koje su tretirane s BPC 157 zabilježena povećana ekspresija za Atrogin-1, ali ne i za MuRF-1. Kako se u kaheksiji događa poremećaj mitohondrijske biogeneze i funkcije, istraživana je i ekspresija mRNA gena značajnih za te procese: *Mfn-2* (mitofuzin uključen u mitohondrijsku dinamiku), *Pgc-1α* (transkripcijski koaktivator, glavni regulator mitohondrijske biogeneze) i *Pax-7* (transkripcijski faktor specifičan za mišiće). Smanjena ekspresija svih navedenih gena je zabilježena kod životinja s kaheksijom dok je kod životinja s kaheksijom tretiranih s BPC 157 razina ekspresije ostala očuvana. BPC 157 je ispravio i upalne i metaboličke promjene

izazvane tumorom što se vidi RT-PCR analizom mRNA citokina *Tnf- α* i *Il-6*. Njihova je ekspresija značajno pojačana u skupini s kaheksijom bez tretmana što nije slučaj za one tretirane s BPC 157. Metodom westernskog otiska analizirani su fosforilirani oblici Foxo, Akt, mTOR i GSK-3 β (transkripcijski faktor i regulatorni proteini važni za mišićnu proliferaciju i migenezu) čija je fosforilacija smanjena kod životinja s kaheksijom za razliku od tretiranih s BPC 157 (KANG i sur., 2018.).

Vegfa može uzrokovati brzu fosforilaciju Hdac7, dokazanu u *in vitro* sustavu već nakon pet minuta (WANG i sur., 2008.). Preko Plcg i Prkc aktivira se i protein kinaza D (Prkd), fosforilira se Hdac7 što rezultira proliferacijom i migracijom endotelnih stanica (PATEL-HETT i D'AMORE, 2011.). U ovom je istraživanju stoga istraživani učinak BPC 157 na ekspresiju gena *Hdac7*, a dobiveni rezultat potvrdio je njegovu pojačanu ekspresiju nakon pet, odnosno nakon 10 minuta.

Složenost zbivanja u signalnim putovima i veliki broj interakcija uključenih gena, odnosno njihovih proteinskih produkata, otežava jasnu detekciju mehanizma djelovanja BPC 157. Ono što je neosporno dokazano je da ima pleiotropni učinak, ne samo na ekspresiju određenih gena već i na aktivaciju njihovih proteinskih produkata i pokretanje složenih signalnih kaskada. Uzevši u obzir rezultate ovog i prethodnih istraživanja, može se zaključiti da BPC 157 djeluje izrazito brzo, ali s produženim učinkom te da ima modularni, odnosno regulatorni efekt na određene događaje uključene u angiogenezu, odnosno upalni odgovor (regulacija NO sustava, djelovanje na ekspresiju i aktivaciju određenih gena, odnosno njihovih proteinskih produkata).

Informacije koje su dobivene ovom studijom su na razini glasničke RNA pa bi sljedeći korak kojim bismo mogli dobiti dodatne informacije o djelovanju BPC 157 bile proteinske analize. Osim njegova učinka na ukupnu količinu proteina, bilo bi zanimljivo istražiti učinak na količinu fosforiliranih, odnosno aktiviranih proteina. Trebalo bi uzeti u obzir i dodatne vremenske točke, vodeći računa o brzini translacije i aktivacije proteina pošto da su za ovu studiju odabrani kratki vremenski intervali (dva, pet i 10 minuta) od izazivanja rane uz aplikaciju supstancije do uzorkovanja. To je omogućilo dobivanje podatkaka o molekularnoj signalizaciji i koordinaciji staničnih događaja u fazi koja bitno utječe na daljnji tijek procesa. Uzeta je u obzir velika brzina apsorpcije agensa apliciranih intraperitonealno (dospijevaju u jetru i limfu kroz nekoliko sekundi) (LUKAS i sur., 1971.), brzina od 40-100 sekundi za aktivaciju promotora transkripcije i brzina

transkripcije RNA od 0.4-4.3 kb/min (RNA polimeraza II), odnosno od čak 5.7 kb/min (RNA polimeraza I) (HAGER i sur., 2009.; SINGH i PADGETT, 2009.; BEN-ARI i sur., 2010.) te iznimno brzo djelovanje BPC 157 koje se mjeri u minutama (STAMBOLIJA i sur., 2016.; ZIVANOVIC-POSILOVIC i sur., 2016.).

Dodatna istraživanja omogućila bi otkriće mehanizma djelovanja BPC 157 radi potencijalne kliničke primjene na različita stanja koja uključuju cijeljenje pošto je brojnim studijama dokazan njegov pospješujući učinak. Ograničenja agenasa koja se istražuju za ubrzanje procesa cijeljenja u prvom redu su načini njihove aplikacije i stabilnost u *in vivo* sustavu, a kod BPC 157 nisu uočeni navedeni problemi s aplikacijom i stabilnosti. Pošto je cijeljenje tkiva složeni proces od izuzetne važnosti za brojna akutna i kronična stanja (kronične rane se javljaju u 1-2 % populacije, a na njihovo zbrinjavanje troši se 2-4 % proračuna za zdravstveni sustav (ŠITUM i sur., 2014.)), potencijalna je upotreba BPC 157 iznimno široka. Osim za cijeljenje, obzirom na obećavajuće rezultate različitih studija, poput onih koje su dokazale pozitivan učinak BPC 157 na kaheksiju koja se često javlja kod dijagnoza karcinoma (KANG i sur., 2018.), kolitis i multiplu sklerozu (KLICEK i sur., 2013.), oštećenja središnjeg živčanog sustava (VUKOJEVIĆ i sur., 2020.) i brojne druge, moguća je njegova primjena za različita patološka stanja.

7. ZAKLJUČCI

1. Sintetski pentadekapeptid BPC 157 ima učinak na transkripciju mRNA, odnosno pojačanu ekspresiju gena: *Akt1*, *Braf*, *Egfr*, *Egr1*, *Grb2*, *Hdac7*, *Kras*, *Mapk1*, *Mapk3*, *Mapk14*, *Nos3*, *Pik3cd*, *Plcg1*, *Prkcg*, *Ptk2*, *Pxn*, *Src*, *Srf* i *Vegfa*.
2. Poticanje ekspresije gena *Akt1*, *Grb2*, *Nos3*, *Pik3cd*, *Prkcg*, *Ptk2* i *Src* uslijed djelovanja BPC 157 vidi se jako brzo, već nakon dvije minute, a nastavlja se i kroz pet i deset minuta.
3. Utjecaj peptida BPC 157 na pojačanu ekspresiju gena *Braf*, *Egfr*, *Egr1*, *Hdac7*, *Mapk1*, *Mapk3*, *Mapk14*, *Plcg1*, *Pxn*, *Srf* i *Vegfa* dokazan je nakon pet, a vidi se i u desetoj minuti.
4. Poticanje ekspresije gena *Kras* djelovanjem BPC 157 uočeno je nakon 10 minuta.
5. BPC 157 utječe na ekspresiju gena uključenih u signalne putove RAS-RAF-MEK-ERK/MAPK, PI3K-AKT-eNOS-VEGF, PTK2(FAK)-SRC-PXN i SRC-PLC-PKC-MEK-ERK.
6. BPC 157 ima proangiogeni učinak na *in vivo* modelu kožne rane.

8. POPIS LITERATURE

AGARWAL, Y., C. BEATTY, S. HO, L. THURLOW, A. DAS, S. KELLY, I. CASTRONOVA, R. SALUNKE, S. BIRADAR, T. YESHI, A. RICHARDSON, M. BILITY (2020): Development of humanized mouse and rat models with full-thickness human skin and autologous immune cells. *Sci. Rep.* 10, 14598.

DOI: 10.1038/s41598-020-71548-z

ALBERTI, T., D. S. COELHO, A. VOYTENA, H. PITZ, M. DE PRA, L. MAZZARINO, S. KUHNEN, R. M. RIBEIRO-DO-VALLE, M. MARASCHIN, B. VELEIRINHO (2017): Nanotechnology: A Promising Tool Towards Wound Healing. *Curr. Pharm. Des.* 23, 3515-3528.

DOI: 10.2174/1381612823666170503152550

AVRUCH, J. (2007): MAP kinase pathways: The first twenty years. *Biochim. Biophys. Acta.* 1773, 1150-1160.

DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.11.006

BAHOU, W. F., D. V. GNATENKO (2004): Platelet transcriptome: The application of microarray analysis to platelets. *Semin. Thromb. Hemost.* 30, 473-484.

DOI: 10.1055/s-2004-833482

BARBARA, N. P., J. L. WRANA, M. LETARTE (1999): Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- β superfamily. *J. Biol. Chem.* 274, 584-594.

DOI: 10.1074/jbc.274.2.584

BARRIENTOS, S., O. STOJADINOVIC, M. S. GOLINKO, H. BREM, M. TOMIC-CANIC (2008): Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 16, 585-601.

DOI: 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x

BATELJA VULETIĆ, L. (2007): Usporedba morfoloških parametara i ekspresije VEGF-A u procesu cijeljenja kožne rane. Disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska.

BEN-ARI, Y., Y. BRODY, N. KINOR, A. MOR, T. TSUKAMOTO, D. L. SPECTOR, R. H. SINGER, Y. SHAV-TAL (2010): The life of an mRNA in space and time. J. Cell Sci. 123, 1761-1774.

DOI: 10.1242/jcs.062638

BETTS, J. G., K. A. YOUNG, J. A. WISE, E. JOHNSON, B. POE, D. H. KRUSE, O. KOROL, J. E. JOHNSON, M. WOMBLE, P. DESAIX (2013): Anatomy and Physiology [Internet] OpenStax, Houston, Texas, SAD. Dostupno na: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/5-1-layers-of-the-skin> [Pristupljeno 21. studenog 2019.].

BINDER, J. X., S. PLETSCHER-FRANKILD, K. TSAFOU, C. STOLTE, S. I. O'DONOGHUE, R. SCHNEIDER, L. J. JENSEN (2014): COMPARTMENTS: unification and visualization of protein subcellular localization evidence. Database (Oxford) 2014: bau012.

DOI: 10.1093/database/bau012.

BLAIR, R. J. R, H. MENG, M. J. MARCHESE, S. REN, L. B. SCHWARTZ, M. G. TONNESEN, B. L. GRUBER (1997): Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. J. Clin. Invest. 99, 2691-2700.

DOI: 10.1172/JCI119458

BÓDIS, B., O. KARÁDI, P. NÉMETH, C. DOHOCZKY, M. KOLEGA, G. MÓZSIK (1997): Evidence for direct cellular protective effect of PL-10 substances (Synthesized parts of body protection compound, BPC) i their specificity to gastric mucosal cells. Life Sci. 61, 243-248.

DOI: 10.1016/s0024-3205(97)00744-3

BONONI, A., C. AGNOLETTI, E. DE MARCHI, S. MARCHI, S. PATERGNANI, M. BONORA, C. GIORGI, S. MISSIROLI, F. POLETTI, A. RIMESSI, P. PINTON (2011): Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. Enzyme Res. 2011, 329098.

DOI: 10.4061/2011/329098

BRAICU, C., M. BUSE, C. BUSUIOC, R. DRULA, D. GULEI, L. RADULY, A. RUSU, A. IRIMIE, A. G. ATANASOV, O. SLABY, C. IONESCU, I. BERINDAN-NEAGOE (2019): A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers*. 11, 1618.

DOI: 10.3390/cancers11101618

BRAVERMAN, I. M., A. YEN (1977): Ultrastructure of the capillary loops in the dermal papillae of psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 68, 53-60.

DOI: 10.1111/1523-1747.ep12485169

BRCIC, L., I. BRCIC, M. STARESINIC, T. NOVINSKAK, P. SIKIRIC, S. SEIWERTH (2009): Modulatory effect of gastric pentadecapeptide BPC 157 on angiogenesis in muscle and tendon healing. *J. Physiol. Pharmacol.* 60, 191-196.

BROUGHTON, G. 2ND, J. E. JANIS, C. E. ATTINGER (2006): The basic science of wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 117, 12S-34S.

DOI: 10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2

BURNSTOCK, G., V. RALEVIC (1994): New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium. *Br. J. Plast. Surg.* 47, 527-543.

DOI: 10.1016/0007-1226(94)90136-8

BURRI, P. H., M. R. TAREK (1990): A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat. Rec.* 228, 35-45.

DOI: 10.1002/ar.1092280107

CÉBE-SUAREZ, S., A. ZEHNDER-FJÄLLMAN, K. BALLMER-HOFER (2006): The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 601-615.

DOI: 10.1007/s00018-005-5426-3

CEROVECKI, T., I. BOJANIC, L. BRCIC, B. RADIC, I. VUKOJA, S. SEIWERTH, P. SIKIRIC (2010): Pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736) improves ligament healing in the rat. *J. Orthop. Res.* 28, 1155-1161.

DOI: 10.1002/jor.21107

CESAREC, V., T. BECEJAC, M. MISIC, Z. DJAKOVIC, D. OLUJIC, D. DRMIC, L. BRCIC, D. S. ROKOTOV, S. SEIWERTH, P. SIKIRIC (2013): Pentadecapeptide BPC 157 i the esophagocutaneous fistula healing therapy. *Eur. J. Pharmacol.* 701, 203-212.

DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.11.055

CHAI, J., M. K. JONES, A. S. TARNAWSKI (2004): Serum response factor is a critical requirement for VEGF signaling in endothelial cells i VEGF-induced angiogenesis. *FASEB J.* 18, 1264-1266.

DOI: 10.1096/fj.03-1232fje

CHANG, C. H., W. C. TSAI, M. S. LIN, Y. H. HSU, J. H. PANG (2011): The promoting effect of pentadecapeptide BPC 157 on tendon healing involves tendon outgrowth, cell survival, and cell migration. *J. Appl. Physiol.* 110, 774-780.

DOI: 10.1152/jappphysiol.00945.2010

CHARKOUDIAN, N. (2003): Skin blood flow in adult human thermoregulation: How it works, when it does not, and why. *Mayo Clin. Proc.* 78, 603-612.

DOI: 10.4065/78.5.603

CHO, H. M., S. H. CHOI, K. C. HWANG, S. Y. OH, H. G. KIM, D. H. YOON, M. A. CHOI, S. LIM, H. SONG, Y. JANG, T. W. KIM (2005): The Src/PLC/PKC/MEK/ERK signaling pathway is involved in aortic smooth muscle cell proliferation induced by glycated LDL. *Mol. Cells.* 19, 60-66.

CLARK, R. A. F. (1996): *The Molecular i Cellular Biology of Wound Repair*, 2nd ed. Plenum Press, New York. Str. 3-35.

COMPARTMENTS (s. a.): COMPARTMENTS, subcellular localization database [Internet] Binder, J., S. Frankild, K. Tsafou, C. Stolte, S. O'Donoghue, R. Schneider i L. J. Jensen, Novo Nordisk Foundation Center for Protein Research (CPR), Luxembourg Centre for Systems Biomedicine (LCSB), Commonwealth Scientific, Industrial Research Organisation (CSIRO). Dostupno na: <https://compartments.jensenlab.org/> [Pristupljeno: 11. ožujka 2020.].

CUENDA, A., S. ROUSSEAU (2007): p38 MAP-Kinases pathway regulation , function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1773, 1358-1375.

DOI: 10.1016/j.bbamcr.2007.03.010

DALY, M. E., A. MAKRIS, M. REED, C. E. LEWIS (2003): Hemostatic regulators of tumor angiogenesis: a source of antiangiogenic agents for cancer treatment? *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 1660-1673.

DOI: 10.1093/jnci/djg101

DIBBLE, C. C., L. C. CANTLEY (2015): Regulation of mTORC1 by PI3K Signaling. *Trends Cell. Biol.* 25, 545-555.

DOI: 10.1016/j.tcb.2015.06.002

DRMIC, D., M. SAMARA, T. VIDOVIĆ, D. MALEKINUSIĆ, M. ANTUNOVIĆ, B. VRDOLJAK, J. RUZMAN, M. MILKOVIĆ PERISA, K. HORVAT PAVLOV, J. JEYAKUMAR, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ (2018): Counteraction of perforated cecum lesions in rats: Effects of pentadecapeptide BPC 157, L-NAME i L-arginine. *World J. Gastroenterol.* 24, 5462-5476.

DOI: 10.3748/wjg.v24.i48.5462

DUBIN, A. E., A. PATAPOUTIAN (2010): Nociceptors : the sensors of the pain pathway. *J. Clin. Invest.* 120, 3760-3772.

DOI: 10.1172/JCI42843

DUDZINSKI, D. M., T. MICHEL (2007): Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc. Res.* 75, 247-260.

DOI: 10.1016/j.cardiores.2007.03.023

ENSEMBL (1999): Ensembl genome browser (Ensembl release 99) [Internet] European Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Wellcome Genome Campus, Hinxton, UK. Dostupno na: <https://www.ensembl.org/> [Pristupljeno: 07. ožujka 2020.].

FALLAH, A., A. SADEGHINIA, H. KAHROBA, A. SAMADI, H. REZA HEIDARI, B. BRADARAN, S. ZEINALI, O. MOLAVI (2019): Therapeutic targeting of angiogenesis

molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases. Biomed. Pharmacother. 110, 775-785.

DOI: 10.1016/j.biopha.2018.12.022

FLEMING, M. S., W. LUO (2013): The anatomy, function, and development of mammalian A β low-threshold mechanoreceptors. Front. Biol. 8, 10.1007/s11515-013-1271-1.

DOI: 10.1007/s11515-013-1271-1

FOLKMAN, J. (1982): Angiogenesis: initiation and control. Ann. N. Y. Acad. Sci. 401, 212-227.

DOI: 10.1111/j.1749-6632.1982.tb25720.x

FOLKMAN, J. (1984): Angiogenesis. U: Biology of endothelial cells. (Jaffe, E. A., ur.). Nijhoff, Boston. Str. 412-428.

FÖRSTERMANN, U., W. C. SESSA (2012): Nitric oxide synthases: Regulation and function. Eur. Heart J. 33, 829-837.

DOI: 10.1093/eurheartj/ehr304

FRANCO, C. A., Z. LI (2009): SRF in angiogenesis Branching the vascular system. Cell Adh. Migr. 3, 264-267.

DOI: 10.4161/cam.3.3.8291

GENECARDS (1997): The Human Gene Database [Internet] Department of Molecular Genetics, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Izrael. Dostupno na: <https://www.genecards.org/> [Pristupljeno: 07. ožujka 2020.].

GERMAN, A. E., T.MAMMOTO, E. JIANG, D. E. INGBER, A. MAMMOTO (2014): Paxillin controls endothelial cell migration and tumor angiogenesis by altering neuropilin 2 expression. J. Cell Sci. 127, 1672-1683.

DOI: 10.1242/jcs.132316

GIROLOMONI, G., C. CAUX, S. LEBECQUE, C. DEZUTTER-DAMBUYANT, P. RICCIARDI-CASTAGNOLI (2002): Langerhans cells: still a fundamental paradigm for studying the immunobiology of dendritic cells. Trends Immunol. 23, 6-8.

DOI: 10.1016/s1471-4906(01)02125-1

GOLDSMITH, Z. G., D. N. DHANASEKARAN (2007): G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene*. 26, 3122-3142.

DOI: 10.1038/sj.onc.1210407

GONZALEZ, A. C., T. F. COSTA, Z. A. ANDRADE, A. R. MEDRADO (2016): Wound healing - A literature review. *An. Bras. Dermatol.* 91, 614-620.

DOI: 10.1590/abd1806-4841.20164741

GOSAIN, A., L. A. DIPIETRO (2004): Aging and Wound Healing. *World J. Surg.* 28, 321-326.

DOI: 10.1007/s00268-003-7397-6

GRABAREVIC, Z., M. TISLJAR, B. ARTUKOVIC, M. BRATULIC, P. DZAJA, S. SEIWERTH, P. SIKIRIC, J. PERIC, D. GERES, J. KOS (1997): The influence of BPC 157 on nitric oxide agonist and antagonist induced lesions in broiler chicks. *J. Physiol. Paris*. 91, 139-149.

DOI: 10.1016/s0928-4257(97)89478-8

GROSCURTH, P. (2002): Anatomy of sweat glands. *Curr. Probl. Dermatol.* 30, 1-9.

DOI: 10.1159/000060678

GUAN, J. L. (1997): Role of focal adhesion kinase in integrin signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1085-1096.

DOI: 10.1016/s1357-2725(97)00051-4

GUO, S., L. A. DIPIETRO (2010): Factors affecting wound healing. *J. Dent. Res.* 89, 219-229.

DOI: 10.1177/0022034509359125

GWYER, D., N. M. WRAGG, S. L. WILSON (2019): Gastric pentadecapeptide body protection compound BPC 157 and its role in accelerating musculoskeletal soft tissue healing. *Cell Tissue Res.* 377, 153-159.

DOI: 10.1007/s00441-019-03016-8

HAGER, G. L., J. G. MCNALLY, T. MISTELI (2009): Transcription Dynamic. *Mol. Cell.* 35, 741-753.

DOI: 10.1016/j.molcel.2009.09.005

HAMELIN, N. D., A. K. WONG (2015): *Flaps and Skin Grafts. U: Text and Atlas of Wound Diagnosis and Treatment* (HAMM, R. L., ur.). McGraw-Hill Education. New York, Chicago, San Francisco, Athens, London, Madrid, Mexico City, Milan, New Delhi, Singapore, Sydney, Toronto. Str. 272.

HANIFFA, M., M. GUNAWAN, L. JARDINE (2015): Human skin dendritic cells in health and disease. *J. Dermatol. Sci.* 77, 85-92.

DOI: 10.1016/j.jdermsci.2014.08.012

HANLON, C. D., D. J. ANDREW (2015): Outside-in signaling – a brief review of GPCR signaling with a focus on the *Drosophila* GPCR family. *J. Cell Sci.* 128, 3533-3542.

DOI: 10.1242/jcs.175158

HAURA, E. B. (2006): SRC and STAT Pathways. *J. Thorac. Oncol.* 1, 403-405.

DOI: 10.1016/S1556-0864(15)31601-4

HEIL, M., I. EITENMÜLLER, T. SCHMITZ-RIXEN, W. SCHAPER (2006): Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J. Cell. Mol. Med.* 10, 45-55.

DOI: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00290.x

HEMMINGS, B. A., D. F. RESTUCCIA (2012): PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a011189.

DOI: 10.1101/cshperspect.a011189

HINZ, B. (2007): Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J. Invest. Dermatol.* 127, 526-537.

DOI: 10.1038/sj.jid.5700613

HOFER, E., B. SCHWEIGHOFER (2007): Signal transduction induced in endothelial cells by growth factor receptors involved in angiogenesis. *Thromb. Haemost.* 97, 355-363.

HOLMES, D. I. R., I. ZACHARY (2005): The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease, *Genome Biol.* 6, 209.

DOI: 10.1186/gb-2005-6-2-209

HSIEH, M. J., H. T. LIU, C. N. WANG, H. Y. HUANG, Y. LIN, Y. S. KO, J. S. WANG, V. H. CHANG, J. S. PANG (2017): Therapeutic potential of pro-angiogenic BPC157 is associated with VEGFR2 activation and up-regulation. *J. Mol. Med.* 95, 323-333.

DOI: 10.1007/s00109-016-1488-y

HSIEH, M. J., C. H. LEE, H. Y. CHUEH, G. J. CHANG, H. Y. HUANG, Y. LIN, J. S. PANG (2020): Modulatory effects of BPC 157 on vasomotor tone and the activation of Src-Caveolin-1-endothelial nitric oxide synthase pathway. *Sci. Rep.* 10, 1-11.

DOI: 10.1038/s41598-020-74022-y

HUANG, J., B. D. MANNING (2009): A complex interplay between Akt, TSC2, and the two mTOR complexes. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 217-222.

DOI: 10.1042/BST0370217

HUGGENBERGER, R., M. DETMAR (2011): The cutaneous vascular system in chronic skin inflammation. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 15, 24-32.

DOI: 10.1038/jidsymp.2011.5

HURLEY, H. J., H. MESCON, G. MORETTI (1956): The anatomy and histochemistry of the arteriovenous anastomosis in human digital skin. *J. Invest. Dermatol.* 27, 133-145.

DOI: 10.1038/jid.1956.85

HUROWITZ, E. H., J. M. MELNYK, Y. J. CHEN, H. KOUROS-MEHR, M. I. SIMON, H. SHIZUYA (2000): Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes. *DNA Res.* 7, 111-120.

DOI: 10.1093/dnares/7.2.111.

HUVENEERS, S., E. H. DANEN (2009): Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J. Cell Sci.* 122, 1059-1069.

DOI: 10.1242/jcs.039446

JAITLEY, S., T. SARASWATHI (2012): Pathophysiology of Langerhans cells. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 16, 239-244.

DOI: 10.4103/0973-029X.99077

JAKSITS, S., E. KRIEHLER, A. S. CHARBONNIER, K. RAPPERSBERGER, G. STINGL, D. MAURER (1999): CD34⁺ cell-derived CD14⁺ precursor cells develop into Langerhans cells in a TGF-beta 1-dependent manner. *J. Immunol.* 163, 4869-4877.

JUNG, E. C., H. I. MAIBACH (2014): Animal Models for Percutaneous Absorption. U: Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration (Shah, V. P., H. I. Maibach, J. Jenner, ur.). Springer, New York. Str. 21-40.

KABASHIMA, K., T. HONDA, F. GINHOUX, G. EGAWA (2019): The immunological anatomy of the skin. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 19-30.

DOI: 10.1038/s41577-018-0084-5

KANG, E. A., Y. M. HAN, J. M. AN, Y. J. PARK, P. SIKIRIC, D. H. KIM, K. A. KWON, Y. J. KIM, D. YANG, H. TCHAH, K. B. HAHM (2018): BPC157 as Potential Agent Rescuing from Cancer Cachexia. *Curr. Pharm. Des.* 24, 1947-1956.

DOI: 10.2174/1381612824666180614082950

KANITAKIS, J. (2002): Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol.* 12, 390-399.

KANTETI, R., S. K. BATRA, F. E. LENNON, R. SALGIA (2016): FAK and paxillin, two potential targets in pancreatic cancer. *Oncotarget.* 7, 31586-31601.

DOI: 10.18632/oncotarget.8040

KARAR, J., A. MAITY (2011): PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front. Mol. Neurosci.* 4, 51.

DOI: 10.3389/fnmol.2011.00051

KAWASUMI, A., N. SAGAWA, S. HAYASHI, H. YOKOYAMA, K. TAMURA (2013): Wound healing in mammals and amphibians: toward limb regeneration in mammals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 367, 33-49.

DOI: 10.1007/82_2012_305

KELLY, B. D., S. F. HACKETT, K. HIROTA, Y. OSHIMA, Z. CAI, S. BERG-DIXON, A. ROWAN, Z. YAN, P. A. CAMPOCHIARO, G. L. SEMENZA (2003): Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ. Res.* 93, 1074-1081.

DOI: 10.1161/01.RES.0000102937.50486.1B

KEREMI, B., Z. LOHINAI, P. KOMORA, S. DUHAJ, K. BORSI, G. JOBBAGY-OVARI, K. KALLO, A. D. SZEKELY, A. FAZEKAS, C. DOBO-NAGY, P. SIKIRIC, G. VARGA (2009): Antiinflammatory effect of BPC 157 on experimental periodontitis in rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 60, 115-122.

KLICEK, R., D. KOLENC, J. SURAN, D. DRMIC, L. BRCIC, G. ARALICA, M. SEVER, J. HOLJEVAC, B. RADIC, T. TURUDIC, A. KOKOT, L. PATRLJ, R. RUCMAN, S. SEIWERTH, P. SIKIRIC (2013): Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 heals cysteamine-colitis and colon-colon-anastomosis and counteracts cuprizone brain injuries and motor disability. *J. Physiol. Pharmacol.* 64, 597-612.

KOBAYASHI, H., S. AIBA, Y. YOSHINO, H. TAGAMI (2003): Acute cutaneous barrier disruption activates epidermal p44/42 i p38 mitogen-activated protein kinases in human and hairless guinea pig skin. *Exp. Dermatol.* 12, 734-746.

DOI: 10.1111/j.0906-6705.2003.00045.x

KOLARSICK, P., M. KOLARSICK, C. GOODWIN (2011): Anatomy and Physiology of the Skin. *J. Dermatol. Nurses Assoc.* 3, 203-213.

DOI: 10.1097/JDN.0b013e3182274a98

KOLTE, D., J. A. MCCLUNG, W. S. ARONOW (2016): Vasculogenesis and Angiogenesis. U: *Translational Research in Coronary Artery Disease: Pathophysiology to Treatment* (Aronow, W. W., J. A. McClung, ur.). Academic Press. Str. 49-65.

DOI: 10.1016/B978-0-12-802385-3.00006-1

KUMBRINK, J., M. GERLINGER, J. P. JOHNSON (2005): Egr-1 induces the expression of its corepressor nab2 by activation of the nab2 promoter thereby establishing a negative feedback loop. *J. Biol. Chem.* 280, 42785-42793.

DOI: 10.1074/jbc.M511079200

LI, J., J. CHEN, R. KIRSNER (2007): Pathophysiology of acute wound healing. Clin. Dermatol. 25, 9-18.

DOI: 10.1016/j.clindermatol.2006.09.007

LIPOZENČIĆ, J. (2004): Uloga kože, razvitak kože, pregled građe i funkcija kože. U: Dermatovenerologija (Lipozenčić, J., ur.). Medicinska naklada, Zagreb. Str. 5-9.

LIVAK, K. J., T. D. SCHMITTGEN (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 25, 402-408.

DOI: 10.1006/meth.2001.1262

LÓPEZ-COLOMÉ, A. M., I. LEE-RIVERA, R. BENAVIDES-HIDALGO, E. LÓPEZ (2017): Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. J. Hematol. Oncol. 10, 50.

DOI: 10.1186/s13045-017-0418-y

LUKAS G., S. D. BRINDLE, P. GREENGARD, (1971): The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. J. Pharmacol. Exp. Ther. 178, 562-564.

LUMEN LEARNING (s. a.): Blood Vessels and Circulation, Homeostatic Regulation of the Vascular System. U: Anatomy i Physiology II, The Cardiovascular System: Blood Vessels and Circulation [Internet] Lumen Learning, Portland, Oregon, SAD. Dostupno na: <https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/homeostatic-regulation-of-the-vascular-system/> [Pristupljeno 25. listopada 2019.].

LUTTRELL, D. K., L. M. LUTTRELL (2004): Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases. Oncogene. 23, 7969-7978.

DOI: 10.1038/sj.onc.1208162

LUTTRELL, L. M. (2006): Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. Methods Mol. Biol. 332, 3-49.

DOI: 10.1385/1-59745-048-0:1

MAK, T. W., M. E. SAUNDERS (2005): The Immune Response: Basic and Clinical Principles. 1st ed., Academic Press. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo. Str. 71.

MARIEB, E. N., K. HOEHN (2016): Human Anatomy & Physiology, 10th ed. Pearson Education Limited. London, UK. Str. 720.

MARTIN, P. (1997): Wound healing - Aiming for perfect skin regeneration. Science. 276, 75-81.

DOI: 10.1126/science.276.5309.75

MASNEC, S., A. KOKOT, M. ZLATAR, M. KALAUZ, K. KUNJKO, B. RADIC, R. KLICEK, D. DRMIC, R. LAZIC, L. BRCIC, R. RADIC, R. IVEKOVIC, S. SEIWERTH, P. SIKIRIC (2015): Perforating corneal injury in rat i pentadecapeptide BPC 157. Exp. Eye Res. 136, 9-15.

DOI: 10.1016/j.exer.2015.04.016

MASON, D. E., K. E. MITCHELL, Y. LI, M.R. FINLEY, L.C. FREEMAN (2002): Molecular basis of voltage-dependent potassium currents in porcine granulosa cells. Mol. Pharmacol. 61, 201-213.

DOI: 10.1124/mol.61.1.201

MASSAGUÉ, J., J. SEOANE, D. WOTTON (2005): Smad transcription factors. Genes and Dev. 19, 2783-2810.

DOI: 10.1101/gad.1350705

MCCAIN, J. (2013): The MAPK (ERK) Pathway. Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. P T. 38, 96-98, 105-108.

MCCANCE, K. L., S. E. HUETHER (2018): Pathophysiology: The Biologic Basis for Disease in Adults and Children. 8th ed. (Brashers, V.L., N. S. Rote, ur.). Elsevier Health Sciences. Str. 1495-1513.

MCCUDDEN, C. R., M. D. HAINS, R. J. KIMPLE, D. P. SIDEROVSKI, F. S. WILLARD (2005): G-protein signaling: back to the future. Cell Mol. Life Sci. 62, 551-577.

DOI: 10.1007/s00018-004-4462-3

MCGARRIGLE, D., X. Y. HUANG (2007): GPCRs signaling directly through Src-family kinases. *Sci. STKE*. 2007, pe35.

DOI: 10.1126/stke.3922007pe35

MEBRATU, Y., Y. TESFAIGZI (2009): How ERK1/2 Activation Controls Cell Proliferation and Cell Death Is Subcellular Localization the Answer? *Cell Cycle*. 8, 1168-1175.

DOI: 10.4161/cc.8.8.8147

MIKUS, D., P. SIKIRIC, S. SEIWERTH, A. PETRICEVIC, G. ARALICA, N. DRUZIJANCIC, R. RUCMAN, M. PETEK, B. PIGAC, D. PEROVIC, M. KOLOMBO, N. KOKIC, S. MIKUS, B. DUPLANCIC, I. FATTORINI, B. TURKOVIC, I. ROTKVIC, S. MISE, I. PRKACIN, P. KONJEVODA, N. STAMBUK, T. ANIC (2001): Pentadecapeptide BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. *Burns*. 27, 817-827.

DOI: 10.1016/s0305-4179(01)00055-9

MILLER, M. C., J. NANCHAHAL (2005): Advances in the modulation of cutaneous wound healing and scarring. *BioDrugs*. 19, 363-381.

DOI: 10.2165/00063030-200519060-00004

MOLINA, J. R., A. A. ADJEI (2006): The Ras/Raf/MAPK pathway. *J. Thorac. Oncol.* 1,7-9.

MOLNAR, C., J. GAIR (2015): Concepts of Biology [Internet] 1st Canadian Edition. BCcampus. Dostupno na: <https://opentextbc.ca/biology/> [Pristupljeno: 20. ožujka 2020.].

MORGAN, C., Y. NIGAM (2013): Naturally derived factors and their role in the promotion of angiogenesis for the healing of chronic wounds. *Angiogenesis*. 16, 493-502.

DOI: 10.1007/s10456-013-9341-1

MORT, R. L., I. J. JACKSON, E. E. PATTON (2015): The melanocyte lineage in development and disease. *Development*. 142, 620-632.

DOI: 10.1242/dev.106567

MUNSHI, A., R. RAMESH (2013): Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Role in Radiation Response. *Genes Cancer*. 4, 401-408.

DOI: 10.1177/1947601913485414

NCBI (1988): National Center for Biotechnology Information – NCBI databases [Internet] National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, SAD. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [Pristupljeno: 07. ožujka 2020.].

NCBI RESOURCE COORDINATORS (2018): Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*. 46, D8-D13.

DOI: 10.1093/nar/gkx1095

NEW, D. C., Y. H. WONG (2007): Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. *J. Mol. Signal*. 2, 2.

DOI: 10.1186/1750-2187-2-2

NISHIDA, N., H. YANO, T. NISHIDA, T. KAMURA, M. KOJIRO (2006): Angiogenesis in cancer. *Vasc. Health Risk Manag*. 2, 213-219.

DOI: 10.2147/vhrm.2006.2.3.213

NYBERG, P., L. XIE, R. KALLURI (2005): Endogenous Inhibitors of Angiogenesis. *Cancer Res*. 65, 3967-3979.

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2427

OELKRUG, R., E. T. POLYMERPOULOS, M. JASTROCH (2015): Brown adipose tissue: physiological function and evolutionary significance. *J. Comp. Physiol. B*. 185, 587-606.

DOI: 10.1007/s00360-015-0907-7

ONO, S., G. EGAWA, K. KABASHIMA (2017): Regulation of blood vascular permeability in the skin. *Inflamm. Regen*. 37, 1-8.

DOI: 10.1186/s41232-017-0042-9

PAL, I., M. MANDAL (2012): PI3K and Akt as molecular targets for cancer therapy: current clinical outcomes. *Acta Pharmacol. Sin*. 33, 1441-1458.

DOI: 10.1038/aps.2012.72

PANDEY, A. K., E. K. SINGHI, J. P. ARROYO, T. A. IKIZLER, E. R. GOULD, J. BROWN, J. A. BECKMAN, D. G. HARRISON, J. MOSLEHI (2018): Mechanisms of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Inhibitor-Associated Hypertension and Vascular Disease. *Hypertension*. 71, e1-e8.

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10271

PARSONS, J. T., K. H., J. K. SLACK, J. M. TAYLOR, S. A. WEED (2000): Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene*. 19, 5606-5613.

DOI: 10.1038/sj.onc.1203877

PARSONS, J. T. (2003): Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell Sci.* 116, 1409-1416.

DOI: 10.1242/jcs.00373

PATEL-HETT, S., P. A. D'AMORE (2011): Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 353-363.

DOI: 10.1387/ijdb.103213sp

PEROVIC, D., G. BULJAT, D. KOLENC, D. DRMIC, S. SEIWERTH, P. SIKIRIC (2015): Spinal Cord Injury in Rat – Therapeutic Effect of Pentadecapeptide BPC 157. *FASEB J.* 29, 61-67.

PFAFFL, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.

DOI: 10.1093/nar/29.9.e45

PLONKA, P. M., T. PASSERON, M. BRENNER, D. J. TOBIN, S. SHIBAHARA, A. THOMAS, A. SLOMINSKI, A. L. KADEKARO, D. HERSHKOVITZ, E. PETERS, J. J. NORDLUND, Z. ABDEL-MALEK, K. TAKEDA, R. PAUS, J. P. ORTONNE, V. J. HEARING, K. U. SCHALLREUTER (2009): What are melanocytes really doing all day long...? *Exp. Dermatol.* 18, 799-819.

DOI: 10.1111/j.1600-0625.2009.00912.x

PRESCOTT, T., B. MITCHINSON, R. GRANT (2011): Vibrissal behavior and function. Scholarpedia. 6, 6642.

DOI: 10.4249/scholarpedia.6642

RAICA, M., A. M. CIMPEAN (2010): Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. Pharmaceuticals. 3, 572-599.

DOI: 10.3390/ph3030572

RGD (1999): Rat Genome Database – RGD [Internet] Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin, SAD. Dostupno na: <http://rgd.mcw.edu/>) [Pristupljeno: 07. ožujka 2020.].

RICHARD, D. E., V. VOURET-CRAVIARI, J. POUYSSÉGUR (2001): Angiogenesis and G-protein-coupled receptors: signals that bridge the gap. Oncogene. 20, 1556-1562.

DOI: 10.1038/sj.onc.1204193

RISAU, W., I. FLAMME (1995): Vasculogenesis. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 11, 73-91.

DOI: 10.1146/annurev.cb.11.110195.000445

RISAU, W. (1997): Mechanisms of angiogenesis. Nature. 386, 671-674.

DOI: 10.1038/386671a0

ROBINSON, B. F., S. E. EPSTEIN, G. D. BEISER, E. BRAUNWALD (1966): Control of heart rate by the autonomic nervous system. Studies in man on the interrelation between baroreceptor mechanisms i exercise. Circ. Res. 19, 400-411.

DOI: 10.1161/01.res.19.2.400

ROBSON, M. C., D. L. STEED, M. G. FRANZ (2001): Wound healing: biologic features and approaches to maximum healing trajectories. Curr. Prob. Surg. 38, 72-141.

DOI: 10.1067/j.cpsurg.2008.10.004

ROSENBAUM, D. M., S. G. RASMUSSEN, B. K. KOBILKA (2009): The structure and function of G-protein-coupled receptors. Nature. 459, 356-363.

DOI: 10.1038/nature08144

ROUX, P. P., J. BLENIS (2004): ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 320-344.

DOI: 10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004

RSTUDIO TEAM (2015): Rstudio: Integrated Development Environment for R [Internet] RStudio, Inc., Boston, Massachusetts, SAD. Dostupno na: <http://www.rstudio.com/>

SATO, T. N., Y. TOZAWA, U. DEUTSCH, K. WOLBURG-BUCHHOLZ, Y. FUJIWARA, M. GENDRON-MAGUIRE, T. GRIDLEY, H. WOLBURG, W. RISAU, Y. QIN (1995): Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 i Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*. 376, 70-74.

DOI: 10.1038/376070a0

SCHÄFFER, M. R., U. TANTRY, S. S. GROSS, H. L. WASSERBURG, A. BARBUL (1996): Nitric oxide regulates wound healing. *J. Surg. Res.* 63, 237-240.

DOI: 10.1006/jsre.1996.0254

SCHMITTGEN, T. D., K. J. LIVAK (2008): Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101-1108.

DOI: 10.1038/nprot.2008.73

SCHOETTL, T., I. P. FISCHER, S. USSAR (2018): Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *J. Exp. Biol.* 221, jeb162958.

DOI: 10.1242/jeb.162958

SEIWERTH, S., P. SIKIRIC, Z. GRABAREVIC, I. ZORICIC, M. HANZEVACKI, D. LJUBANOVIC, V. CORIC, P. KONJEVODA, M. PETEK, R. RUCMAN, B. TURKOVIC, D. PEROVIC, D. MIKUS, S. JANDRIJEVIC, M. MEDVIDOVIC, T. TADIC, B. ROMAC, J. KOS, J. PERIC, Z. KOLEGA (1997): BPC 157's effect on healing. *J. Physiol. Paris.* 91, 173-178.

DOI: 10.1016/s0928-4257(97)89480-6

SEMENZA, G. L. (2007): Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J. Cell Biochem.* 102, 840-847.

DOI: 10.1002/jcb.21523

SHARMA, J. N., A. AL-OMRAN, S. S. PARVATHY (2007): Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 15, 252-259.

DOI: 10.1007/s10787-007-0013-x

SHAW, T. J., P. MARTIN (2009): Wound repair at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 3209-3213.

DOI: 10.1242/jcs.031187

SIKIRIĆ, P., M. PETEK, R. RUCMAN, S. SEIWERTH, Z. GRABAREVIĆ, I. ROTKVIĆ, B. TURKOVIĆ, V. JAGIĆ, B. MILDNER, M. DUVNJAK, N. LANG, Z. DANILOVIĆ, A. CVIKO, M. KOLEGA, A. SALLMANI, S. ĐAČIĆ, M. BURA, T. BRKIĆ, M. BANIĆ, M. DODIG, V. ČORIĆ, V. ŠIMIČEVIĆ, T. M. VELJAČA, D. ERCEG, D. JEŽEK, LJ. SIMUNIĆ-BANEK, N. SKROZA, K. BULIĆ, G. BULJAT, M. HANŽEVAČKI, V. ORIOVAC, D. LUČINGER, J. ČULIG, J. ŠEPAROVIĆ, A. MAROVIĆ, S. MIŠE, E. SUCHANEK, W. MATOZ, D. PEROVIĆ, M. GJURAŠIN, S. MIKULANDRA, K. DERNIKOVIĆ, V. ČUK, I. KARAKAS (1993): A new gastric juice peptide, BPC. An overview of the stomach-stress-organoprotection hypothesis and beneficial effects of BPC. *J. Physiol. Paris*. 87, 313-327.

DOI: 10.1016/0928-4257(93)90038-u

SIKIRIC, P., S. SEIWERTH, L. BRCIC, M. SEVER, R. KLICEK, B. RADIC, D. DRMIC, S. ILIC, D. KOLENC (2010): Revised Robert's cytoprotection and adaptive cytoprotection and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Possible significance and implications for novel mediator. *Curr. Pharm. Des.* 16, 1224-1234.

DOI: 10.2174/138161210790945977

SIKIRIC, P., S. SEIWERTH, R. RUCMAN, B. TURKOVIC, D. S. ROKOTOV, L. BRCIC, M. SEVER, R. KLICEK, B. RADIC, D. DRMIC, S. ILIC, D. KOLENC, V. STAMBOLIJ, Z. ZORICIC, H. VRCIC, B. SEBECIC (2012): Focus on ulcerative colitis: stable gastric pentadecapeptide BPC 157. *Curr. Med. Chem.* 19, 126-132.

DOI: 10.2174/092986712803414015

SINGH J., R. A. PADGETT (2009): Rates of *in situ* transcription and splicing in large human genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1128-1133.

DOI: 10.1038/nsmb.1666

SINO BIOLOGICAL (s. a.): VEGF Signaling [Internet] Sino Biological, Peking, Kina. Dostupno na: <https://www.sinobiological.com/pathways/vegf-pathway> [Pristupljeno 03. prosinca 2020.].

SKAGEN, K., O. HENRIKSEN, O. AMTORP, F. FOG-MØLLER, H. LAM (1981): Local regulation of blood flow in subcutaneous tissue in patients with acute myocardial infarction. Clin. Sci. 60, 157-164.

DOI: 10.1042/cs0600157

SMITH, J. R., G. T. HAYMAN, S. J. WANG, S. J. F. LAULEDERKIND, M. J. HOFFMAN, M. L. KALDUNSKI, M. TUTAJ, J. THOTA, H. S. NALABOLU, S. L. R. ELLANKI, M. A. TUTAJ, J. L. DE PONS, A. E. KWITEK, M. R. DWINELL, M. E. SHIMOYAMA (2020): The Year of the Rat: The Rat Genome Database at 20: a multi-species knowledgebase and analysis platform. Nucleic Acids Res. 48, D731-D742.

DOI: 10.1093/nar/gkz1041.

SONKSEN, J., J. CRAGGS (1999): Circulation of the skin. Curr. Anaesth. Crit. Care. 10, 58-63.

DOI: 10.1016/S0953-7112(99)90002-9

SOOD, A., M. S. GRANICK, N. L. TOMASELLI (2014): Wound Dressings and Comparative Effectiveness Dana. Adv. Wound Care. 3, 511-529.

DOI: 10.1089/wound.2012.0401

STAMBOLIJA, V., T. P. STAMBOLIJA, J. K. HOLJEVAC, T. MURSELOVIC, J. RADONIC, V. DUZEL, B. DUPLANCIC, S. UZUN, G. ZIVANOVIC-POSILOVIC, D. KOLENC, D. DRMIC, Z. ROMIC, S. SEIWERTH, P. SIKIRIC (2016): BPC 157: The counteraction of succinylcholine, hyperkalemia, and arrhythmias. Eur. J. Pharmacol. 781, 83-91.

DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.04.004

STELZER, G., N. ROSEN, I. PLASCHKES, S. ZIMMERMAN, M. TWIK, S. FISHILEVICH, T. I. STEIN, R. NUDEL, I. LIEDER, Y. MAZOR, S. KAPLAN, D. DAHARY, D. WARSHAWSKY, Y. GUAN-GOLAN, A. KOHN, N. RAPPAPORT, M.

SAFRAN, D. LANCET (2016): The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. 54, 1.30.1-1.30.33.

DOI: 10.1002/cpbi.5

STUPNISEK, M., S. FRANJIC, D. DRMIC, M. HRELEC, D. KOLENC, B. RADIC, D. BOJIC, A. VCEV, S. SEIWERTH, P. SIKIRIC (2012): Pentadecapeptide BPC 157 reduces bleeding time and thrombocytopenia after amputation in rats treated with heparin, warfarin or aspirin. *Thromb. Res.* 129, 652-659.

DOI: 10.1016/j.thromres.2011.07.035

SUN, B. K., Z. SIPRASHVILI, P. A. KHAVARI (2014): Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science*. 346, 941-945.

DOI: 10.1126/science.1253836

ŠEBEČIĆ, B., V. NIKOLIĆ, P. SIKIRIĆ, S. SEIWERTH, T. SOSA, L. PATRLJ, Z. GRABAREVIĆ, R. RUCMAN, M. PETEK, P. KONJEVODA, S. JADRIJEVIĆ, D. PEROVIĆ, M. SLAJ (1999): Osteogenic effect of a gastric pentadecapeptide, BPC-157, on the healing of segmental bone defect in rabbits: a comparison with bone marrow and autologous cortical bone implantation. *Bone*. 24, 195-202.

DOI: 10.1016/s8756-3282(98)00180-x

ŠITUM, M., M. KOLIĆ, G. REDŽEPI, S. ANTOLIĆ (2014): Kronične rane kao javnozdravstveni problem. *Acta Med. Croatica*, 68, 5-7.

TAKEO, M., W. LEE, M. ITO (2015): Wound Healing and Skin Regeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5, 1-12.

DOI: 10.1101/cshperspect.a023267

THAN, U. T. T., D. GUANZON, D. LEAVESLEY, T. PARKER (2017): Association of Extracellular Membrane Vesicles with Cutaneous Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1-20.

DOI: 10.3390/ijms18050956

THE UNIPROT CONSORTIUM (2021): UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021, *Nucleic Acids Res.* 49, D480-D489.

DOI: 10.1093/nar/gkaa1100

TKALČEVIĆ, V. I., S. CUZIĆ, K. BRAJSA, B. MILDNER, A. BOKULIĆ, K. SITUM, D. PEROVIĆ, I. GLOJNARIĆ, M. J. PARNHAM (2007): Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr-1 expression. *Eur. J. Pharmacol.* 570, 212-221.

DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.05.072

TONNESEN, M. G., X. FENG, R. A. CLARK (2000): Angiogenesis in wound healing. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 5, 40-46.

DOI: 10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x

TOUTOUNCHIAN, J. J., J. PAGADALA, D. D. MILLER, J. BAUDRY, F. PARK, E. CHAUM, V. MORALES-TIRADO, C. R. YATES (2017): Novel Small Molecule JP-153 Targets the Src-FAK-Paxillin Signaling Complex to Inhibit VEGF-Induced Retinal Angiogenesis. *Mol. Pharmacol.* 91, 1-13.

DOI: 10.1124/mol.116.105031

TUDOR, M., I. JANDRIC, A. MAROVIC, M. GJURASIN, D. PEROVIC, B. RADIC, A. B. BLAGAIC, D. KOLENC, L. BRCIC, K. ZARKOVIC, S. SEIWERTH, P. SIKIRIC (2010): Traumatic brain injury in mice and pentadecapeptide BPC 157 effect. *Regul. Pept.* 160, 26-32.

DOI: 10.1016/j.regpep.2009.11.012

TUTEJA, N. (2009): Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal. Behav.* 4, 942-947.

DOI: 10.4161/psb.4.10.9530

UCUZIAN, A. A., A. A. GASSMAN, A. T. EAST, H. P. GREISLER (2010): Molecular mediators of angiogenesis. *J. Burn. Care Res.* 31, 158-175.

DOI: 10.1097/BCR.0b013e3181c7ed82

UNIPROT (s. a.) Universal Protein Resource – UniProt [Internet] Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, UK; Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), Geneva, Switzerland; Protein Information Resource (PIR); Georgetown University Medical Center in

Washington, D. C., SAD, Dostupno na: <https://www.uniprot.org/> [Pristupljeno: 07. ožujka 2020.].

VACHON, P. H. (2011): Integrin Signaling, Cell Survival, and Anoikis: Distinctions, Differences, and Differentiation. *J. Signal. Transduct.* 2011, 738137.

DOI: 10.1155/2011/738137

VELNAR, T., T. BAILEY, V. SMRKOLJ (2009): The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J. Int. Med. Res.* 37, 1528-1542.

DOI: 10.1177/147323000903700531

VUKOJEVIĆ, J., M. SIROGLAVIĆ, K. KAŠNIK, T. KRALJ, D. STANČIĆ, A. KOKOT, D. KOLARIĆ, D. DRMIĆ, A. Z. SEVER, I. BARIŠIĆ, J. ŠURAN, D. BOJIĆ, M. H. PATRLJ, I. SJEKAVICA, K. H. PAVLOV, T. VIDOVIĆ, J. VLAINIĆ, M. STUPNIŠEK, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ (2018): Rat inferior caval vein (ICV) ligation and particular new insights with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157. *Vascul. Pharmacol.* 106, 54-66.

DOI: 10.1016/j.vph.2018.02.010

VUKOJEVIĆ, J., B. VRDOLJAK, D. MALEKINUŠIĆ, M. SIROGLAVIĆ, M. MILAVIĆ, D. KOLENC, A. BOBAN BLAGAIĆ, L. BATELJA, D. DRMIĆ, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ (2020): The effect of pentadecapeptide BPC 157 on hippocampal ischemia/reperfusion injuries in rats. *Brain Behav.* 10, 1-13.

DOI: 10.1002/brb3.1726

WANG, S., X. LI, M. PARRA, E. VERDIN, R. BASSEL-DUBY, E. N. OLSON (2008): Control of endothelial cell proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 7738-7743.

DOI: 10.1073/pnas.0802857105

WANG, T., C. HE (2018): Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 44, 38-50.

DOI: 10.1016/j.cytogfr.2018.10.002

WEIS, W. I., B. K. KOBILKA (2019): The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annu. Rev. Biochem.* 87, 897-919.

DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-033910

WELSH, M., M. JAMALPOUR, G. ZANG, B. ÅKERBLOM (2016): The role of the Src Homology-2 domain containing protein B (SHB) in β cells. *J. Mol. Endocrinol.* 56, R21-R31.

DOI: 10.1530/JME-15-0228

WENNERBERG, K., K. L. ROSSMAN, C. J. DER (2005): The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* 118, 843-846.

DOI: 10.1242/jcs.01660

WESTHOFF, M. A., B. SERRELS, V. J. FINCHAM, M. C. FRAME, N. O. CARRAGHER (2004): SRC-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival signaling. *Mol. Cell Biol.* 24, 8113-8133.

DOI: 10.1128/MCB.24.18.8113-8133.2004

WICKETT, R. R., M. O. VISSCHER (2006): Structure and function of the epidermal barrier. *Am. J. Infect. Control.* 34, 98-110.

DOI: 10.1016/j.ajic.2006.05.295

WIDMANN, C., S. GIBSON, M. B. JARPE, G. L. JOHNSON (1999): Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Review Physiol Rev.* 79, 143-180.

DOI: 10.1152/physrev.1999.79.1.143

WOLLINA, U., M. B. ABDEL-NASER, R. MANI (2006): A review of the microcirculation in skin in patients with chronic venous insufficiency: The problem and the evidence available for therapeutic options. *Int. J. Low. Extrem. Wounds.* 5, 169-180.

DOI: 10.1177/1534734606291870

WONG, R., S. GEYER, W. WENINGER, J. C. GUIMBERTEAU, J. K. WONG (2016): The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp. Dermatol.* 25, 92-98.

DOI: 10.1111/exd.12832

YATES, A. D., P. ACHUTHAN, W. AKANNI, J. ALLEN, J. ALLEN, J. ALVAREZ-JARRETA, M. R. AMODE, I. M. ARMEAN, A. G. AZOV, R. BENNETT, J. BHAI, K.

BILLIS, S. BODDU, J. C. MARUGÁN, C. CUMMINS, C. DAVIDSON, K. DODIYA, R. FATIMA, A. GALL, C. GARCIA GIRON, L. GIL, T. GREGO, L. HAGGERTY, E. HASKELL, T. HOURLIER, O. G. IZUOGU, S. H. JANACEK, T. JUETTEMANN, M. KAY, I. LAVIDAS, T. LE, D. LEMOS, J. GONZALEZ MARTINEZ, T. MAUREL, M. MCDOWALL, A. MCMAHON, S. MOHANAN, B. MOORE, M. NUHN, D. N. OHEH, A. PARKER, A. PARTON, M. PATRICIO, M. P. SAKTHIVEL, A. I. A. SALAM, B. M. SCHMITT, H. SCHUILENBURG, D. SHEPPARD, M. SYCHEVA, M. SZUBA, K. TAYLOR, A. THORMANN, G. THREADGOLD, A. VULLO, B. WALT, S. A. WINTERBOTTOM, A. ZADISSA, M. CHAKIACHVILI, B. FLINT, A. FRANKISH, S. E. HUNT, G. IISLEY, M. KOSTADIMA, N. LANGRIDGE, J. E. LOVELAND, F. J. MARTIN, J. MORALES, J. M. MUDGE, M. MUFFATO, E. PERRY, M. RUFFIER, S. J. TREVANION, F. CUNNINGHAM, K. L. HOWE, D. R. ZERBINO, P. FLICEK (2020): Ensembl 2020. *Nucleic Acids Res.* 48, D682-D688.

DOI: 10.1093/nar/gkz966

ZHAO, X., J. L. GUAN (2011): Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 610-615.

DOI: 10.1016/j.addr.2010.11.001

ZIVANOVIĆ-POSILOVIC, G., D. BALENOVIC, I. BARISIC, D. STRINIC, V. STAMBOLIJ, M. UDOVICIC, S. UZUN, D. DRMIC, J. VLAINIC, M. L. BENCIC, A. SINDIC, S. SEIWERTH, P. SIKIRIC (2016): Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 and bupivacaine. *Eur. J. Pharmacol.* 793, 56-65.

DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.10.035

ZWICK, R. K., C. F. GUERRERO-JUAREZ, V. HORSLEY, M. V. PLIKUS (2018): Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metab.* 27, 68-83.

DOI: 10.1016/j.cmet.2017.12.002

9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

9.1. ŽIVOTOPIS

Marija Milavić rođena je 12. prosinca 1980. godine u Splitu gdje je i završila opću gimnaziju “Marko Marulić”. Školovanje nastavlja na Sveučilištu u Zagrebu gdje upisuje i 2007. godine završava studij na biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, smjer molekularna biologija.

U travnju 2009. godine postaje zaposlenik Medicinskog fakulteta u Laboratoriju za molekularnu patologiju Zavoda za patologiju gdje radi u području dijagnostike solidnih tumora, sudjeluje u pripremi i održavanju nastave te u raznim znanstvenim projektima i aktivnostima.

2011. godine upisuje poslijediplomski studij veterinarske znanosti na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Koautor je na više znanstvenih radova s međunarodnom recenzijom. Završila je različite tečajeve kojima se educirala u području metoda molekularne biologije, bioinformatike te za rad s pokusnim životinjama. Sudjelovala je na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima i stručnim sastancima pasivno te aktivno kroz prezentacije i postere.

9.2. POPIS RADOVA

Znanstveni radovi objavljeni u časopisima

GOJKOVIC, S., I. KREZIC, H. VRANES, H. ZIZEK, D. DRMIC, K. HORVAT PAVLOV, A. PETROVIC, L. BATELJA VULETIC, **M. MILAVIC**, S. SIKIRIC, I. STILINOVIC, M. SAMARA, M. KNEZEVIC, I. BARISIC, I. SJEKAVICA, E. LOVRIC, A. SKRTIC, S. SEIWERTH, P. SIKIRIC (2021): BPC 157 Therapy and the Permanent Occlusion of the Superior Sagittal Sinus in Rat: Vascular Recruitment. *Biomedicines*. 9, 744.

DOI: 10.3390/biomedicines9070744

KNEZEVIC, M., S. GOJKOVIC, I. KREZIC, H. ZIZEK, D. MALEKINUSIC, B. VRDOLJAK, H. VRANES, T. KNEZEVIC, I. BARISIC, K. HORVAT PAVLOV, D. DRMIC, M. STAROVESKI, A. DJUZEL, Z. RAJKOVIC, T. KOLAK, I. KOCMAN, E. LOVRIC, **M. MILAVIC**, S. SIKIRIC, A. TVRDEIC, L. PATRLJ, S. STRBE, A. KOKOT, A. BOBAN BLAGAIC, A. SKRTIC, S. SEIWERTH, P. SIKIRIC (2021): Occlusion of the Superior Mesenteric Artery in Rats Reversed by Collateral Pathways Activation: Gastric Pentadecapeptide BPC 157 Therapy Counteracts Multiple Organ Dysfunction Syndrome; Intracranial, Portal, and Caval Hypertension; and Aortal Hypotension. *Biomedicines*. 9, 609.

DOI: 10.3390/biomedicines9060609

SEDLIC, F., F. SEIWERTH, A. SEPAC, S. SIKIRIC, M. CINDRIC, **M. MILAVIC**, L. BATELJA VULETIC, M. JAKOPOVIC, S. SEIWERTH (2020): Mitochondrial ROS Induce Partial Dedifferentiation of Human Mesothelioma via Upregulation of NANOG. *Antioxidants (Basel)* 9, 606.

DOI: 10.3390/antiox9070606

VUKOJEVIĆ, J., B. VRDOLJAK, D. MALEKINUŠIĆ, M. SIROGLAVIĆ, **M. MILAVIĆ**, D. KOLENC, A. BOBAN BLAGAIĆ, L. BATELJA, D. DRMIĆ, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ (2020): The effect of pentadecapeptide BPC 157 on hippocampal ischemia/reperfusion injuries in rats. *Brain Behav*. 10, e01726.

DOI: 10.1002/brb3.1726

SIKIRIĆ, P., R. RUČMAN, B. TURKOVIĆ, M. SEVER, R. KLIČEK, B. RADIĆ, I. D. DRMIĆ, M. STUPNIŠEK, **M. MIŠIĆ**, L. BATELJA VULETIĆ, K. HORVAT PAVLOV, I. BARIŠIĆ, A. KOKOT, M. PEKLIĆ, S. STRBE, A. BOBAN BLAGAIĆ, A. TVRDEIĆ, D. STANČIĆ-ROKOTOV, H. VRČIĆ, M. STAREŠINIĆ, S. SEIWERTH (2018): Novel Cytoprotective Mediator, Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157. Vascular Recruitment and Gastrointestinal Tract Healing. *Curr. Pharm. Des.* 24, 1990-2001.

DOI: 10.2174/1381612824666180608101119

SEIWERTH, S., R. RUČMAN, B. TURKOVIĆ, M. SEVER, R. KLIČEK, B. RADIĆ, I. D. DRMIĆ, M. STUPNIŠEK, **M. MIŠIĆ**, L. VULETIĆ BATELJA, K. PAVLOV HORVAT, I. BARIŠIĆ, A. KOKOT, M. JAPJEC, A. BLAGAIĆ BOBAN, A. TVRDEIĆ, D. ROKOTOV STANČIĆ, H. VRČIĆ, M. STAREŠINIĆ, B. ŠEBEČIĆ, P. SIKIRIĆ (2018): BPC 157 and Standard Angiogenic Growth Factors. Gastrointestinal Tract Healing, Lessons from Tendon, Ligament, Muscle and Bone Healing. *Curr. Pharm. Des.* 24, 1972-1989.

DOI: 10.2174/1381612824666180712110447

MIHOKOVIĆ, S., D. KEZIĆ, **M. MIŠIĆ**, M. POPOVIĆ, M. HOHŠTETER (2017): Komparativna analiza tumora sjemenika pasa upotrebom histopatološke pretrage i metodom protočne citometrije. *Veterinar.* 55, 2-9.

BRČIĆ, L., M. JAKOPOVIĆ, **M. MIŠIĆ**, F. SEIWERTH, I. KERN, S. SMOJVER-JEŽEK, F. QUEHENBERGER, M. SAMARŽIJA, S. SEIWERTH (2016): Analysis of the frequency of EGFR, KRAS and ALK mutations in patients with lung adenocarcinoma in Croatia. *Diagn. Pathol.* 11, 90.

DOI: 10.1186/s13000-016-0544-9

ĆAVAR, S., D. JELAŠIĆ, S. SEIWERTH, M. MILOŠEVIĆ, Z. HUTINEC, **M. MIŠIĆ** (2015): Endoglin (CD 105) as a potential prognostic factor in neuroblastoma. *Pediatr. Blood Cancer.* 62, 770-775.

DOI: 10.1002/pbc.25427

SEIWERTH, S., L. BRČIĆ, L. BATELJA VULETIĆ, D. KOLENC, G. ARALICA, **M. MIŠIĆ**, A. ZENKO, I. D. DRMIĆ, R. RUČMAN, P. SIKIRIĆ (2014): BPC 157 and blood vessels. *Curr. Pharm. Des.* 20, 1121-1125.

DOI: 10.2174/13816128113199990421

CESAREC, V., T. BEČEJAC, **M. MIŠIĆ**, Ž. DJAKOVIĆ, D. OLUJIĆ, I. D. DRMIĆ, L. BRČIĆ, D. STANČIĆ ROKOTOV, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ (2013): Pentadecapeptide BPC 157 and the esophagocutaneous fistula healing therapy. Eur. J. Pharmacol. 701, 203-212.

DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.11.055

Kongresni znanstveni radovi

TIŠLJAR, M., **M. MIŠIĆ**, M. BIĐIN, Z. BIĐIN, Ž. GRABAREVIĆ, S. SEIWERTH, M. DINARINA-SABLIĆ, T. AMŠEL ZELENKA (2012): Preliminary evaluation of a possible role of nitric oxide and virus in the development of metabolic cardiovascular diseases in farm reared broiler turkey flocks. 9th International Symposium on Turkey Diseases, 21.-23. lipnja. Berlin, Njemačka. Str. 42-51.

Kongresna priopćenja i sažeci

SIKIRIĆ, S., A. ŠEPAC, M. CINDRIĆ, F. SEIWERTH, **M. MILAVIĆ**, L. BATELJA VULETIĆ, F. SEDLIĆ (2019): Mitochondrial reactive oxygen species drive reprogramming of mesothelioma cell line. 10th World Congress on Targeting Mitochondria. 28.-29. listopada. Berlin, Njemačka. Str: 157

JAKOPOVIĆ, M., L. BRČIĆ, **M. MIŠIĆ**, F. SEIWERTH, G. DRPA, B. ČUČEVIĆ, S. PLEŠTINA, M. ROGLIĆ, S. KUKULJ, S. SMOJVER-JEŽEK, S. SEIWERTH, M. SAMARŽIJA (2016): Rates of EGFR, KRAS and ALK gene changes in lung cancer patients in Croatia. ASCO Annual Meeting, 3.-7. lipnja. Čikago, SAD. J. Clin. Oncol. Str. xx.

JAKOPOVIĆ, M., L. BRČIĆ, **M. MIŠIĆ**, F. SEIWERTH, G. DRPA, B. ČUČEVIĆ, S. PLEŠTINA, S. KUKULJ, M. ROGLIĆ, S. SMOJVER-JEŽEK, N. CHALFE, S. SEIWERTH, Z. JANEVSKI, M. SAMARŽIJA (2015): Non-Small Cell Lung Cancer Mutation Analysis in Purely Caucasian Croatian Population. 2015: -708. 16th World Conference on Lung Cancer, 6.-9. rujna. Denver, SAD. J. Thorac. Oncol. Str. 708.

TIŠLJAR, M., N. JOVANOVIĆ MILOŠEVIĆ, Ž. GRABAREVIĆ, **M. MIŠIĆ**, V. SAVIĆ, B. ARTUKOVIĆ, P. DŽAJA, T. AMŠEL ZELENKA, S. SEIWERTH, K. SEVERIN, S. SEMPLE-ROWLAND (2014): Are poultry and other birds sufficiently represented as animal models in biomedical research of some human diseases in Croatia? 2nd Symposium of Croatian Laboratory Animal Science Association (CroLASA), with international participation – Experimental animals in scientific research, 10. listopada. Zagreb, Hrvatska. Str. 110-111.