

MALDI-TOF analiza peptidoma stolice

Firić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:302826>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Martina Firić

MALDI-TOF ANALIZA PEPTIDOMA
STOLICE

Diplomski rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Martina Firić

MALDI-TOF ANALIZA PEPTIDOMA
STOLICE

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Rad je ostvaren u: Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Osijek

Mentor rada: doc. dr. sc. Dario Mandić, mag. med. biochem.

Rad ima 32 lista, 10 tablica i 3 slike.

Želim se zahvaliti mentoru doc. dr. sc. Dariju Mandiću, mag. med. biochem. na pruženoj prilici za suradnju, stručnom vodstvu i pomoći.

Također zahvaljujem gđi Sandi Grgić, stručnom referentu za studentska pitanja Medicinskog fakulteta Osijek na brojnim savjetima i odgovorima na moje upite.

Zahvaljujem se mojoj obitelji, dečku i prijateljima koji su bili tu za mene i u dobrim i lošim vremenima.

Hvala svima!

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Upalne bolesti crijeva	1
1.2. Biljezi za dijagnostiku upalnih bolesti crijeva	2
1.3. Spektrometrija masa i MALDI-TOF	4
2. HIPOTEZA	5
3. CILJEVI	6
4. ISPITANICI I METODE	7
4.1. Ustroj studije	7
4.2. Ispitanici	7
4.3. Metode	7
4.3.1. ZipTip protokol.....	8
4.3.2. MALDI-TOF analiza.....	9
4.4. Statističke metode	9
5. REZULTATI.....	10
5.1. Maseni spektri	10
5.2. Frekvencije pojavljivanja karakterističnih peptida	13
5.3. Statistički značajne razlike u pojavnosti određivanih peptida između ispitivanih skupina.....	20
6. RASPRAVA.....	21
7. ZAKLJUČAK	26
8. SAŽETAK.....	27
9. SUMMARY	28
10. LITERATURA.....	29
11. ŽIVOTOPIS	32

POPIS KRATICA

AAT	alfa 1-antitripsin (engl. <i>Alpha-1 antitrypsin</i>)
ACN	acetonitril (engl. <i>Acetonitrile</i>)
CD	Chronova bolest (engl. <i>Crohn's disease</i>)
CRP	C-reaktivni protein
ESI	elektroaspršenje (engl. <i>Electrospray ionization</i>)
fCal	fekalni kalprotektin (engl. <i>Faecal calprotectin</i>)
HCCA	α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina (engl. <i>α cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>)
IBD	upalne bolesti crijeva (engl. <i>Inflammatory bowel disease</i>)
MALDI	matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (engl. <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MMP-9	matriksna metalopeptidaza 9 (engl. <i>Matrix metalloproteinase 9</i>)
MS	masena spektrometrija
TFA	trifluoroctena kiselina (engl. <i>Trifluoroacetic acid</i>)
TNF- α	faktor nekroze tumora alfa (engl. <i>Factor de necrosis tumoral alfa</i>)
TOF	analizator vremena leta (engl. <i>ToF – Time of Flight</i>)
UC	ulcerozni kolitis (engl. <i>Ulcerative colitis, UC</i>)

1. UVOD

1.1. Upalne bolesti crijeva

Upalne bolesti crijeva (engl. *Inflammatory bowel disease*, IBD), karakterizirane upalom gastrointestinalnog trakta, kao što su Chronova bolest (engl. *Crohn's disease*, CD) i ulcerozni kolitis (engl. *Ulcerative colitis*, UC) sve su zastupljeniji problem u populaciji. Upala i remisije praćene su izlučivanjem brojnih citokina i kemokina koji se mogu pronaći u sluznici crijeva. Ukoliko se kod bolesnika ne može definirati je li to neka od prethodno navedenih dviju bolesti, koristimo termin neklasificirana upalna bolest koja obuhvaća oko 10 % bolesnika koji boluju od upalnih bolesti crijeva. U ovaj termin uvrstavamo i kronični kolitis budući da se točna dijagnoza ne može odrediti čak ni nakon višestrukih kolonoskopija (1, 2, 3). Značajne varijacije upalnih bolesti crijeva diljem svijeta jedan su od uzroka što patologija ovih bolesti još nije do kraja objašnjena, a budući da incidencija i prevalencija rastu, sve se više ukazuje i na pojavu globalne bolesti (4). Brojni okolišni čimbenici kao što su pušenje, oralni kontraceptivi, infekcije te prehrana mogu uz genske mutacije uzrokovati upalu u bilo kojem dijelu probavnog sustava, od usne šupljine do anusa (5). Terapijske preporuke zahtijevaju dobro poznavanje tijeka bolesti te komplikacija koje su uslijedile nakon pojave simptoma, a sama dijagnoza može se postaviti i nakon nekoliko godina od pojave simptoma (2, 6).

Pojava UC-a u mlađoj životnoj dobi, tj. do 16-te godine života nema dobru prognozu jer se upravo mlada dob povezuje s težim oblicima bolesti. UC ovisi o intenzitetu upale sluznice u debelom crijevu do rektuma te se očituje rektalnim krvarenjem odnosno krvavim stolicama s primjesama sluzi i gnoja. Značajna upala cijele širine stijenke crijeva te proljev, bol u trbuhu i gubitak na težini kao najčešći simptomi, karakteristični su za CD. Bolest koja je raširena na manje od 30 cm crijeva odnosi se na lokaliziranu CD, dok ekstenzivnu CD opisuje proširenost na više od 100 cm crijeva (1).

Uz postavljanje dijagnoze, potrebno je definirati fenotip bolesti, otkriti koliko se bolest proširila te pratiti dolazi li do kutanih, muskuloskeletnih, hematoloških i brojnih drugih manifestacija koje su zastupljene kod manje od polovice oboljelih. Često se javlja periferna i aksijalna artropatija, pyoderma gangrenosum, uveitis, primarni sklerozirajući kolangitis te tromboembolije (1). Kako bi dijagnosticirali bolest te utvrdili njezin stadij koristimo se raznim pretragama. Rutinske dijagnostičke pretrage uključuju osnovne laboratorijske upalne biljege

kao što su sedimentacija eritrocita, C-reaktivni protein (CRP) te fibrinogen. Još prije 40-ak godina ustanovljeno je da su upravo sedimentacija eritrocita i CRP jako korisni u razlikovanju zaraznih bolesti od funkcionalnih poremećaja. Uz laboratorijske pretrage za dijagnostiku se koriste i endoskopske, radiološke i patohistološke analize koje su pokazale veću učinkovitost od serumskih biljega (5, 7). Terapiju koja će djelovati te koja će omogućiti i održati odsutnost aktivnosti bolesti treba uključiti čim se bolest primijeti. Cilj terapije je postići mukozno cijeljenje, odnosno obnavljanje uloge crijevnog epitela, što bi značilo postavljanje prepreke bakterijama fiziološke flore da prelaze u sluznicu i submukozu, tj. ono treba biti inicijalni događaj u sprječavanju pojave upale u dubljim slojevima crijevne stijenke (1).

1.2. Biljezi za dijagnostiku upalnih bolesti crijeva

Postoji šest značajki koje trebaju imati dijagnostički biljezi. Optimalno bi trebali biti minimalno neugodni za pacijenta pri njihovom prikupljanju, standardizirani, ponovljivi te bi trebali biti dostupni u najkraćem mogućem roku. Oni su zapravo mjerljivi parametri koji ukazuju na promjene stanja organizma (8). Pomoću njih možemo uočiti genetsku sklonost pojedinca za razvitak karakteristične bolesti, pratiti tijek bolesti i metabolizam lijekova (5). Kao laboratorijski uzorak izbora koristi se uzorak stolice budući da sadrži više intestinalnih biomarkera od uzorka krvi. Biljezi koji se koriste u rutini radi otkrivanja upalnih procesa kao što su CRP, sedimentacija eritrocita, broj leukocita i trombocita kod upalnih bolesti crijeva imaju svoja ograničenja te su nedovoljno specifični i osjetljivi za dijagnostiku upalnih bolesti crijeva (4).

Biljeg o kojem se najviše zna, CRP, javlja se kada se pojavi upalni proces bilo gdje u organizmu što pokazuje njegovu nespecifičnost za pojedina tkiva. Pronalazimo ga u krvnoj plazmi, a proizvode ga hepatociti, stanice jetre (8).

Koncentracija fekalnog kalprotektina (fCal) proporcionalna je jačini upale koja se događa u sluznici gastrointestinalnog sustava. Fekalni kalprotektin se, kao trenutno najznačajniji upalni biljeg crijeva, iako nedovoljno specifičan i osjetljiv za dijagnozu, koristi za razlikovanje upalnih bolesti crijeva od sindroma iritabilnog crijeva kao i za praćenje tijeka upalnih bolesti crijeva (3, 7, 8, 10).

Alfa 1-antitripsin (AAT) je reaktant akutne faze sintetiziran od strane leukocitne loze, neutrofila i monocita te makrofaga i jetre. Proizvode ga stanice koje se nalaze na dnu kripti sluznice tankog crijeva nazvane Panethove stanice, a ima zaštitnu ulogu nakon oštećenja

crijevnog epitela prouzročeno upalnim procesom. Njegova ekskrecija je mjerilo koliko je serumskih proteina probilo u lumen crijeva, tj. ukazuje nam na propusnost sluznice koja može biti posljedica celijakije, raznih alergija i infekcija (8, 10).

Protein koji veže željezo, laktoferin, pronalazimo u različitim sekretornim tekućinama kao što je mlijeko kojeg luče stanice dojke, slina i nazalni sekret. Kod osoba se oslobađa kada se aktiviraju granulociti te u stolici kada je već došlo do značajne upale (8, 10).

Noviji biljezi kao matriksna metalopeptidaza 9 (MMP-9) i faktor nekroze tumora alfa (TNF- α) povisuju se tijekom procesa upale u urinu, stolici i krvi te se mogu koristiti u kontroli upalnih bolesti crijeva, a budući da su razine povišene i kod drugih bolesti kao što je npr. reumatoidni artritis, ovi biljezi se ne mogu koristiti za postavljanje same dijagnoze upalnih bolesti crijeva. Također, pomoću MMP-9 možemo diferencirati UC od neupalnih bolesti crijeva te ona pokazuje jaču povezanost s UC-om (3, 11, 12).

U traženju novih, korisnijih markera upalnih bolesti crijeva koriste se između ostalih tehnike genskog profiliranja ekspresije mikroRNA mononuklearnih stanica u cirkulaciji, metabolomika, proteomika te karakterizacija crijevne mikrobiote u kojoj se može pronaći najveći, najraznovrsniji broj različitih mikroorganizama koji se nalaze posvuda u ljudskom mikrobiomu. Uočeno je da do upalnog procesa dovodi manja količina bakterija koje se uobičajeno nalaze u probavnom sustavu, odnosno da dolazi do naznaka bolesti ukoliko se promijeni crijevna mikroflora (3, 5, 13).

Termin „peptidom“ odnosi se na skup fragmentiranih peptida koji čini strukturu sastavljenu od najmanje dvije aminokiseline međusobno povezane peptidnim vezama te tako čine strukturu proteina (14, 15). Proteomika, odnosno znanstvena disciplina koja proučava proteine koji se mogu pronaći u stanicama ili tkivu, kao svoj cilj opisuje sveobuhvatan opis ekspresije proteina i primjenu tog istog proteina pod različitim utjecajem bioloških poremećaja (9). S druge strane, završetak analize humanog genoma (The Human Genome Project) omogućio je mogućnost lokacije svih pronađenih gena u našoj genskoj strukturi te se ukazala prilika za detaljniju identifikaciju peptida. Peptidomski pristup istovremeno identificira i sve moguće eksprimirane peptide uključujući i posttranslacijske modifikacije peptida (16). Nedavna istraživanja pomogla su u potrazi za novim biljezima koji će pobliže objasniti aktivnost upalnih bolesti crijeva kao i diferencijaciju UC-a od CD-a (5).

1. 3. Spektrometrija masa i MALDI-TOF

Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je fizikalna metoda određivanja molekulske mase analiziranog iona pomoću omjera njegove mase i naboja (m/z). MS se može koristiti za određivanje izotopnog omjera atoma u uzorku, njegovog elementarnog sastava te kvalitativnog i kvantitativnog sastava smjese. Osnovne komponente masenog spektrometra su sonda za ionizaciju molekula uzorka, dio za separaciju i razlikovanje nastalih iona prema m/z svojstvima te dio za detekciju. Ionizacija se može vršiti u plinovitom, tekućem ili čvrstom stanju (17). Za ionizaciju uzoraka u čvrstom stanju najčešće se koristi MALDI (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization*), odnosno matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija kojom se ioniziraju termolabilne, nehlapljive makromolekule (17). Pomoću „mekane“ tehnike ionizacije (engl. *soft ionization*) kao što je MALDI, puno teže dolazi do fragmentacije same molekule, što može smanjiti količinu izvornih molekula i otežati analizu (18). Uzorak koji se želi analizirati pomoću MALDI metode priprema se tako da se pomiješa ili presvuče otopinom organskog spoja zvanog matriks s kojom kokristalizira. Uzorak prožet matricom ionizira se laserskom zrakom koja pomaže u transferu energije prema molekulama uzorka. Tako prenesena energija lasera stvara oblak iona koji primjenom električnog polja ulaze u maseni spektrometar. Varijanta spektrometra masa visoke rezolucije nazvana TOF (engl. *TOF – Time of Flight*) ili „analizator vremena leta“ najčešće se kombinira s MALDI načinom ionizacije. TOF metodom određuje se vrijeme potrebno da ioni prijeđu točno određenu duljinu cijevi od ulaza u MS do detektora. Nakon ubrzavanja iona kroz električno polje na različitu brzinu pri stalnoj kinetičkoj energiji, ioni dolaze do detektora i razlikuju se prema vremenu prolaska ili „leta“ (19, 20, 21). Brzina je obrnuto proporcionalna masi te ioni manje molekulske mase brže dolaze do detektora, a razdvajanje se događa na temelju omjera mase i naboja (m/z) ioniziranih atoma ili molekula (22). Kombinacija prethodno navedenih tehnika (MALDI-TOF-MS) omogućuje ionizaciju i maseno-spektrometrijsku analizu različitih vrsta uzoraka i analita te je stoga vrlo prikladna za analizu bioloških uzoraka. Budući da se MALDI-TOF tehnikom mogu ionizirati i analizirati analiti vrlo male molekulske mase, jedna od primjena MALDI-TOF tehnike u biomedicini i kliničkom laboratoriju je identifikacija mikroorganizama pomoću karakterističnog peptidoma/proteoma kultura stanica mikroorganizama. Iako je nabava početne opreme, odnosno uređaja skupa, sama metoda je naposljetku ekonomična (19, 23, 24).

2. HIPOTEZA

Analizom peptidnog sadržaja stolice moguće je razlikovati peptidom stolice osobe s upalnom bolešću crijeva od peptidoma stolice zdrave osobe te je moguće razlikovati peptidom stolice bolesnika s ulceroznim kolitisom od peptidoma stolice bolesnika s Chronovom bolešću.

3. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) usporediti prisutnost specifičnih peptida u stolici bolesnika s upalnom bolešću crijeva (ulcerozni kolitis i Chronova bolest) sa stolicom osobe koja nema upalnu bolest crijeva te
- 2) ispitati postoji li statistički značajna razlika u prisutnosti pojedinih peptida u stolici bolesnika koji bi omogućili diferenciranje bolesnika s ulceroznim kolitisom i Chronovom bolešću.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno kao presječna studija u kojoj su korišteni uzorci pacijenata oboljelih od Chronove bolesti, ulceroznog kolitisa te zdravi kontrolni uzorci. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku Medicinskog fakulteta Osijek (KLASA: 602-04/22-08/02; URBROJ: 2158-61-46-22-164).

4.2. Ispitanici

Za istraživanje se koristilo deset ostatnih uzoraka stolice oboljelih od Chronove bolesti i deset uzoraka stolice bolesnika oboljelih od ulceroznog kolitisa prvotno korištenih za izradu rutinskih laboratorijskih analiza bolesnika (fekalni kalprotektin) te deset uzoraka prikupljenih od zdravih kontrola. Dijagnoza UC-a i CD-a kod bolesnika potvrđena je klinički i u stolicama bolesnika je rutinski određena vrijednost fekalnog kalprotektina u laboratoriju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek (KZLD). Vrijednosti kalprotektina veće od 50 µg/g smatrane su pozitivnim, odnosno ukazivale su na prisutnu aktivnu upalnu bolest crijeva. Ostatni uzorci stolice bolesnika anonimizirani su od strane mentora i dio ostatnih uzoraka iskorišten je za izradu analize peptidoma uz dopuštenje i suglasnost predstojnika KZLD. Istraživanje je provedeno u skladu sa svim važećim primjenjivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom istraživanju, uključujući osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 150/08, 71/10, 139/10, 22/11, 84/11, 154/11, 12/12, 35/12, 70/12, 144/12, 82/13, 159/13, 22/14, 154/14) i Zakon o zaštiti prava pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04, 37/08). Uzorci stolice zdravih kontrola su uzorci osoba koje nemaju nikakve simptome upalnih bolesti crijeva niti probavne tegobe, a prikupljeni su od strane ispitanice, mentora i članova njihovih obitelji koji su upoznati sa svrhom istraživanja i načinom korištenja prikupljenih uzoraka i potpisali su informirani pristanak.

4.3. Metode

Uzorci stolice pripremani su na sljedeći način: uzorak od otprilike 100 µg stolice resuspendiran je s istom količinom ultračiste vode (Water for HPLC, Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, USA), vorteksiran 5 minuta te centrifugiran 30 minuta na 15000xg. Supernatant je smrznut i čuvan u hladnjaku na -80°C do analize. Prije daljnje obrade, smrznuti uzorak bi se odmrznuo 15 minuta u inkubatoru na 37°C. Nakon toga, uzorak bi se vorteksirao nekoliko minuta i ponovno centrifugirao 30 minuta na 15000xg. Supernatant (50 µl) je pomiješan s 50 µl acetonitrila (ACN; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) u omjeru 1:1 te je ostavljen da se inkubira na sobnoj temperaturi oko 30 minuta. Tijekom inkubacije uzorak bi se vorteksirao svakih deset minuta. Uzorak je ponovno centrifugiran, ovaj put 15 minuta na 20000xg. Supernatant je dalje stavljen pod blagi protok dušika kako bi se upario. Gotovo do kraja uparen uzorak resuspendiran je u 30 µl 0,1 % trifluoroctene kiseline (TFA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i dalje diluiran u omjeru 1:5 s 0,1 % TFA.

4.3.1. ZipTip protokol

Za uklanjanje nečistoća i odsoljavanje koristili su se ZipTip C₁₈ P-10 (ZipTip; Millipore, Billerica, MA) nastavci prema protokolu proizvođača. ZipTip je praktični nastavak za mikrolitarsku automatsku pipetu koji omogućava brzo i točno pročišćavanje mikrolitarskih količina uzoraka. Na vrhu ZipTip nalazi se sloj kromatografskog medija (smole) koji je namijenjen za ukoncentriravanje i pročišćavanje različitih analita (peptida, proteina ili oligonukleotida). Korišteni su ZipTip nastavci koji sadrže medije reverzne faze C₁₈ za purifikaciju peptida i proteina male molekulske mase. Prvi korak u pripremi ZipTip nastavka je ovlaživanje smole. Koristeći volumen od 10 µl, dva puta je aspirirana i otpuštena u otpad otopina za vlaženje (engl. *wetting solution*). Zatim, isto je ponovljeno s otopinom za kondicioniranje (engl. *equilibration solution*). Sljedeći korak je vezanje peptida za smolu. U ovom koraku, peptide vežemo za smolu tako da se tri do deset puta aspirira i otpusti oko 4 µl uzorka koji se želi pročitati. Nakon toga, aspirira se i otpusti u otpad otopina za ispiranje (engl. *wash solution*) najmanje dva puta. Zadnji korak je elucija peptida, odnosno oslobađanje sa smole u nastavku mikropipete. U ZipTip nastavku aspirira se 3 µl, otopine za ispiranje (engl. *elution solution*) i otpusti u čistu epruveticu te se otopina koju smo otpustili još dva puta aspirira i otpusti u epruveticu. Ovaj korak mora se vrlo brzo odraditi kako uzorak ne bi došao u kontakt sa zrakom. Osnovna svrha ZipTip pročišćavanja u našem istraživanju je prvenstveno uklanjanje soli iz uzorka budući da soli mogu jako prigušiti i smanjiti MALDI ionizaciju uzorka i time značajno smanjiti razinu maseno-spektrometrijskog signala.

4.3.2. MALDI-TOF analiza

Pročišćeni peptidni ekstrakti (2 μ l) pomiješali bi s 2 μ l otopine masene koncentracije 5 g/L α -cijano-4-hidroksicimetne kiseline (HCCA - MALDI matrica; Bruker Daltonics, Bremen, Germany) pripremljene prema uputama proizvođača. Nakon toga, 1 μ l te smjese nanijeli bi u duplikatu na MSP 384 MALDI pločicu od nehrđajućeg čelika (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Daljne analize odvijale su se na MALDI-TOF/TOF spektrometru masa Bruker UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Maseno-spektrometrijska analiza se radila u pozitivnom reflektromodu u rasponu od 1000 do 4000 m/z. Analizirano je 15000 točaka po spotu koji su sumirani i dobiven je karakteristični spektar masa. Kalibracija masa u rasponu od 1000-3500 Da prije analiza odrađena je korištenjem Bruker Peptide Calibration Standard (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Dobiveni signali peptida su se uzimali u obzir za daljnju obradu ukoliko je omjer signala i šuma (signal-to-noise ratio (S/N)) bio veći od 3.

4.4. Statističke metode

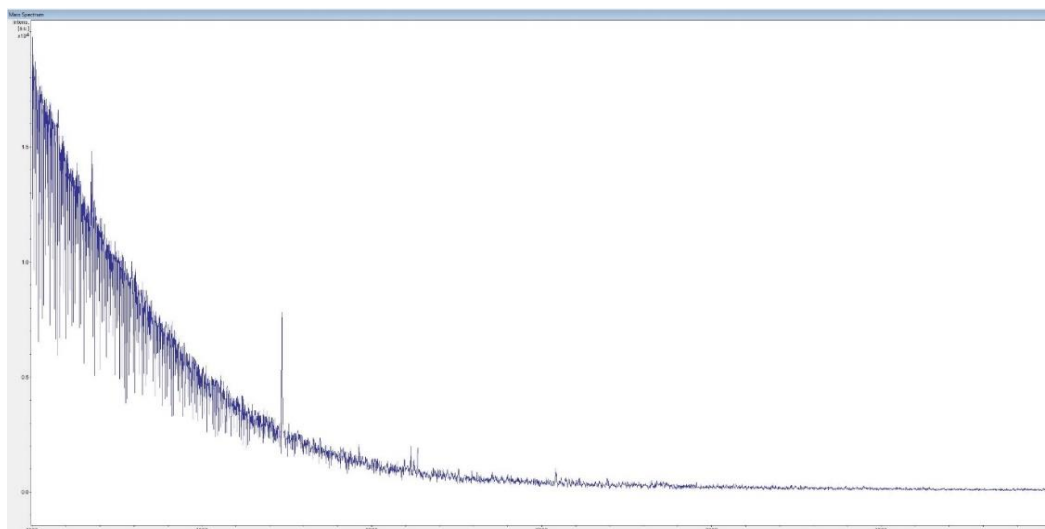
Rezultati su prikazani kao frekvencija pojavljivanja određenih peptida u uzorcima. Razlike između skupina ispitane su hi-kvadratom. Razina značajnosti postavljena je na $P < 0,05$. Obrada podataka obavila se pomoću programa Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) te statističkog programa R za Windows operativne sustave, verzija R-4.2.1 (R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

5. REZULTATI

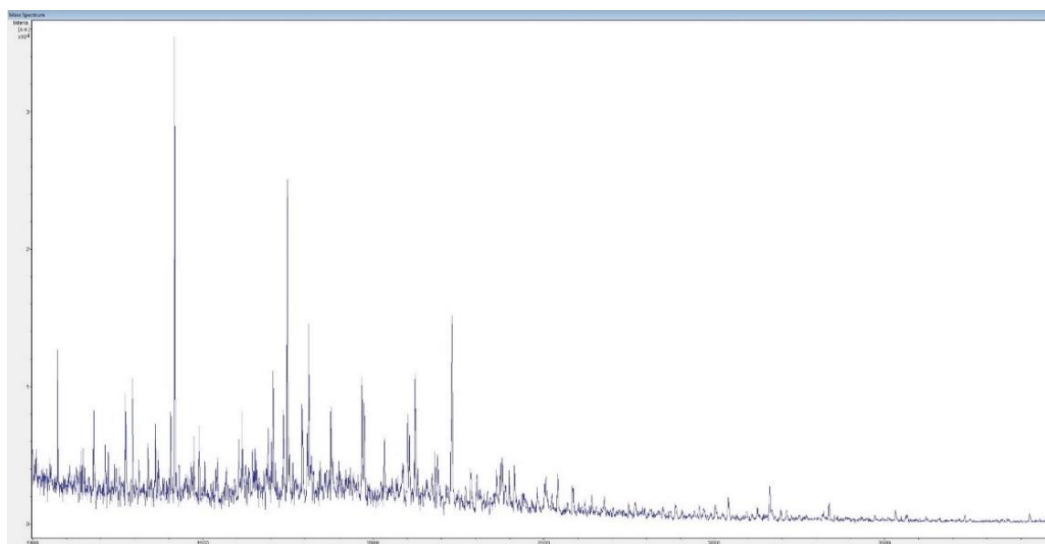
U svrhu izrade ovog rada analizirano je deset uzoraka zdravih kontrola, deset uzoraka bolesnika s ulceroznim kolitisom te deset uzoraka bolesnika s Chronovom bolešću. Uspoređena je prisutnost specifičnih peptida u stolici bolesnika s upalnom bolešću crijeva sa stolicom osobe koja nema upalnu bolest crijeva te je ispitano postoji li statistički značajna razlika u prisutnosti pojedinih peptida u stolici bolesnika koji bi omogućili diferenciranje bolesnika s ulceroznim kolitisom i Chronovom bolešću. U prikupljanju uzoraka stolice potrebnih za ovaj rad sudjelovalo je 18 muškaraca i 12 žena (ukupno 30 osoba), a raspona godina za sve ispitanike iznosi 50,5, dok interkvartilni raspon godina za sve ispitanike iznosi 29,0 – 58,3. Za prikupljenih deset kontrolnih uzoraka, vrijednost medijana godina iznosi 52, a interkvartilni raspon 27,0 – 59,0. Medijan godina kod deset prikupljenih uzoraka bolesnika s ulceroznim kolitisom iznosi 47,0, a interkvartilni raspon 31,0 – 50,8, dok je medijan godina prikupljenih uzoraka bolesnika s Chronovom bolešću 51,5 s interkvartilnim rasponom 30,3 – 67,3.

5.1. Maseni spektri

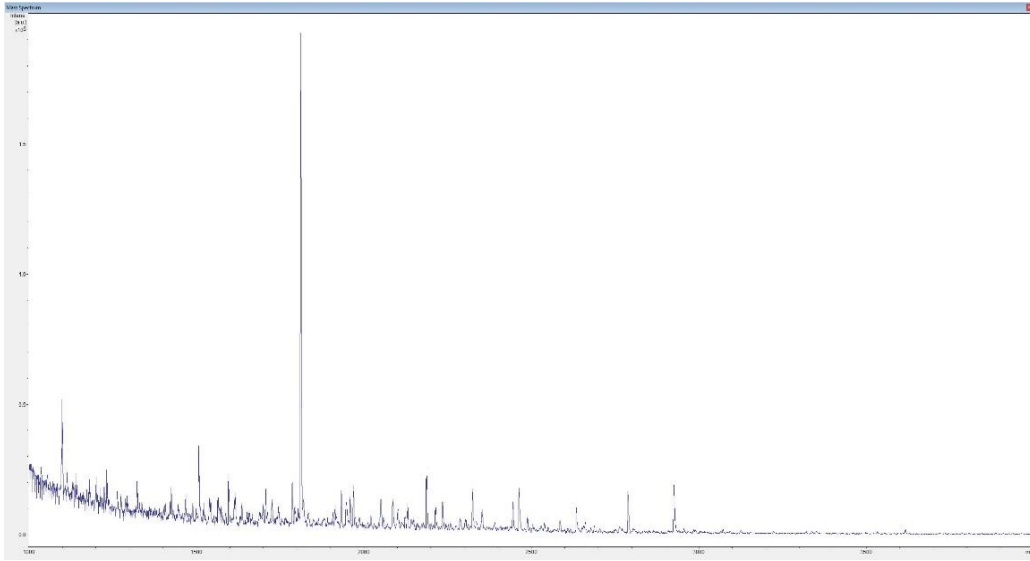
Slike 1, 2 i 3 prikazuju karakteristične masene spektre ekstrakta stolice uzoraka zdravih kontrola, uzoraka bolesnika s ulceroznim kolitisom i uzoraka bolesnika s Chronovom bolešću. Maseni spektri dobiveni su pomoću softverskog programa FlexAnalysis verzija 3.4 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).



Slika 1. Količina m/z signala peptida prikazana u karakterističnom masenom spektru ekstrakta stolice zdravih kontrolnih uzoraka (K).



Slika 2. Količina m/z signala peptida prikazana u karakterističnom masenom spektru ekstrakta stolice uzoraka bolesnika s ulceroznim kolitisom (UC).



Slika 3. Količina m/z signala peptida prikazana u karakterističnom masenom spektru ekstrakta stolice uzoraka bolesnika s Chronovom bolešću (CD).

Prethodne slike prikazuju masene spektre karakteristične za uzorke ispitivanih skupina. Uočava se velika razlika u količini m/z signala peptida između zdravih ispitanika i bolesnika oboljelih od upalnih bolesti crijeva.

5.2 Frekvencije pojavljivanja karakterističnih peptida

U ovom istraživanju uspoređivali smo pojavnost karakterističnih peptida među različitim skupinama naših uzoraka. Karakteristični peptidi, odnosno vrijednosti njihovih m/z signala preuzeti su iz istraživanja Basso i sur. koji su ih pronašli statističkom analizom pojavnosti peptida u rasponu 1000-4000 m/z u skupinama zdravih ispitanika i oboljelih od IBD (derivacijska studija) te su ih testirali na novoj skupini zdravih ispitanika i oboljelih od IBD-a (validacijska studija). Tablice 1 - 6 prikazuju m/z vrijednosti signala karakterističnih peptida koji su dobiveni MALDI-TOF analizom u istraživanju Basso i sur (3). Otkrili su 12 peptida karakterističnih za kontrolne uzorke (C) (Tablica 1) te 79 peptida karakterističnih za kontrolne i uzorke oboljelih od IBD-a (C+S) (Tablica 2), odnosno to su peptidi koji se najčešće pojavljuju u zdravih kontrola te u oboljelih od IBD.

Tablica 1. Signali peptida karakteristični za kontrolne zdrave uzorke (vrijednosti mase i naboja (m/z)) dobiveni u istraživanju Basso i sur. (3).

C (m/z)	1174,4; 1354,5; 1404,6; 1661,7; 1781,7; 1846,9; 1862,6; 2053,1; 2320,2; 2902,5; 3218,2; 3262,5
-----------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------

C, peptidi karakteristični za kontrolne uzorke prema Basso D i sur. (3).

Tablica 2. Signali peptida karakteristični za kontrolne uzorke i uzorke oboljelih od upalnih bolesti crijeva (vrijednosti mase i naboja (m/z)) dobiveni u istraživanju Basso i sur. (3).

C+S (m/z)	1010,3; 1076,4; 1103,5; 1105,4; 1143,5; 1153,4; 1181,5; 1213,5; 1232,5; 1291,4; 1338,5; 1416,7; 1427,6; 1464,6; 1470,7; 1477,7; 1489,7; 1506,6; 1538,5; 1564,5; 1568,7; 1592,7; 1595,7; 1615,7; 1635,6; 1696,7; 1744,7; 1747,8; 1763,7; 1835,8; 1858,8; 1870,7; 1881,9; 1883,9; 1894,7; 1895,9; 1917,9; 1921,8; 1945,9; 2021,7; 2051,9; 2068,9; 2079,1; 2102; 2118,9; 2134,9; 2176,9; 2190,9; 2249,2; 2271,9; 2302,9; 2398,8; 2435,9; 2541; 2585,1; 2659,2; 2677,2; 2856; 2924,4; 3040,1; 3058,3; 3073,2; 3214,2; 3360,2; 3446,2; 3620,3; 3766,4; 2902,5; 2924,4; 3040,1; 3058,3; 3073,2; 3214,2; 3218,2; 3262,5; 3360,2; 3446,2; 3620,3; 3766,4
-------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

C+S, peptidi karakteristični za kontrolne uzorke i uzorke oboljelih pacijenata prema Basso D i sur. (3).

Zatim, pronađeno je 38 peptida koji su pokazali statistički najznačajnijima za dijagnozu bolesti kod bolesnika s IBD-om (Dg Pept) i nisu se pojavljivali kod zdravih kontrola (Tablica 3).

Tablica 3. Signali peptida najznačajnijih dijagnostičkih peptida (vrijednosti mase i naboja (m/z)) dobiveni u istraživanju Basso i sur. (3).

Dg Pept (m/z)	1035,4; 1099,4; 1121,5; 1263,6; 1267,6; 1286,6; 1293,6; 1294,5; 1323,5; 1329,5; 1366,7; 1367,8; 1376,7; 1405,6; 1419,6; 1428,6; 1466,7; 1639,8; 1693,7; 1697,8; 1724,7; 1773,9; 1805,7; 1810,8; 1863,8; 1957,8; 2020; 2096,8; 2171,9; 2185,9; 2212,8; 2228,1; 2282,1; 2315,9; 2342,9; 2529; 2934,4; 3821,8
----------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Dg Pept, najznačajniji dijagnostički peptidi prema Basso D i sur. (3).

U uzorcima oboljelih od ulceroznog kolitisa pronađeno je 271 peptid (UC Pept) (Tablica 4), a pronađeno je i 246 peptida karakterističnih za bolesnike s Chronovom bolešću (CD Pept) (Tablica 5).

Tablica 4. Signali peptida karakteristični za uzorke oboljelih od ulceroznog kolitisa (vrijednosti mase i naboja (m/z)) dobiveni u istraživanju Basso i sur. (3).

UC Pept (m/z)	1010,3; 1019,5; 1048,5; 1049,4; 1070,5; 1073,5; 1085,4; 1093,5; 1096,4; 1098,5; 1103,5; 1105,4; 1108,5; 1117,5; 1121,5; 1127,5; 1143,5; 1148,6; 1153,4; 1166,5; 1169,6; 1177,4; 1181,5; 1186,7; 1192,5; 1195,5; 1198,6; 1202,7; 1203,5; 1210,5; 1213,5; 1216,8; 1224,5; 1230,8; 1232,5; 1234,8; 1239,6; 1248,7; 1249,5 1250,7; 1255,6; 1256,8; 1257,7; 1263,6; 1270,7; 1272,8; 1274,6; 1286,6; 1288,7; 1293,6; 1296,8; 1311,7; 1316,5; 1329,5; 1336,7; 1338,5; 1339,8; 1342,5; 1345,5; 1355,8; 1358,6; 1360,6; 1367,8; 1368,6; 1376,7; 1377,7; 1385,6; 1405,6; 1416,7; 1419,6; 1421,5; 1424,7; 1425,6; 1427,6; 1428,6; 1429,6; 1431,6; 1444,7; 1447,6; 1450,1; 1463,7; 1464,6; 1466,7; 1470,7; 1472,7; 1479,6; 1486,5; 1489,7; 1506,6; 1507,7; 1511,7; 1520,7; 1524,5; 1529,7; 1536,6; 1537,5; 1566,7; 1567,5; 1568,7; 1572,6; 1576,7; 1587,7; 1592,7; 1595,7; 1599,8; 1612,6; 1615,7; 1617,8; 1619,7; 1620,7; 1623,7; 1635,6; 1639,8; 1646,7; 1647,7; 1665,7; 1669,7; 1676,6; 1696,7; 1698,8; 1699,7; 1704,8; 1705,6; 1711,6; 1715,8; 1724,7; 1735,7; 1742,6; 1744,7; 1747,8; 1757,8; 1759,7; 1763,7; 1773,9; 1777,9; 1785,8; 1790,8; 1795,8; 1800,7; 1805,7; 1807,7; 1810,8; 1811,8; 1817,8; 1821,7; 1823,7; 1824,7; 1830,6; 1833,8; 1835,8; 1858,8; 1863,8; 1870,7; 1872,7; 1881,9; 1883,9; 1894,7; 1895,9; 1898,9; 1904,8; 1917,9; 1920,6; 1931,8; 1945,9; 1957,8; 1967,9; 1973,8; 1985,8; 1986,9; 1992,8; 2014,8; 2020,2 020,8; 2031,9; 2044,9; 2048,9; 2051,9; 2054,8; 2058,8; 2071,8; 2084,8; 2085,9; 2089,9; 2096,8; 2102; 2118,9; 2128,9; 2134,9; 2135,8; 2141,8; 2147,8; 2171,9; 2181,8; 2184,8; 2185,9; 2200,9; 2212,8; 2228,1; 2240,8; 2270,8; 2271,9; 2282,1; 2290,1; 2300,6; 2302,9; 2312,9; 2315,9; 2322,9; 2334,1; 2342,9; 2350,1; 2385,9; 2398,8; 2427,1; 2435,9; 2462; 2463,1; 2488,1; 2506,2; 2511,9; 2526,1; 2529; 2541; 2544; 2585,1; 2595; 2617; 2618,2; 2633; 2638,1; 2659,2; 2666,1; 2677,2; 2729,2; 2787,2; 2802,4; 2805,8; 2848,9; 2853; 2856; 2867,2; 2924,4; 2934,4; 2938,4; 2970,5; 3040,1; 3058,3; 3073,2; 3085,4; 3097,3; 3123,2; 3195,2; 3210,5; 3214,2; 3232,1; 3299,5; 3317,5; 3326,5; 3360,2; 3428,3; 3446,2; 3464,2; 3473,6; 3482,4; 3556,3; 3620,3; 3638,3; 3693,4; 3766,4; 3821,8; 3827,6
-----------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

UC Pept, peptidi karakteristični za ulcerozni kolitis prema Basso D i sur. (3).

Tablica 5. Signali peptida karakteristični za uzorke oboljelih od Chronove bolesti (vrijednosti mase i naboja (m/z)) dobiveni u istraživanju Basso i sur. (3).

CD Pept (m/z)	1002,3; 1006,4; 1029,5; 1030,5; 1035,4; 1048,5; 1051,8; 1055,4; 1059,5; 1062,4; 1071,4; 1073,5; 1087,5; 1096,4; 1098,5; 1099,4; 1108,5; 1113,4; 1117,5; 1121,5; 1134,5; 1137,5; 1139,5; 1148,6; 1160,4; 1161,5; 1166,5; 1172,4; 1179,5; 1189,4; 1192,5; 1195,5; 1200,6; 1203,5; 1208,5; 1210,5; 1216,8; 1247,5; 1255,6; 1263,6; 1267,6; 1270,7; 1272,8; 1274,6; 1286,6; 1293,6; 1294,5; 1298,5; 1303,5; 1311,7; 1312,5; 1313,4; 1317,7; 1322,8; 1323,5; 1329,5; 1339,8; 1358,6; 1360,6; 1362,5; 1366,7; 1367,8; 1368,6; 1370,6; 1376,7; 1378,6; 1381,6; 1405,6; 1407,5; 1409,6; 1419,6; 1421,5; 1424,7; 1428,6; 1429,6; 1432,6; 1444,7; 1447,6; 1450,1; 1465,7; 1466,7; 1472,7; 1478,5; 1485,5; 1486,5; 1487,7; 1492,8; 1493,6; 1494,7; 1507,7; 1522,6; 1523,6; 1529,7; 1540,7; 1563,7; 1572,6; 1587,7; 1596,7; 1605,8; 1612,6; 1617,8; 1623,7; 1634,6; 1639,8; 1640,6; 1646,7; 1659,7; 1665,7; 1680,8; 1682,8; 1685,8; 1687,8; 1691,7; 1693,7; 1697,8; 1698,8; 1699,7; 1702,8; 1704,8; 1705,6; 1711,6; 1721,8; 1724,7; 1735,7; 1740,7; 1742,6; 1746,7; 1757,8; 1773,9; 1785,8; 1790,8; 1795,8; 1802,8; 1805,7; 1806,8; 1810,8; 1811,8; 1821,7; 1830,6; 1833,8; 1863,8; 1873,8; 1877,9; 1898,9; 1912,9; 1920,6; 1925,9; 1931,8; 1934,6; 1947,9; 1957,8; 1958,6; 1967,9; 1972,8; 1973,8; 1981,8; 1985,8; 1997,9; 2005,8; 2010,6; 2020; 2020,8; ;2028,7 2030,7; 2040; 2048,9; 2058,8; 2085,9; 2096,8; 2099,9; 2100,9; 2121,8; 2125,8; 2128,9; 2147,8; 2171,9; 2172,9; 2184,8; 2185,9; 2189,8; 2212,8; 2224,1; 2225; 2228,1; 2230,1; 2233,8; 2244; 2282,1; 2317; 2322,9; 2329,8; 2334,1; 2342,9; 2350,1; 2372,8; 2377,9; 2383,9; 2385,9; 2411; 2426; 2427,1; 2428,1; 2443,1; 2451,1; 2462; 2463,1; 2479,1; 2501,1; 2506,2; 2529; 2535,1; 2544; 2607,2; 2617; 2618,2; 2645,3; 2714,4; 2766,3; 2787,2; 2802,4; 2847,2; 2853; 2906,1; 2934,4; 2970,5; 2981,2; 3008,3; 3103,3; 3136,3; 3140,4; 3147,3; 3210,5; 3313,3; 3379,3; 3394,7; 3430,3; 3464,2; 3465,2; 3526,1; 3618,3; 3733,8; 3821,8; 3827,6; 3930,9; 3959,1; 3975,1
----------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

CD Pept, peptidi karakteristični za Chronovu bolest prema Basso D i sur. (3).

Ukupni broj peptida koji su se pojavljivali kod svih bolesnika (Tablica 6), a koji su karakteristični za upalne bolesti crijeva (IBD Pept) iznosi 359, odnosno to su peptidi koji su se pojavljivali i u skupini oboljelih od UC-a i u skupini oboljelih od CD-a.

Za signale peptida dobivenih u našem istraživanju smatralo se da se podudaraju s karakterističnim signalima peptida Basso i sur. ukoliko je njihova m/z vrijednost bila unutar ± 0.6 od navedenih u istraživanju Basso i sur.

Tablica 6. Ukupni broj signala peptida karakterističnih za oboljele od upalne bolesti crijeva (vrijednosti mase i naboja (m/z)) dobiveni u istraživanju Basso i sur. (3).

IBD Pept (m/z)	<p>1002,3; 1006,4; 1019,5; 1029,5; 1030,5; 1035,4; 1048,5; 1049,4; 1051,8; 1055,4; 1056,6; 1059,5; 1062,4; 1068,6; 1070,5; 1071,4; 1073,5; 1085,4; 1087,5; 1093,5; 1096,4; 1098,5; 1099,4; 1108,5; 1113,4; 1117,5; 1121,5; 1127,5; 1132,5; 1134,5; 1137,5; 1139,5; 1148,6; 1160,4; 1161,5; 1166,5; 1169,6; 1172,4; 1177,4; 1179,5; 1186,7; 1189,4; 1192,5; 1195,5; 1198,6; 1200,6; 1202,7; 1203,5; 1208,5; 1210,5; 1216,8; 1224,5; 1230,8; 1234,8; 1239,6; 1247,5; 1248,7; 1249,5; 1250,7; 1255,6; 1256,8; 1257,7; 1263,6; 1267,6; 1270,7; 1272,8; 1274,6; 1286,6; 1288,7; 1293,6; 1294,5; 1296,8; 1298,5; 1303,5; 1311,7; 1312,5; 1313,4; 1316,5; 1317,7; 1322,8; 1323,5; 1329,5; 1336,7; 1339,8; 1342,5; 1345,5; 1355,8; 1358,6; 1360,6; 1362,5; 1366,7; 1367,8; 1368,6; 1370,6; 1376,7; 1377,7; 1378,6; 1381,6; 1385,6; 1389,8; 1393,8; 1405,6; 1407,5; 1409,6; 1419,6; 1421,5; 1424,7; 1425,6; 1428,6; 1429,6; 1431,6; 1432,6; 1444,7; 1447,6; 1450,1; 1463,7; 1465,7; 1466,7; 1472,7; 1478,5; 1479,6; 1485,5; 1486,5; 1487,7; 1492,8; 1493,6; 1494,7; 1507,7; 1511,7; 1520,7; 1522,6; 1523,6; 1524,5; 1529,7; 1536,6; 1537,5; 1540,7; 1563,7; 1566,7; 1567,5; 1572,6; 1576,7; 1587,7; 1596,7; 1599,8; 1605,8; 1612,6; 1617,8; 1619,7; 1620,7; 1623,7; 1634,6; 1639,8; 1640,6; 1646,7; 1647,7; 1652; 1659,7; 1665,7; 1669,7; 1676,6; 1680,8; 1682,8; 1685,8; 1687,8; 1691,7; 1693,7; 1697,8; 1698,8; 1699,7; 1702,8; 1704,8; 1705,6; 1711,6; 1715,8; 1721,8; 1724,7; 1735,7; 1740,7; 1742,6; 1746,7; 1757,8; 1759,7; 1773,9; 1777,9; 1785,8; 1790,8; 1795,8; 1800,7; 1802,8; 1805,7; 1806,8; 1807,7; 1810,8; 1811,8; 1817,8; 1821,7; 1823,7; 1824,7; 1830,6; 1833,8; 1863,8; 1872,7; 1873,8; 1877,9; 1898,9; 1904,8; 1912,9; 1920,6; 1925,9; 1931,8; 1934,6; 1938,8; 1947,9; 1957,8; 1958,6; 1967,9; 1972,8; 1973,8; 1981,8; 1985,8; 1986,9; 1992,8; 1997,9; 2005,8; 2010,6; 2014,8; 2020; 2020,8; 2028,7; 2030,7; 2031,9; 2040; 2044,9; 2048,9; 2054,8; 2058,8; 2071,8; 2084,8; 2085,9; 2089,9; 2096,8; 2099,9; 2100,9; 2121,8; 2125,8; 2128,9; 2135,8; 2141,8; 2147,8; 2171,9; 2172,9; 2181,8; 2184,8; 2185,9; 2189,8; 2195,9; 2200,9; 2212,8; 2224,1; 2225; 2228,1; 2230,1; 2233,8; 2240,8; 2244; 2270,8; 2282,1; 2290,1; 2300,6; 2312,9; 2315,9; 2317; 2322,9; 2324,4; 2329,8; 2334,1; 2342,9; 2350,1; 2372,8; 2377,9; 2383,9; 2385,9; 2411; 2426; 2427,1; 2428,1; 2443,1; 2451,1; 2462; 2463,1; 2479,1; 2488,1; 2501,1; 2506,2; 2511,9; 2526,1; 2529; 2535,1; 2544; 2595; 2607,2; 2617; 2618,2; 2633; 2638,1; 2645,3; 2650,2; 2666,1; 2714,4; 2729,2; 2766,3; 2787,2; 2802,4; 2805,8; 2847,2; 2848,9; 2853; 2867,2; 2906,1; 2934,4; 2938,4; 2970,5; 2981,2; 3008,3; 3085,4; 3097,3; 3103,3; 3123,2; 3136,3; 3140,4; 3147,3; 3195,2; 3210,5; 3232,1; 3299,5; 3313,3; 3317,5; 3326,5; 3379,3; 3394,7; 3428,3; 3430,3; 3464,2; 3465,2; 3473,6; 3482,4; 3526,1; 3556,3; 3618,3; 3638,3; 3693,4; 3733,8; 3821,8; 3827,6; 3930,9; 3942,7; 3959,1; 3975,1</p>
------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

IBD Pept, ukupni broj peptida karakterističnih za upalne bolesti crijeva prema Basso D i sur. (3).

U tablicama 7, 8 i 9 prikazane su frekvencije pojavljivanja karakterističnih peptida dobivenih analizom pripremljenih 30 uzoraka stolice na MALDI-TOF/TOF spektrometru masa Bruker UltrafleXtreme. Dobiveni peptidi promatrani su kod uzoraka kontrolne skupine, uzoraka skupine oboljelih od ulceroznog kolitisa i uzoraka skupine oboljelih od Chronove bolesti. Kod naših ispitanika, karakterističnih peptida za kontrolne uzorke (C) pronađeno je u 13 slučajeva, dok je peptida karakterističnih za kontrolne uzorke i uzorke oboljelih pacijenata (C+S) pronađeno u 259 slučajeva. Peptida karakterističnih za skupine oboljelih od upalnih bolesti crijeva, pronađeno je ukupno 176, tj. 66 karakterističnih peptida za ulcerozni kolitis (UC Pept) i 110 karakterističnih peptida za Chronovu bolest (CD Pept). Peptida koji pokazuju najveće dijagnostičko značenje za upalne bolesti crijeva pronađeno je 128 (Dg Pept), dok je ukupni broj pronađenih peptida koji su karakteristični za upalne bolesti crijeva 712 (IBD Pept).

Tablica 7. Frekvencija pojavljivanja karakterističnih peptida prema (3) u uzorcima kontrolne skupine (K).

	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7	K-8	K-9	K-10	
K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	UKUPNO
C	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
C+S	0	1	4	2	7	1	3	4	0	2	24
Dg Pept	0	0	1	0	2	1	1	0	0	0	5
UC Pept	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD Pept	1	0	1	0	1	1	4	1	0	0	9
IBD Pept	0	0	1	0	3	0	0	1	0	1	6

C, peptidi karakteristični za kontrolne uzorke; C+S, peptidi karakteristični za kontrolne uzorke i uzorke oboljelih pacijenata; Dg Pept, najznačajniji dijagnostički peptidi; UC Pept, peptidi karakteristični za ulcerozni kolitis; CD Pept, peptidi karakteristični za Chronovu bolest; IBD Pept, ukupni broj peptida karakterističnih za upalne bolesti crijeva prema Basso D i sur. (3).

Tablica 8. Frekvencija pojavljivanja karakterističnih peptida prema (3) u uzorcima bolesnika s ulceroznim kolitisom (UC).

	UC-01	UC-02	UC-03	UC-04	UC-05	UC-06	UC-07	UC-08	UC-09	UC-10	
UC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	UKUPNO
C	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	5
C+S	9	19	7	13	18	15	28	4	17	2	132
Dg Pept	5	9	4	5	7	7	16	4	6	1	64
UC Pept	0	4	3	7	7	4	6	3	2	1	37
CD Pept	4	4	7	8	8	4	3	0	0	2	40
IBD Pept	29	50	26	50	50	50	52	29	34	8	378

C, peptidi karakteristični za kontrolne uzorke; C+S, peptidi karakteristični za kontrolne uzorke i uzorke oboljelih pacijenata; Dg Pept, najznačajniji dijagnostički peptidi; UC Pept, peptidi karakteristični za ulcerozni kolitis; CD Pept, peptidi karakteristični za Chronovu bolest; IBD Pept, ukupni broj peptida karakterističnih za upalne bolesti crijeva prema Basso D i sur. (3).

Tablica 9. Frekvencija pojavljivanja karakterističnih peptida prema (3) u uzorcima bolesnika s Chronovom bolešću (CD).

	CD-01	CD-02	CD-03	CD-04	CD-05	CD-06	CD-07	CD-08	CD-09	CD-10	
CD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	UKUPNO
C	0	0	0	4	0	0	0	1	0	1	6
C+S	6	10	9	12	9	12	20	4	13	8	103
Dg Pept	5	4	2	4	8	10	12	3	9	2	59
UC Pept	2	8	3	7	0	2	1	2	1	3	29
CD Pept	3	5	4	10	5	7	10	5	7	5	61
IBD Pept	41	36	24	47	28	40	46	16	29	21	328

C, peptidi karakteristični za kontrolne uzorke; C+S, peptidi karakteristični za kontrolne uzorke i uzorke oboljelih pacijenata; Dg Pept, najznačajniji dijagnostički peptidi; UC Pept, peptidi karakteristični za ulcerozni kolitis; CD Pept, peptidi karakteristični za Chronovu bolest; IBD Pept, ukupni broj peptida karakterističnih za upalne bolesti crijeva prema Basso D i sur. (3).

5.3 Statistički značajne razlike u pojavnosti određenih peptida između ispitivanih skupina

Testirane su vrijednosti učestalosti pojave određenih karakterističnih peptida između skupina uzoraka kontrola u odnosu na skupinu oboljelih od ulceroznog kolitisa (K vs UC), skupine uzoraka kontrola u odnosu na skupinu oboljelih od Chronove bolesti (K vs CD), zatim skupine uzoraka kontrola u odnosu na ukupan broj bolesnika s upalnim bolestima crijeva (K vs CD+UC) te je testirano razlikuje li se učestalost pojavljivanja peptida po skupinama između skupina uzoraka bolesnika oboljelih od ulceroznog kolitisa i bolesnika oboljelih od Chronove bolesti (UC vs CD). U Tablici 10 su „bold“ slovima označene dobivene statički značajne razlike između skupina ($P < 0,05$).

Tablica 10. Tablica prikazuje P vrijednosti (P^*) između prikupljenih skupina uzoraka i određenih peptida karakterističnih za pojedine skupine.

	C	C+S	Dg Pept	UC Pept	CD Pept	IBD Pept
K vs UC	P = 0,4455	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001
K vs CD	P = 0,2883	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001
K vs CD+UC	P = 0,0139	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001
UC vs CD	P = 0,941	P = 0,0458	P = 0,6977	P = 0,3590	P = 0,0333	P = 0,0505

U tablici su „bold“ slovima označene dobivene vrijednosti statički značajne razlike ($P < 0,05$).

** Hi-kvadrat test*

K vs UC, skupina uzoraka kontrola u odnosu na oboljele od ulceroznog kolitisa; K vs CD, skupina uzoraka kontrola u odnosu na oboljele od Chronove bolesti; K vs CD+UC, skupina uzoraka kontrola u odnosu na oboljele od Chronove bolesti i ulceroznog kolitisa; UC vs CD, skupina uzoraka oboljelih od ulceroznog kolitisa u odnosu uzorke oboljelih od Chronove bolesti

C, peptidi karakteristični za kontrolne uzorke; C+S, peptidi karakteristični za kontrolne uzorke i uzorke oboljelih pacijenata; Dg Pept, najznačajniji dijagnostički peptidi; UC Pept, peptidi karakteristični za ulcerozni kolitis; CD Pept, peptidi karakteristični za Chronovu bolest; IBD Pept, ukupni broj peptida karakterističnih za upalne bolesti crijeva prema Basso D i sur. (3)

6. RASPRAVA

Cilj ovoga istraživanja bio je usporediti prisutnost specifičnih peptida u stolici bolesnika s upalnom bolešću crijeva sa stolicom osobe koja nema upalnu bolest crijeva te ispitati postoje li razlike u prisutnosti peptida kod bolesnika kako bi mogli diferencirati ulcerozni kolitis (UC) i Chronovu bolest (CD). Iako se za sada u otkrivanju upalnih bolesti crijeva koriste serumski i fekalni biljezi koji nam ukazuju na upalnu bolest, upravo su ti biljezi nedovoljno osjetljivi i nespecifični (3). Takvi biljezi ne omogućuju točno dijagnosticiranje upalnih bolesti crijeva kao ni razlikovanje ulceroznog kolitisa od Chronove bolesti. Stoga se provodi sve više istraživanja kojima je cilj pronaći nove, korisnije biljege upalnih bolesti crijeva.

Ovim istraživanjem u ukupno 30 uzoraka (10 kontrolnih uzoraka, 10 uzoraka oboljelih od UC-a te 10 uzoraka oboljelih od CD-a) pronađeni su peptidi podijeljeni u skupinu peptida karakterističnih za kontrolne uzorke (C) te skupinu peptida karakterističnih za uzorke kontrola i oboljelih (C+S). Osim ove dvije skupine, analizirani su i najznačajniji dijagnostički peptidi koji se najčešće koriste za razlikovanje uzoraka zdravih od uzoraka bolesnika oboljelih od IBD-a (Dg Pept), kao i peptidi koji su karakteristični samo za bolesnike od UC (UC Pept) te posebno peptidi karakteristični samo za bolesnike od CD (CD Pept). Analiziran je i ukupni broj peptida karakterističnih za upalne bolesti crijeva (IBD Pept).

Maseni spektri osoba oboljelih od upalnih bolesti crijeva, neovisno radi li se o UC-u ili CD-u, za razliku od kontrolnih uzoraka, pokazali su značajne količine m/z signala peptida. Nešto veći broj m/z signala uočljiv kod oboljelih od UC-a potvrđuje i veća učestalost pojavljivanja određenih peptida u uzorcima kod bolesnika s UC-om. Masena spektrometrija je još prije 40-ak godina pokazala svoju veliku učinkovitost kod analize proteina i peptida te se u praksi koristi u kombinaciji s raznim tehnikama ionizacije (25). Zbog mogućnosti tehnike MALDI-TOF MS da otkriva i kvantificira vrlo male količine proteina prikupljene iz bioloških tkiva ili tekućina, ova metoda se sve više primjenjuje u istraživanjima u medicini te isto tako sve više nalazi primjenu u kliničkoj proteomici i peptidomici (26). MALDI-TOF analiza korištena je pri analiziranju crijevnog mikrobioma, kao i pri otkrivanju prisutnosti okultne krvi. U istraživanju Lin SY i sur. MALDI-TOF tehnika korištena je za detekciju hemoglobina koji je imao ulogu biljega za okultnu fekalnu krv (27). Iako do sada ne postoji mnogo istraživanja koji su se služili MALDI-TOF spektrometrom masa radi proučavanja peptidoma stolice u nadi za identifikacijom novih biljega prisutnih u stolici, jedan od prijelomnih je rad Basso D i sur. Oni su pomoću fekalnog peptidomskog profiliranja pronašli minimalnu ili nikakvu pojavnost

količine m/z signala peptida u uzorcima stolice kontrolne, tj. zdrave skupine, a puno veću količinu m/z signala peptida uočili su kod masenog spektra CD-a i UC-a. U njihovom istraživanju među kontrolnim uzorcima pronađeni su i ravni maseni spektri (kod kojih nema nikakvih signala u masenom rasponu peptida), maseni spektri koji su prikazali peptide karakteristične samo za kontrole (C) i maseni spektri koji su prikazali peptide karakteristične i za kontrole i oboljele pacijente (C+S). U spektar IBD-a klasificirani su oni maseni spektri kod kojih se uočava minimalno jedan peptid koji je karakterističan za uzorke oboljelih od upalnih bolesti crijeva (IBD Pept). Basso i sur. ispitivali su mogu li karakteristični peptidi za upalne bolesti crijeva (IBD Pept) pomoći odrediti radi li se kod ispitanika o ulceroznom kolitisu ili Chronovoj bolesti. IBD spektri razvrstani su u grupu IBD-UC spektra ukoliko su pronađeni peptidi karakteristični samo za ulcerozni kolitis (UC Pept), odnosno u grupu IBD-CD spektra ukoliko su pronađeni peptidi karakteristični samo za Chronovu bolest (CD Pept). Pomoću ove klasifikacije spektara potvrđeno je da su IBD-UC spektri značajno povezani s ulceroznim kolitisom, kao što su i IBD-CD spektri značajno povezani s Chronovom bolešću te se pomoću njih može odrediti prisutnost UC-a, odnosno CD-a.

Frekvencija pojavljivanja određenih peptida u uzorcima kod kontrolne skupine (K), ukazuje na nepojavnost bilo kojih karakterističnih peptida u jednom od deset kontrolnih uzoraka, dok se u ostalih devet uzoraka može pronaći minimalno jedan karakteristični peptid. Ovakvi „čisti“ uzorci pronađeni su i u već prethodno navedenom radu (Basso D i sur.). U tom istraživanju korišteno je više uzoraka što je omogućilo detaljniju analizu. Pronašli su da u 38 % uzoraka kontrolne grupe nije uočen niti jedan peptid, što bi značilo da se u ostalih 21/34 kontrolnih ispitanika pojavio minimalno jedan peptid koji je karakterističan za kontrolne uzorke i uzorke oboljelih pacijenata.

Peptida karakterističnih za kontrolne uzorke (C) kod skupine zdravih uzoraka ima samo 2, što je nešto manje od istih tih promatranih peptida (C) kod oboljelih od IBD-a kojih ukupno ima 11. Razlika između skupine kontrola u odnosu na skupinu oboljelih od CD-a i UC-a (K vs CD+UC), statistički je i potvrđena hi-kvadrat testom što nam ukazuje na mogućnost razlikovanja zdravih osoba od IBD oboljelih osoba proučavajući samo peptide karakteristične za kontrolne uzorke (C), ali to je u praksi teško provedivo budući da se isti peptidi u našem istraživanju javljaju i kod zdravih i kod bolesnika s IBD-om, tako da je po svojoj prilici riječ o statističkoj anomaliji zbog premalog broja ispitivanih uzoraka. Uspoređujući skupinu zdravih i skupinu osoba oboljelih od CD-a, a promatrajući peptide karakteristične samo za kontrolne uzorke (C) uočava se mala razlika: 2 peptida kod kontrolnih uzoraka u odnosu na 5 peptida kod

uzoraka UC-a. Slična razlika promatranih peptida (C) uočava se i kod ispitanika oboljelih od CD-a gdje je pronađeno 6 peptida u odnosu na 2 peptida pronađena kod kontrolne skupine. Hi-kvadrat testom nije uočena značajna razlika promatrajući peptide karakteristične za kontrolne uzorke (C) kod skupine kontrola u odnosu na skupinu oboljelih od UC-a (K vs UC) te kod skupine kontrola u odnosu na skupinu oboljelih od CD-a (K vs CD). Također, statistički značajna razlika, kojim bi se na temelju peptida karakterističnih za zdrave ispitanike (C) potvrdila razlika između UC-a i CD-a oboljelih ispitanika nije potvrđena.

Broj pronađenih peptida karakterističnih za kontrolne uzorke i uzorke oboljelih (C+S), u kontrolnoj skupini (K) je 24, što je i ujedno najveći broj od svih uspoređivanih peptida (C, C+S, Dg Pept, UC Pept, CD Pept, IBD Pept) koji se mogu pronaći kod kontrolne skupine (K), što je i očekivano s obzirom da su i u istraživanju Basso i sur. upravo to bili peptidi najviše povezani sa svim uzorcima u istraživanju (zdravi i oboljeli od IBD). Kod bolesnika oboljelih od IBD-a ukupno je pronađeno 235 peptida karakterističnih za kontrolne uzorke i uzorke oboljelih (C+S). Uočene su vrlo velike razlike upravo te skupine peptida (C+S) gledajući i pojedinačno uzorke kontrole kod kojih je pronađeno 24 peptida i uzorke oboljelih od UC-a gdje je otkriveno 132 peptida te uzorke oboljelih od CD-a gdje je pronađeno 29 peptida manje, odnosno 103 peptida. Razlika peptida karakterističnih za kontrolne uzorke i uzorke oboljelih (C+S) između dvije skupine oboljelih od IBD-a (UC vs CD) pokazane su i statistički. Osim razlike između skupine oboljelih od UC-a u odnosu na oboljele od CD-a (UC vs CD), dobivene su i statistički značajne razlike između preostale tri testirane skupine uzoraka: K vs UC, K vs CD, K vs CD+UC. Teoretski (zbog statistički značajne razlike pojavnosti C+S peptida) bi se bolesnici oboljeli od UC-a i bolesnici oboljeli od CD-a mogli razlikovati prema pojavnosti C+S peptida, ali ipak to nije primjenjivo jer su C+S peptidi pronađeni i kod zdravih kontrolnih ispitanika i kod bolesnika oboljelih od IBD-a i u našem istraživanju i u istraživanju Basso i sur.

Razlika pojavnosti najznačajnijih dijagnostičkih peptida (Dg Pept) puno je veća u uzorcima UC-a i CD-a gdje se pojavljuje ukupno 123 peptida u odnosu na kontrolne uzorke kod kojih je pronađeno samo 5. Ako usporedimo skupinu zdravih i skupinu bolesnika oboljelih od UC-a ili CD-a pojedinačno, vidimo da su isto tako prisutne vrlo velike razlike u frekvenciji pojavljivanja pronađenih peptida (Dg Pept), 5 u odnosu na 64 peptida kod uzoraka UC-a te 5 u odnosu na 59 peptida pronađenih kod oboljelih od CD-a. Vrlo velike razlike, uspoređujući skupinu kontrola (K) sa skupinom UC-a (K vs UC), skupinu kontrola (K) sa skupinom CD-a (K vs CD) te skupinu kontrola (K) sa skupinom oboljelih od IBD-a (K vs CD+UC), pokazuju

nam i rezultati hi-kvadrat testa. To nam pokazuje kako je pojavnost najznačajnijih dijagnostičkih peptida (Dg Pept) u populaciji oboljelih od IBD-a puno veća nego u zdravoj populaciji, što je u skladu s istraživanjima Basso i sur. Ukoliko uspoređujemo pojavnost najznačajnijih dijagnostičkih peptida (Dg Pept) samo kod skupine oboljelih od UC-a sa skupinom oboljelih od CD-a (UC vs CD) vidimo da nema statistički značajne razlike u pojavnosti dijagnostičkih peptida među oboljelima od UC i CD.

Nadalje, velika je frekvencija pojavljivanja peptida karakterističnih za UC (UC Pept) kod uzoraka oboljelih od UC-a u našem istraživanju, njih 37, ali i kod uzoraka CD-a, 29, što bi ukupno iznosilo 66 peptida uočenih kod oboljelih od IBD-a. Nije uočen čak niti jedan peptid karakterističan za UC (UC Pept) kod kontrolne skupine (K). Ovi rezultati pokazuju nam i veliku razliku potvrđenu hi-kvadrat testom između kontrolnih uzoraka u odnosu na uzorke oboljele od IBD-a (K vs CD+UC), a i zasebno uspoređujući kontrolne skupine (K) s oboljelima od UC-a (K vs UC), odnosno s oboljelima od CD-a (K vs CD). Zanimljivo je da ukoliko promatramo peptide koji su karakteristični samo za ulcerozni kolitis (UC Pept) kod skupine UC vs CD ne uočavamo statistički značajnu razliku između uzoraka oboljelih od UC-a i CD-a. Analizom dobivenih podataka, može se zaključiti kako peptidi karakteristični za UC (UC Pept) dobiveni u istraživanju Basso i sur. nisu pokazali specifičnost za razlikovanje UC-a i CD-a u našem istraživanju.

U skupini peptida koji su karakteristični za CD (CD Pept) kod kontrolne skupine (K) uočeno je 9 peptida, dok je kod uzoraka oboljelih od IBD-a uočena razlika (21 peptid), tj. 40 (CD Pept) kod oboljelih od UC-a, a 61 (CD Pept) kod oboljelih od CD-a. Značajna razlika između skupina kontrola u odnosu na oboljele od IBD-a (K vs CD+UC) te između kontrola u odnosu na oboljele samo od UC-a (K vs UC-a) i oboljele samo od CD-a (K vs CD), uočena je i potvrđena hi-kvadrat testom. Hi-kvadrat testom potvrđena je i nešto manje statistički značajna razlika ukoliko uspoređujemo oboljele od CD-a s oboljelima od UC-a (UC vs CD), a promatrajući peptide koji su karakteristični za CD (CD Pept). Upravo ova uočena statistička razlika kod skupine UC vs CD ukazuje na veću specifičnost peptida karakterističnih za Chronovu bolest (CD Pept) upravo za samu dijagnozu CD-a i razlikovanje UC-a i CD-a.

Pojavnost peptida karakterističnih za IBD (IBD Pept) kod uzoraka oboljelih od UC-a je 378, a nešto niža frekvencija pojavljivanja ove skupine peptida (IBD Pept) od 328 peptida vidljiva je kod uzoraka oboljelih od CD-a, što ukupno čini 706 uočenih peptida u uzorcima oboljelih od IBD-a. Frekvencija pojavljivanja peptida karakterističnih za IBD (IBD Pept)

uočenih kod kontrolne skupine je vrlo mala, odnosno frekvencija njihova pojavljivanja iznosi 6 peptida ukupno. Ogromna razlika u pojavnosti peptida karakterističnih za IBD (IBD Pept) u kontrolnim uzorcima (K) u odnosu na oboljele od IBD-a (K vs CD+UC) je i statistički potvrđena. Ista statistički značajna razlika potvrđena je i ukoliko se gledaju kontrolni uzorci u odnosu samo na uzorke oboljelih od CD-a (K vs CD) ili uzorke oboljele od UC-a (K vs UC). Nije pronađena statistički značajna razlika u pojavnosti IBD peptida među skupinama oboljelih od UC-a i CD-a. Velik broj otkrivenih peptida karakterističnih za IBD ukazuje na postojanje mnogobrojnih peptida karakterističnih za IBD, ali većina njih nije pokazala dovoljnu specifičnost za oboljele od IBD, odnosno nisu pokazali statističku značajnost u frekvenciji pojavljivanja u uzorcima oboljelih od IBD, kao što su to pokazali najznačajniji dijagnostički peptidi (Dg Pept) u istraživanju Basso i sur. (3). Uzrok tome je vrlo vjerojatno heterogenost peptidoma oboljelih od IBD gdje se značajan broj peptida pojavljivao kod individualnih pacijenata, a tek manji broj se pojavljivao kod svih ispitanika oboljelih od IBD u istraživanju Basso i sur., što je djelomično potvrđeno i u našem istraživanju (3).

Hi-kvadrat testom potvrđena je statistički značajna razlika kontrolnih uzoraka u odnosu na oboljele od IBD-a (K vs CD+UC) u svih šest skupina peptida (C, C+S, Dg Pept, UC Pept, CD Pept, IBD Pept). Time je potvrđena hipoteza da se stolica zdrave osobe kod kojih nema upalne bolesti crijeva statistički značajno razlikuje od stolice osobe koja boluje od IBD-a, u našem slučaju bez obzira na skupinu peptida koja se koristi za usporedbu. Od svih karakterističnih peptida s kojima smo uspoređivali naše rezultate, možda najbolji za dijagnostiku IBD-a, odnosno razlikovanje zdravih od bolesnika s IBD-om su se pokazali peptidi karakteristični za UC jer niti jedan od njih nije pronađen u uzorcima zdravih ispitanika u našem istraživanju.

Ograničenja ovoga istraživanja je relativno mali broj uzoraka upotrijebljen za analizu i usporedbu, tako da bi za naredna istraživanja koja bi išla u istom smjeru bilo potrebno znatno povećati broj ispitanika. I pored toga, smatramo kako ovo istraživanje može poslužiti kao dobar temelj za daljnja istraživanja već postojećih biljega te još neotkrivenih biljega upalnih bolesti crijeva jer je pokazano kako fekalni peptidom ima potencijala za dijagnostiku raznih bolesti crijeva. Prikazana metoda koristi neinvazivni uzorak (stolica), priprema je relativno jednostavna i jeftina i ne zahtijeva nikakve posebne reagense ili laboratorijsku opremu osim MALDI-TOF masenog spektrometra.

7. ZAKLJUČAK

Provedenim istraživanjem došli smo do sljedećih zaključaka:

1) Postoji statistički značajna razlika u pojavnosti karakterističnih peptida u stolici bolesnika s upalnom bolešću crijeva (ulcerozni kolitis i Chronova bolest) sa stolicom osobe koja nema upalnu bolest crijeva s obzirom na sve uspoređivane skupine peptida te

2) postoji statistički značajna razlika između uzoraka bolesnika s ulceroznim kolitisom i Chronovom bolešću s obzirom na peptide karakteristične za kontrolne uzorke i uzorke oboljelih te s obzirom na peptide karakteristične za Chronovu bolest.

8. SAŽETAK

CILJEVI ISTRAŽIVANJA. Usporediti prisutnost karakterističnih peptida u stolici bolesnika oboljelih od ulceroznog kolitisa (UC) i Chronove bolesti (CD) sa stolicom zdrave osobe te ispitati postoji li statistički značajna razlika u prisutnosti pojedinih peptida u stolici bolesnika koji bi omogućili diferencijaciju bolesnika s UC-om i CD-om.

USTROJ STUDIJE. Istraživanje je provedeno kao presječna studija.

ISPITANICI I METODE. Analizirano je 10 uzoraka stolice oboljelih od CD, 10 uzoraka stolice oboljelih od UC-a te 10 uzoraka stolice prikupljenih od zdravih kontrola bez upalnih bolesti crijeva. Uzorci su pripremljeni ekstrakcijom u vodi, ponovnom ekstrakcijom u organskom otapalu, uparavanjem i uklanjanjem soli ZipTip metodom prema uputama proizvođača. Pripremljeni uzorci analizirani su na MALDI-TOF uređaju Bruker UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) u rasponu od 1000-4000 m/z u pozitivnom reflektromodu s HCCA kao matriksom.

REZULTATI. U ispitivanim uzorcima traženi su peptidi karakteristični za kontrole, za zajedničke uzorke kontrole i oboljelih, najznačajniji dijagnostički peptidi, peptidi karakteristični za UC, peptidi karakteristični za CD te ukupni peptidi karakterističnih za IBD. Statistički značajne razlike uočene su u svim skupinama karakterističnih peptida ukoliko se promatraju testirane skupine kontrola u odnosu na ukupno oboljele od upalnih bolesti crijeva (CD + UC). Statistički značajne razlike u pojavnosti karakterističnih peptida za razlikovanje UC-a i CD-a pronađene su za peptide karakteristične za CD.

ZAKLJUČAK. Postoji statistički značajna razlika u pojavnosti svih ispitivanih karakterističnih peptida u uzorcima bolesnika s upalnim bolestima crijeva (UC i CD) sa uzorcima zdravih kontrolnih uzoraka. Nisu pronađene dovoljne razine razlike u pojavnosti karakterističnih peptida koje bi omogućile praktično razlikovanje uzoraka oboljelih od UC i CD budući da su se u našem istraživanju karakteristični CD peptidi našli i kod manjeg broja kontrolnih uzoraka.

KLJUČNE RIJEČI. Chronova bolest; MALDI-TOF; ulcerozni kolitis; upalne bolesti crijeva

9. SUMMARY

MALDI-TOF STOOL PEPTIDE ANALYSIS

OBJECTIVES: The first objective of this study was to compare the presence of specific peptides that can be found in the stool of patients diagnosed with inflammatory bowel disease (IBD) (ulcerative colitis, UC and Crohn's disease, CD) with the stool of a healthy person. The second objective was to examine whether there are differences in the presence of certain peptides in the stool sample of a UC patient compared to the stool sample of a CD patient and whether that would help in differentiation UC from CD.

STUDY DESIGN: The study was done as a cross-sectional study.

PARTICIPANTS AND METHODS: Ten stool samples from patients diagnosed with CD, ten stool samples from patients diagnosed with UC and ten stool samples from healthy controls (K) were analyzed. Samples were prepared by extraction in water, re-extraction in an organic solvent, evaporation and desalting using the ZipTip method according to the manufacturer's instructions. The prepared samples were analyzed on a MALDI-TOF mass spectrometer Bruker UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) in the range of 1000-4000 m/z in positive reflectron mode with HCCA as matrix.

RESULTS: In tested samples we have searched for specific peptides: peptides specific for control samples, peptides specific for control samples and samples of IBD patients, the most significant diagnostic peptides for IBD, peptides specific for UC, peptides specific for CD and the total peptides that can be found in IBD patients. Statistically significant differences were found for all groups of characteristic peptides when samples from control group and samples from IBD patients (UC and CD) were compared. Statistically significant differences between UC and CD samples were found for peptides specific for CD.

CONCLUSION: There is a significant difference in the presence of specific peptides in the stool of patients diagnosed with IBD in regard to the stool of a healthy person. Sufficient levels of difference in specific peptide frequency which would allow practical differentiation of UC and CD samples have not been found because in our research small number of specific CD peptides were found in control samples too.

KEYWORDS: Chron's disease; inflammatory bowel diseases; MALDI-TOF; ulcerative colitis

10. LITERATURA

1. Vucelić B. Upalne bolesti crijeva. Reumatizam. 2013;60(2):13-23.
2. Vragović J. Upalne bolesti crijeva. Završni rad. Koprivnica: Sveučilište Sjever; 2016.
3. Basso D, Padoan A, D'Inca R, Arrigoni G, Scapellato M, Contran N, i sur. Peptidomic and proteomic analysis of stool for diagnosing IBD and deciphering disease pathogenesis. CCLM. 2020;58(6): 968-979.
4. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, i sur. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. Gastroenterol. 2012;142(1):46-54.
5. Vucelić B, Čuković-Čavka S. Upalne bolesti crijeva. Medicus. 2006; 15(1_Gastroenterologija):53-62.
6. Bennike T, Birkelund S, Stensballe A, Andersen V. Biomarkers in inflammatory bowel diseases: current status and proteomics identification strategies. World J Gastroenterol. 2014;20(12):3231-44.
7. Sachar DB; Biomarkers Task Force of the IOIBD. Role of biomarkers in the study and management of inflammatory bowel disease: a "nonsystematic" review. Inflamm Bowel Dis. 2014;20(12):2511-8.
8. Ding NS, De Cruz P. Biomarkers in inflammatory bowel diseases. 1. izd. Švicarska: Springer; 2019.
9. Mourad FH, Yau Y, Wasinger VC, Leong RW. Proteomics in inflammatory bowel disease: approach using animal models. Dig Dis Sci. 2017;62(9):2266-2276.
10. Kraemer A, Bulgakova T, Schukina O, Kharitidis A, Kharitonov A, Korostovtseva E, i sur. Automated Fecal Biomarker Profiling - a Convenient Procedure to Support Diagnosis for Patients with Inflammatory Bowel Diseases. Clin Lab. 2020;66(7).

11. Liu D, Viennois E, Fang J, Merlin D, S. Iyer SS. Toward Point-of-Care Diagnostics to Monitor MMP-9 and TNF- α Levels in Inflammatory Bowel Disease. *ACS Omega*. 2021;6(10):6582-6587.
12. Farkas K, Saródi Z, Bálint A, Földesi I, Tiszlavicz L, Szűcs M, i sur. The diagnostic value of a new fecal marker, matrix metalloprotease-9, in different types of inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis*. 2015;9(3):231-237.
13. Antal I, Jelić M, Sila S, Kolaček S, Tambić Andrašević A. Ljudska mikrobiota i mikrobiom. *Acta medica Croatica Acta medica Croatica: Časopis Akademije medicinskih znanosti Hrvatske*. 2019;73(1):3-11.
14. Linder J. The science behind peptides. *Plast Surg Nurs*. 2012;32(2):71-2.
15. Mostovenko E, Dahm MM, Schubauer-Berigan MK, Eye T, Erdely A, Young TL, i sur. Serum peptidome: diagnostic window into pathogenic processes following occupational exposure to carbon nanomaterials. *Part Fibre Toxicol*. 2021;18(1):1-6.
16. Baggerman G, Verleyen P, Clynen E, Huybrechts J, De Loof A, Schoofs L. Peptidomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004;803(1):3-16.
17. Štraus B, Stavljenić-Rukavina A, Plavšić F. *Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju*. Zagreb: Medicinska naklada, 1997.
18. Hosseini S, O. Martinez-Chapa S. *Fundamentals of MALDI-ToF-MS analysis: applications in bio-diagnosis, tissue engineering and drug delivery*. Singapore; Springer, 2016.
19. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*. 2015;6:791.

20. Ngom II, Decloquement P, Armstrong N, Didier R, Chabrière E. Metaproteomics of the human gut microbiota: challenges and contributions to other OMICS. *Clin Mass Spectrom.* 2019; 14 Pt A:18-30.
21. Jurinke C, Oeth P, Van den Boom D. MALDI-TOF mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis. *Mol Biotechnol.* 2004;26(2):147-64.
22. Hortin GL. The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clin Chem.* 2006;52(7):1223-37.
23. Padoan A, D'incà R, Scapellato ML, Arrigoni G, Cornoldi P, Plebani M, i sur. MALDI-TOF/MS peptidomic profiling for the diagnosis of inflammatory bowel diseases. *Clin Chim Acta.* 2019;493:S377.
24. Klein O, Fogt F, Hollerbach S, Nebrich G, Boskamp T, Wellmann A. Classification of Inflammatory Bowel Disease from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Biopsies via Imaging Mass Spectrometry. *Proteomics Clin Appl.* 2020;14(6):1900131.
25. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti J, i sur. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem.* 2011;44(1):104-9.
26. Greco V, Piras C, Pieroni L, Ronci M, Putignani L, Roncada P, i sur. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics. *Expert Rev Proteomics.* 2018;15(8):683-696.
27. WipoIP Portal: Patentscope. MALDI-TOF Peptidomic Profile Of Faeces For The Diagnosis Of Intestinal Inflammatory Disease. Dostupno na stranici: https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2019224663&_cid=P11-L7HSB6-38233-1. Datum pristupa: 26.08.2022.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: **Martina Firić**

Datum i mjesto rođenja: 2. rujna 1998., Osijek

Kućna adresa: Dubrovačka ulica 1F, 31000 Osijek

Tel.: +385911897706

E-mail: martina.firic@gmail.com / mfiric@mefos.hr

Državljanstvo: hrvatsko

Nacionalnost: Hrvatica

OBRAZOVANJE:

2005. – 2013. Osnovna škola Svete Ane u Osijeku

2013. – 2017. II. gimnazija Osijek u Osijeku

2017. – danas Medicinski fakultet u Osijeku, Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

– 22. rujna 2020. stekla akademski naziv „Sveučilišna prvostupnica medicinsko laboratorijske dijagnostike“ (univ.bacc.med.lab.diag.)

– od 28. rujna 2020. godine studentica I. godine Diplomskog sveučilišnog studija Medicinsko laboratorijska dijagnostika

– od 22. rujna 2021. godine studentica II. godine Diplomskog sveučilišnog studija Medicinsko laboratorijska dijagnostika

OSTALE AKTIVNOSTI:

2015. – 2017. – sudjelovanje u projektu Erasmus+ Znanjem do razvoja (II. gimnazija Osijek)

2017. – stjecanje DSD-diplome – B2 (njemački jezik)

2019. – 2020. – zamjenica predstavnice 4. godine MLD-a u Studentskom zboru Medicinskog fakulteta u Osijeku