

# SPECIFIČNOSTI IMUNOSNOG ODGOVORA U PROCESU CIJELJENJA RANA U MODELU DIJABETESA U CD26 DEFICIJENTNIM MIŠEVIMA

---

**Sharbini, Alaa**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:927934>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-25**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Alaa Sharbini

**SPECIFIČNOSTI IMUNOSNOG ODGOVORA U  
PROCESU CIJELJENJA RANA U MODELU DIJABETESA  
U CD26 DEFICIJENTNIM MIŠEVIMA**

Diplomski rad

Rijeka, 2018.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Alaa Sharbini

**SPECIFIČNOSTI IMUNOSNOG ODGOVORA U  
PROCESU CIJELJENJA RANA U MODELU DIJABETESA  
U CD26 DEFICIJENTNIM MIŠEVIMA**

Diplomski rad

Rijeka, 2018.

**Mentorica rada:** Doc.dr.sc. Lara Batičić Pučar

Rad je najvećim dijelom izrađen na Zavodu za kemiju i biokemiju, u suradnji sa Zavodom za histologiju i embriologiju i Zavodom za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Istraživanja su provedena u sklopu Potpore Sveučilišta u Rijeci, broj 13.06.1.2.26., pod nazivom "Uloga proteina obitelji DPP IV u kroničnim bolestima", čiji je glavni istraživač doc.dr.sc. Dijana Detel.

Završni rad obranjen je dana 27.07.2018. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc.dr.sc. Dijana Detel
2. Prof. dr.sc. Ester Pernjak Pugel
3. Doc.dr.sc. Lara Batičić Pučar

Rad ima 104 stranica, 33 slike, 3 tablice i 119 literaturnih navoda.

*Zahvaljujem se doc.dr.sc. Dijani Detel koja mi je omogućila izradu ovog rada i sudjelovanje u istraživanju molekule DPP IV/CD26. Također se zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Lari Batičić Pučar koja mi je bila velika potpora tijekom cijelog istraživanja i koja mi je pomogla u pisanju i provođenju ovog istraživanja. Veliko hvala prof.dr.sc. Ester Pernjak Pugel na histološkim analizama preparata tkiva, interpretaciji rezultata i pomoći u pisanju rada.*



**Specifičnosti imunskog odgovora u procesu cijeljenja rana u modelu  
dijabetesa u CD26 deficijentnim miševima**

**Uvod:** Dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV/CD26) multifunkcionalan je protein s značajnom proteolitičkom i kostimulacijskom ulogom čime utječe i na proliferaciju, angiogenezu, adheziju, migraciju i apoptozu stanica u procesu cijeljenja rana. Modulacijom biološke aktivnosti inkretina sudjeluje i u regulaciji koncentracije glukoze u krvi, međutim, patofiziološki procesi cijeljenja rana u dijabetesu nisu dovoljno razjašnjeni. Pretpostavka ovog istraživanja je da DPP IV/CD26 ima važnu ulogu u modulaciji imunskog odgovora u procesu cijeljenja rana u hiperglikemiji.

**Cilj istraživanja** bio je ispitati utječe li nedostatak DPP IV/CD26 na makroskopske i/ili mikroskopske promjene tijekom procesa cijeljenja rana kože u dijabetesu, istražiti izražaj makrofaga i limfocita T kod CD26 deficijentnih te divljeg tipa životinja s induciranim dijabetesom te ispitati promjene u aktivnosti serumske DPP IV/CD26 tijekom uspostave eksperimentalne hiperglikemije i tijekom procesa cijeljenja rana kože u C57BL/6 životinjama.

**Materijal i metode:** CD26 deficijentnim (CD26<sup>-/-</sup>) te divljem tipu miševa (C57BL/6) induciran je model dijabetesa intraperitonealnom aplikacijom otopine streptozotocina u citratnom puferu u dozi od 50 mg/kg tijekom pet dana. Miševima s potvrđenim dijabetesom je potom na interskapularnom dijelu leđa učinjeno šest rana promjera 5 mm te su pojedine skupine pokusnih životinja žrtvovane drugog, četvrtog, sedmog, desetog te petnaestog dana. Primjenom različitih metoda

analize makroskopskih i mikroskopskih uzoraka (patohistološkim, imunohistokemijskim, histomorfometrijskim i spektrofotometrijskim metodama) pratio se stupanj regeneracije pojedinih slojeva kože, stupanj proliferacije stanica bazalnog sloja epidermisa i fibroblastadermisa, izražaj limfocita T i makrofaga u vezivu koriuma oba soja ispitivanih životinja, te enzimska aktivnost serumske DPP IV/CD26 kod CD57BL/6soja tijekom procesa cijeljenja rana.

**Rezultati** dobiveni ovim istraživanjem ukazuju na relativno uspješniji proces cijeljenja rana kože u uvjetima nedostatka DPP IV/CD26 i razvijenog dijabetesa. Stupanj regeneracije koriuma kod CD26<sup>-/-</sup> miševa statistički značajno je veći ( $p < 0,05$ ) u odnosu na C57BL/6 miševe kao i broj Ki67 pozitivnih stanica, što upućuje na pojačanu proliferaciju stanica veziva uz obnovu ekstracelularnog matriksa u uvjetima nedostatka CD26. Izražaj limfocita T statistički je značajno veći ( $p < 0,05$ ) kod divljeg tipa životinja što ukazuje da je upalna faza manje izražena kod CD26<sup>-/-</sup> životinja. Porast izražaja makrofaga bio je brži i intenzivniji u uvjetima nedostatka CD26. Aktivnost serumske DPP IV/CD26 kod C57BL/6 miševa u uvjetima hiperglikemije je statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s fiziološkim uvjetima dok je tijekom procesa cijeljenja rana značajno snižena drugog i četvrtog dana od indukcije rana.

**Zaključak:** Dobiveni rezultati potvrđuju pretpostavku kako molekula DPP IV/CD26 utječe na intenzitet i dinamiku cijeljenja rana kao i specifičnost imunskog odgovora u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije. Pokazano je da je kod CD26<sup>-/-</sup> miševa upalni odgovor manje izražen nego kod divljeg tipa miševa. Proces regeneracije i reparacije tkiva u uvjetima hiperglikemije uspješniji je kod



nedostatka DPP IV/CD26 što potvrđuje važnost inhibitora ove molekule u terapijske svrhe kod oboljelih od dijabetesa.

**Ključne riječi:** dijabetes, dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV/CD26), cijeljenje rana, limfociti T, makrofazi, proliferacija stanica



## **SUMMARY**

### **Specificities of the Immune Response during the Wound Healing Process in CD26 Deficient Mice with Experimental Diabetes**

**Introduction:** Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) is a multifunctional protein with a significant proteolytic and costimulatory role, thus affecting the process of proliferation, angiogenesis, adhesion, migration and apoptosis of cells in the wound healing process. It is also involved in the regulation of blood glucose concentrations by modulating the biological activity of incretins. However, the pathophysiological processes of wound healing in diabetes are not sufficiently clarified. The hypothesis of this study is that DPP IV/CD26 plays an important role in modulating the immune response in the wound healing process in conditions of hyperglycemia.

**The aim** of this study was to determine whether DPP IV/CD26 deficiency affects macroscopic and/or microscopic changes during cutaneous wound healing process in diabetes. We aimed to determine the expression of macrophages and lymphocytes T in CD26 deficient and wild-type animals with induced diabetes and to investigate changes in serum DPP IV/CD26 activity during the development of experimental hyperglycemia and during the wound healing process in C57BL/6 animals.

**Materials and Methods:** A model of diabetes was induced in CD26 deficient (CD26<sup>-/-</sup>) and wild type (C57BL/6) mice by intraperitoneal administration of a streptozotocin solution in citrate buffer at a dose of 50 mg/kg for five days. After the induction of diabetes, six experimental wounds (5 mm in diameter) were

induced on the interscapular dorsal part of animals. Groups of experimental animals were sacrificed the second, fourth, seventh, tenth and fifteenth day of wound healing. Different methods of analysis were used for macroscopic and microscopic examinations (pathohistological, immunohistochemical, histomorphometrical and spectrophotometrical methods). The degree of regeneration of different skin layers, the degree of proliferation of the basal layer of epidermis and fibroblasts of the dermis, and the expression of lymphocytes T and macrophages in wound tissues of both mice strains were determined. Likewise, serum DPP IV/CD26 activity during the wound healing process in C57BL/6 mice was analyzed.

The **results** of this study indicate a relatively more successful skin wound healing process under conditions of DPP IV/CD26 deficiency in diabetes. The rate of tissue regeneration in CD26<sup>-/-</sup> mice was statistically significantly higher ( $p < 0.05$ ) than in C57BL/6 mice as well as the number of Ki67 positive cells, indicating an increase drate of cell proliferation and regeneration of extracellular matrix in conditions of CD26 deficiency. The number of lymphocytes T is statistically significantly higher ( $p < 0.05$ ) in wild type mice indicating that the inflammatory phase is less pronounced in CD26<sup>-/-</sup> animals. The increase in macrophage expression was faster and more intense in the absence of DPP IV/CD26. The activity of serum DPP IV / CD26 in C57BL/6 diabetic mice was statistically significantly higher ( $p < 0.05$ ) compared to physiological conditions while it was significantly decreased the second and fourth day of wound healing.

**Conclusion:** Obtained results confirm the hypothesis that DPP IV/CD26 influences the intensity and dynamics of wound healing as well as the specificity of the immune response in experimental hyperglycemic conditions. It has been shown that CD26<sup>-/-</sup> mice show a less pronounced inflammation response than wild type mice. The process of tissue regeneration and reparation in hyperglycemia is more successful in conditions of DPP IV/CD26 deficiency, which confirms the importance of inhibitors of this molecule for therapeutic purposes in patients with diabetes.

**Keywords:** Diabetes, Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26), Cell proliferation, Lymphocytes T, Macrophages, Wound healing

## SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Diabetes mellitus.....	1
1.1.2. Komplikacije u dijabetesu.....	2
1.1.3. Terapija dijabetesa tipa II.....	3
1.2. Dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV/CD26).....	5
1.2.1. Molekularna svojstva DPP IV/CD26.....	7
1.2.2. Strukturna građa DPP IV/CD26.....	8
1.2.3. Topljiva DPP IV/CD26.....	11
1.2.4. Uloga DPP IV/CD26.....	12
1.2.4.1. DPP IV/CD26 - proteolitička svojstva.....	12
1.2.4.2. DPP IV/CD26 - uloga u metabolizmu glukoze.....	14
1.2.4.3. Obitelj DPP IV-sličnih proteina.....	18
1.2.4.4. Uloga DPP IV/CD26 u imunološkom sustavu.....	18
1.2.4.5. DPP IV/CD26 i aktivacija limfocita.....	19
1.2.4.6. Utjecaj DPP IV/CD26 na izražaj makrofaga.....	21
1.2.4.7. Interakcija DPP IV/CD26 i adenzin-deaminaze.....	23
1.2.4.8. DPP IV/CD26 u ostalim fiziološkim procesima.....	25
1.3. Proces cijeljenja rana.....	26

1.3.1. Faza I – homeostaza i upalna faza.....	28
1.3.2. Faza II – proliferacijska faza.....	29
1.3.3. Faza III – faza sazrijevanja ili remodeliranja.....	31
1.3.4. Uloga DPP IV / CD26 u cijeljenju rana u dijabetesu.....	32
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	36
3. MATERIJALI I METODE.....	37
3.1. Materijali.....	37
3.1.1. Kemikalije i reagensi.....	37
3.1.2. Protutijela.....	38
3.1.3. Uređaji.....	38
3.1.4. Puferi i otopine reagensa.....	39
3.1.5. Laboratorijske životinje korištene u istraživanju.....	41
3.1.5.1. Etičko gledište istraživanja na eksperimentalnim životinjama.....	42
3.2. Metode.....	43
3.2.1. Plan eksperimenta.....	43
3.2.2. Indukcija pokusnog modela dijabetesa u ispitivanim skupinama miševa.....	44
3.2.3. Postupak anesteziranja eksperimentalnih životinja.....	44
3.2.4. Indukcija rana.....	46
3.2.5. Dobivanje uzorka mišjeg seruma.....	48
3.2.6. Uklapanje tkivnih preparata u parafin.....	48
3.2.7. Hematoksilin-eozin bojanje preparata tkiva.....	49
3.2.8. Imunohistokemijska analiza tkivnih preparata.....	51

3.2.9. Histomorfometrijska i imunohistokemijska analiza preparata tkiva.....	53
3.2.10. Intraperitonealni test tolerancije glukoze.....	54
3.2.11. Određivanje enzimske aktivnosti DPP IV/CD26 u serumu C57BL/6 miševa.....	55
3.3. Statistička obrada podataka.....	57
4. REZULTATI.....	58
4.1. Osobine eksperimentalnih miševa.....	58
4.1.2. Intraperitonealni test tolerancije glukoze.....	59
4.1.3. Pokusni model dijabetesa.....	60
4.2. Model cijeljenja rana.....	62
4.2.1. Makroskopski prikaz cijeljenja rana eksperimentalnih miševa u hiperglikemiji.....	62
4.2.2. Mikroskopski prikaz cijeljenja rana eksperimentalnih miševa u uvjetima hiperglikemije.....	63
4.2.3. Utjecaj nedostatka DPP IV/CD26 na imunski sustav.....	67
4.2.3.1. Utjecaj nedostatka DPP IV/CD26 na izražaj limfocita T kod miševa s eksperimentalnom hiperglikemijom.....	67
4.2.3.2. Utjecaj nedostatka DPP IV/CD26 na izražaj makrofaga kod miševa s ekperimentalnom hiperglikemijom.....	70
4.2.3.3. Proliferacija stanica bazalnog sloja epidermisa kod ispitanih miševa s ekperimentalnom hiperglikemijom.....	72
4.3. Enzimska aktivnost serumske DPP IV/CD26 kod C57BL/6 miševa s eksperimentalnim modelom dijabetesa.....	79
5. RASPRAVA.....	82
6. ZAKLJUČAK.....	90



7. LITERATURA.....	92
8. ŽIVOTOPIS.....	105

# 1. UVOD

## 1.1. Diabetes mellitus

Dijabetes (Lat. *Diabetes mellitus*) je metabolička bolest povezana s poremećajem ili nedostatkom lučenja inzulina. Postoji niz patogenih procesa koji su uključeni u ovu bolest, od autoimune destrukcije  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočića gušterače što rezultira nedostatkom inzulina, pa do abnormalnosti koje dovode do rezistencije na djelovanje inzulina. Glavni uzrok oštećenja je poremećaj metabolizma ugljikohidrata, bjelančevina i masti zbog odsutnosti djelovanja inzulina na ciljna tkiva što dovodi do hiperglikemije koja uzrokuje brojne posljedice, poput dugoročnog oštećenja i disfunkcije različitih organa, a ponajviše očiju, krvnih žila, srca, živaca i bubrega. Uzrok nedostatnog djelovanja inzulina na ciljna tkiva je poremećaj izlučivanja inzulina i/ili smanjena osjetljivost tkiva na inzulin. Oba se uzroka mogu često pojaviti kod istog pacijenta, pa je teško odrediti koja je abnormalnost odgovorna za pojavu hiperglikemije. Dijabetes se prema etiopatogenetskoj kategoriji dijeli na dijabetes tipa 1 i dijabetes tipa 2 a osim toga razlikujemo i gestacijski dijabetes te ostale tipove dijabetesa (1). Kod dijabetesa tipa 1 postoji potpuni prestanak izlučivanja inzulina što je najčešće izazvano autoimunim procesom uništavanja beta stanica (2). Dijabetes tipa 2 je mnogo učestaliji te ga karakterizira kombinacija rezistencije na djelovanje inzulina i poremećaj kompenzacijskog izlučivanja inzulina (1). Osobe oboljele od ovog tipa karakterizira intraabdominalna pretilost koja je povezana s nedostatkom ili rezistencijom na inzulin, hipertenzija te dislipidemija (2). Posljedice ove bolesti su

brojne, ponajprije se očituje hiperglikemija čiji su simptomi poliurija, polidipsija, gubitak težine, zamagljen vid te polifagija. Kod kronične hiperglikemije može doći i do poremećaja u rastu te osjetljivost na određene infekcije. Nekontrolirani akutni dijabetes može imati po život opasnu hiperglikemiju s ketoacidozom ili neketonskim hiperosmolarnim sindromom (1). Broj osoba oboljelih od dijabetesa se 2011. godine procijenio na 366 milijuna ljudi, od čega je čak 90% bolovalo od dijabetesa tipa 2 (2).

### **1.1.2. Komplikacije u dijabetesu**

Komplikacije koje se pojavljuju kod ljudi koji boluju od dijabetesa su ponajviše uzrokovane oštećenjem srednje velikih i velikih arterija (makrovaskularne komplikacije) te kapilara (mikrovaskularne komplikacije) koje se nalaze u ciljnim organima. Glavni uzrok smrti kod dijabetičara su kardiovaskularne komplikacije u koje uključujemo hipertenziju i dislipidemiju. U mikrovaskularne komplikacije koje su najizraženije u perifernim živcima, bubrezima i mrežnici ubrajamo neuropatiju, nefropatiju te retinopatiju (3). Neuropatija uzrokuje gubitak osjeta stopala što može voditi do nastanka dijabetičkog stopala. Nefropatija uzrokovana dijabetesom je vodeći uzrok terminalne bubrežne insuficijencije. Kao posljedica retinopatije kod dijabetičara dolazi do sljepoće. Prethodno navedene komplikacije mogu utjecati na dinamiku cijeljenja rana kod dijabetičara koja je nastala zbog oslabljenih složenih mehanizama za obnavljanje i regeneraciju tkiva (4).

Vodeći uzrok morbiditeta kod osoba oboljelih od dijabetesa je kronični ulkus koji vrlo često utječe na kvalitetu života i uzrokuje patnju i bol pacijenata. Pojavljuje se kod 15 % svih dijabetičara te je uzrok 84 % ukupnih amputacija donjih ekstremiteta koji su povezani s ovom bolesti. Patofiziologija mu je vrlo kompleksna, a komplikacije poput makroangiopatije, mikroangiopatije i neuropatije značajno doprinose razvoju dijabetičkih rana (5).

### **1.1.3. Terapija dijabetesa tipa II**

Kako bi se što više smanjio rizik za moguće buduće komplikacije najvažnije je što prije identificirati bolesnika ili osobu s predispozicijom oboljenja od dijabetesa. Čimbenici koji predstavljaju rizik za dijabetes su pretilost, hipertenzija te obiteljska povijest dijabetesa. Pokazalo se da kod čak 25 % bolesnika s dijabetesom tipa 2 postoje mikrovaskularne komplikacije u vrijeme dijagnoze bolesti što znači da boluju od dijabetesa više od 5 godina. Za dijagnosticiranje oba tipa dijabetesa koriste se jednostavni testovi kao što su ispitivanje glukoze u plazmi natašte, oralni test tolerancije glukoze, fruktozaminski test i mnogi drugi. Kod daljnjeg liječenja bolesnika najvažnije je postići uravnoteženo liječenje postizanjem stabilne euglikemije, što se može postići pravilnom prehranom i terapijom oralnim antihyperglikemicima. Kod bolesnika s dijabetesom tipa 1 primjenjuju se prilagođene inzulinske terapije koje traju cijeli život. Bolesnici s dijabetesom tipa 2 također mogu primati inzulinsku terapiju, a moguće je i kirurško liječenje dijabetesa, kirurškim zahvatom pankreasa. Kod dijabetesa tipa 2, visoke

razine glukoze i masnih kiselina u cirkulaciji pospješuju disfunkciju beta stanica. Kako bi se obnovile oštećene beta stanice postoji i mogućnost presađivanja Langerhansovih otočića gušterače koji su bogato vaskularizirani (2). Nakon presađivanja otočića, za uspješnost oporavka vrlo su važni vaskularizacijski čimbenici poput vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) koji potiče angiogenezu. Također je važan i glukagonu sličan peptid 1 (GLP-1, od engl. *glucagon like peptide-1*) koji *in vivo* djeluje tako što povećava broj beta stanica jer potiče neogenezu otočića (6). GLP-1 je vrlo važan regulator metabolizma glukoze u čovjeka i ima biološko djelovanje koje se očituje u stimulaciji sekrecije inzulina, inhibiciji sekrecije glukagona, zatim produljuje vrijeme pražnjenja želuca te izaziva osjećaj sitosti. Zbog ovih djelovanja GLP-1 predstavlja molekulu od velikog terapijskog značaja kod liječenja šećerne bolesti tipa 2 (7). Njegova dostupnost ovisi o molekuli DPP IV/CD26 (dipeptidil-peptidaza IV, molekula CD26), koja ima katalitičko djelovanje na GLP-1. Uporabom inhibitora DPP IV u terapiji šećerne bolesti tipa 2 omogućuje se povećanje poluživota GLP-1 i time se pospješuje metabolička kontrola (8).

Prevalencija dijabetesa je na žalost vrlo visoka i broj bolesnika nastavlja rasti te je stoga potrebno poticati preventivne i kurativne mjere. Prvenstveno bi se trebalo utjecati na način prehrane tako da se smanji dostupnost visokokaloričnih i visoko masnih namirnica te općenito poticati zdrav način života (2).

## 1.2. Dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV/CD26)

Dipeptidil-peptidaza IV multifunkcionalni je protein otkriven i opisan 1966. godine pod vodstvom znanstvenika V. K. Hopsu- Havu i G. G. Glennera. Histokemijskim su istraživanjima u jetri štakora dokazali molekulu koja ima karakteristiku otpuštanja naftilamina iz Gly-Pro-2-naftilamida. Zbog navedene karakteristike enzimu su dali naziv *glicil-prolin naftilamidaza*, koja je danas poznatija kao dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV) (9). Aktivnost dipeptidil-peptidaze IV je 1977. godine utvrđena na limfocitima periferne krvi (10). Jedanaest godina kasnije dokazalo se da su molekula DPP IV i leukocitni površinski antigen CD26 jednake molekule zbog čega se nekolicina monoklonskih protutijela koja prepoznaju DPP IV grupiralo pod naziv „CD26“. Godine 1977., znanstvenici Shrader i Stacy su uočili neodređeni protein koji ima ulogu vezivanja s adenzin-deaminazom (ADA). Zbog svoje funkcije protein su nazvali „adenzin deaminaza vezujući protein“ (engl. *Adenosin deaminase binding complexing protein*, ADAbp, ADAcp) (11). Nekoliko godina kasnije, odnosno 1993. potvrđeno je kako se radi o kompleksu DPP IV-ADA (12). Na osnovu provedenih istraživanja 1978. godine ustanovljeno je kako je DPP IV sastavljena od dvije jednake podjedinice od kojih svaka zasebno ima aktivno mjesto (13). Tada novootkrivena molekula GLP-1 koja ima važnu ulogu regulatora metabolizma glukoze kod čovjeka, podliježe katalitičkom djelovanju dipeptidil peptidaze IV. Ova činjenica je 1998. godine potaknula J. J. Holsta i C. F. Deacona da daju prijedlog

korištenja inhibitora DPP IV u terapiji šećerne bolesti tipa 2 jer time omogućuju dulji poluživot GLP-1 čime poboljšavaju metaboličku kontrolu (8).

DPP IV/CD26 je serinska proteaza stanične površine koja pripada obitelji prolil-oligopeptidaza (POP) (14), te je samo njen izražaj pronađen na leukocitima zbog čega se izdvaja iz svoje skupine. Specifično djelovanje ove molekule je katalitička razgradnja dipeptida na N-terminalnom dijelu peptidnih i proteinskih lanaca koji u svojoj primarnoj strukturi sadrže prolin ili alanin na pretposljednem mjestu (15). DPP IV/CD26 također pokazuje mogućnost povezivanja s različitim proteinima, te je 1985. godine pokazano da ovaj enzim ima ulogu receptora za kolagen i fibronektin (16). Ova spoznaja povezivanja DPP IV/CD26 i kolagena je također potvrđena i 1988. godine kod štakora (17). DPP IV/CD26 ima veoma važnu ulogu i u imunom sustavu. Izražava se na pojedinim skupinama limfocita T utječući na njihovu aktivnost zbog stimulacijskog djelovanja koje ima na njih (18). Izražena je isto tako i na površini stanica različitih tkiva poput epitelnih i endotelnih stanica, a kako je dokazano da je DPP IV jednaka površinskom antigenu CD26, ova molekula predstavlja jedinstven hematopoetski diferencijacijski antigen (19). Mogućnost vezivanja CD26 na citoplazmatsku domenu CD45 dokazano je 2001. godine čime je ustanovljeno i kako je CD26 lokalizirana i na lipidnim splavovima (20).

Postoje dva oblika DPP IV/CD26 u organizmu: topljivi (solubilni) i membranski oblik. Prisutnost topljivog oblika nalazimo u plazmi te ostalim tjelesnim tekućinama, a membranski oblik izražava se na površini mnogobrojnih stanica različitih tkiva. Znanstvena istraživanja koja se provode na DPPIV/CD26

su vrlo važna zbog njene uključenosti u mnogobrojne procese organizma poput uloge u metabolizmu glukoze, zatim uloge prognostičkog ili dijagnostičkog markera za različite vrste karcinoma te drugih bolesti (14).

### **1.2.1. Molekularna svojstva DPP IV/CD26**

Pomoću metode kloniranja i sekvencioniranja štakorske cDNA 1989. godine je prvi put određena primarna struktura dipeptidil peptidaze IV (21). Tri godine kasnije, cDNA koja kodira humani DPP IV/CD26 je izolirana i sekvencionirana. Njezina molekulska masa je iznosila 100 kDa. Humana DPP IV/CD26 je transmembranski protein tipa II sastavljen od dva identična dimera ukupne relativne molekulske mase 240 000. Pomoću sekvencioniranja cDNA ustanovilo se kako je DPP IV/CD26 sastavljena od 766 aminokiselina (kod štakora 767), pri čemu 22 aminokiseline (VLLGLLGAAALVTIITVPVLL) tvore transmembransku hidrofobnu domenu. Na njenom N-terminalnom kraju se zatim nastavlja intracelularni hidrofilni ostatak sastavljen od 6 aminokiselina (MKTPWK). Kod humane DPP IV/CD26 nalazimo 9 N-glikozilacijskih mjesta, a ona se čak 84,9% podudara sa štakorskim polipeptidom (22).

Na duljem kraku drugog kromosoma (2q24.3) smješten je humani gen koji kodira DPP IV/CD26. Duljina gena približno iznosi 82 kb (Slika 1), te se sastoji od 26 egzona čija veličina iznosi od 45 pb do 1,4 kb (16). TATA i CAAT kutija nisu sadržane u strukturi gena na 5' kraju, ali gen sadržava oko 300 pb veliko područje koje obiluje citozinom te gvaninom (72 %). U navedenom području se nalaze



potencijalna vezna mjesta određenih transkripcijskih faktora poput Sp1, NFκB, AP2 (23).

U mišjem genu koji kodira DPP IV/CD26 isto tako je sadržano 26 egzona različitih veličina od 100 pb do više od 20kb (24). Domena mišje DPP IV/CD26 se proteže na više od 90 kb i ne podudara se u sekvenciji s ostalim serinskim proteazama. Također u njenoj strukturi postoji visoko konzervirana domena koja je specifična za određene nekonvencionalne serinske hidrolaze, a njena veličina je oko 200 aminokiselina (25).



**Slika 1.** Lokalizacija humanog gena DPP IV/CD26 na drugom kromosomu (2q24.3); izvor (24)

### 1.2.2. Strukturna građa DPP IV/CD26

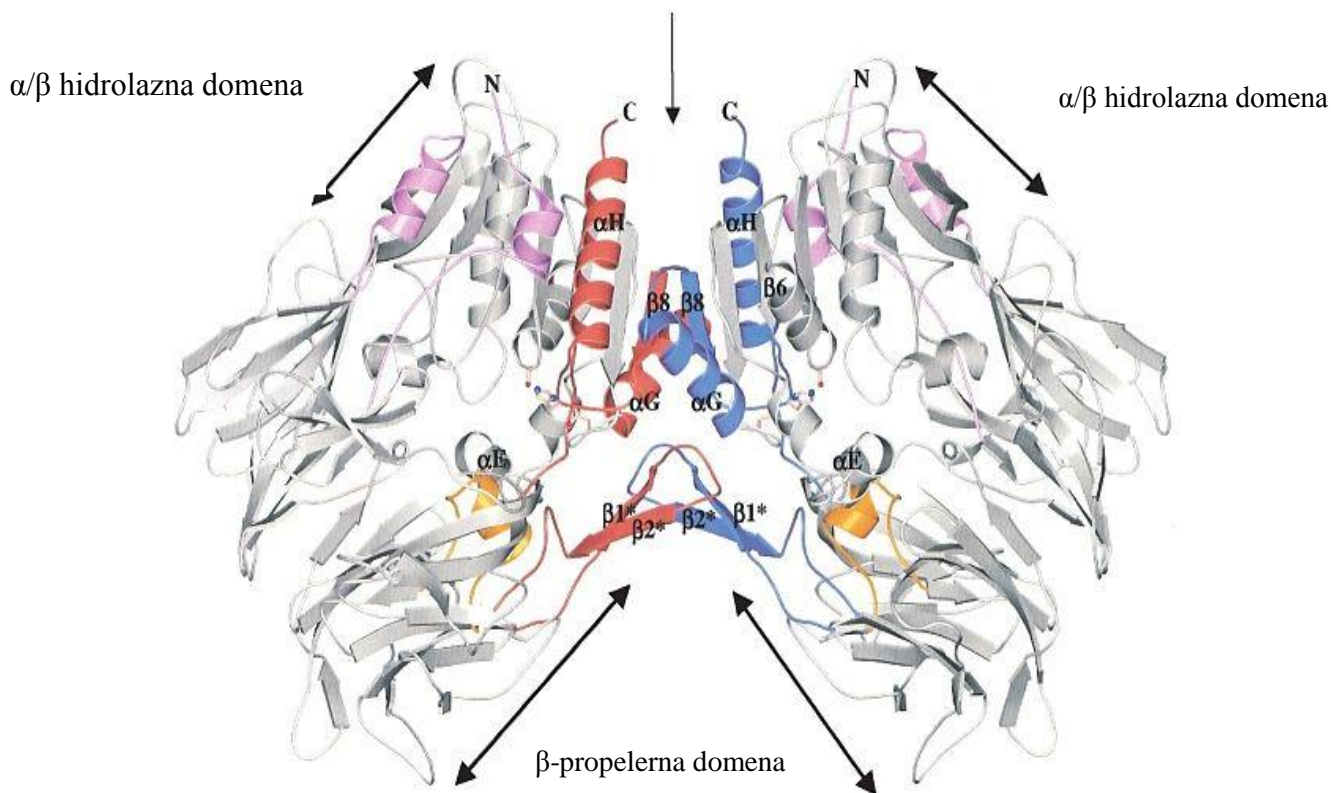
DPP IV/CD26 kao protein stanične površine tipa II je smješten najvećim dijelom u izvanstaničnom prostoru. U organizmu ovu molekulu nalazimo najčešće u obliku dimera kojeg grade dvije monomerne jedinice od kojih je svaka građena od dvije podjedinice. Kod obje monomerne jedinice podjedinica koja je smještena na C-terminalnom kraju predstavlja  $\alpha/\beta$ -hidrolaznu domenu, a podjedinica koja je smještena na N-terminalnom kraju predstavlja  $\beta$ -propelernu domenu (Slika 2).

C-terminalno smještena podjedinica predstavlja katalitičko mjesto DPP IV koje je sastavljeno od osam  $\beta$ -nabranih ploča a one tvore dva antiparalelna te šest paralelnih lanaca. Nadalje, one sačinjavaju  $\alpha$ -uzvojnica povezanu središnju  $\beta$ -nabranu ploču (26). Ova podjedinica je smještena na površini stanične membrane, a sastavljena je od dvadeset aminokiselina (27). Također je u ovoj domeni smješteno aktivno mjesto DPP IV/CD26 s reaktivnim skupinama Asp-708, Ser-630 i His-740 koje predstavljaju katalitičku trijadu aktivnog središta, te disulfidni most između aminokiselina Cys-649 i Cys-762 čija je uloga povezivanje  $\beta$ -nabrane ploče s C-terminalnom  $\alpha$ -uzvojnicom (Met746-Ser764) kako bi terciarna struktura ovog proteina bila stabilna (22, 26). Kako bi DPP IV/CD26 bila katalitički aktivna, veoma je važan i tirozinski ostatak koji pripada  $\alpha/\beta$ -hidrolaznoj domeni i ima ulogu kod stabilizacije intermedijarnih supstrata (28).

$\beta$ -propelernu domenu smještenu N-terminalno gradi osam ploča od kojih svaku pojedinačno grade četiri antiparalelna lanca  $\beta$ -nabrane ploče.  $\beta$ -nabrane ploče grade tunel koji seže sve do aktivnog mjesta kojeg povezuje s donjim dijelom monomera, što za posljedicu ima ljevkastu oblik  $\beta$ -propelera (29). Kako udaljenost  $\beta$ -nabranih ploča od središnjeg dijela tunela nije jednaka, tunel je uvijek otvoren te ima elipsoidni oblik.  $\beta$ -propelerna domena obiluje cisteinom (10 do 12 jedinica) koji stabilizira terciarnu strukturu zbog disulfidnih mostova koje gradi. Smještaj svih disulfidnih mostova je u ovoj domeni, a izuzetak je most koji povezuje Cys-649 i Cys-762. Pristup supstratu je ograničen zbog toga što je aktivno središte prekriveno  $\beta$ -propelerom (30).

Do aktivnog središta DPP IV/CD26 vode dva puta. Jedan je put kroz bočni otvor ovalnog oblika, nalikom na tunel, nastao spajanjem  $\beta$ -nabranih ploča koje potječu iz  $\beta$ -propelera. Drugi put je onaj kroz tunel kojeg gradi  $\beta$ -propeler. Kod tunela  $\beta$ -propelera udaljenost aktivnog središta od površine proteina iznosi 37 Å, a kod bočnog otvora 20 Å. Put ulaza supstrata koji se cijepa u aktivnom središtu i izlaza novonastalog produkta koji izlazi iz središta ne mora biti jednak. Najveći dio  $\beta$ -propelera sadrži devet N-glikozilacijskih mjesta, od kojih se šest nalazi u visokoglikoziliranoj regiji (31). Neka istraživanja pokazuju da iako u štakorskoj DPP IV/CD26 u jetri nije potvrđeno prisustvo o-glikozilacije, također postoje i dva o-glikozilacijska mjesta (32). Tijekom procesa glikozilacije nastaju glikani koji imaju važnu ulogu u procesu nabiranja proteina i stabilizacije molekule (30).

Istraživanjima su dobivene kristalne strukture molekule DPP IV/CD26 kojima se neuspješno pokušala opisati njena trodimenzionalna struktura, no ona se naposljetku razjasnila kompjuterskom obradom (33,34).



**Slika 2.** Struktura humanog DPP IV/CD26-shematski prikaz; izvor (29)

### 1.2.3. Topljiva DPP IV/CD26

Aktivnost dipeptidil peptidaze IV otkrivena je prvi put u serumu 1976. godine (35). DPP IV/CD26 koja je vezana za membranu proteolitički se pri čemu nastaje topljiva DPP IV/CD26 čija je primarna struktura građena od 727 aminokiselina (36). Njena struktura je gotovo identična strukturi membranske DPP IV/CD26 osim što topljiva DPP IV/CD26 ne sadrži intracelularni i transmembranski dio, a molekularna masa joj je 110 kDa (37). Topljiva DPP IV/CD26 nalazi se u cirkulaciji u tekućinama poput urina, plazme, seruma, sjemene i amnionske tekućine te drugim tjelesnim tekućinama (38, 36). Glavni uzrok njene topljivosti je

činjenica da ne sadrži transmembransku domenu (39). Detektirana je nizom metoda poput tehnike imunoreaktivnosti, enzimske aktivnosti DPP IV/CD26 i vezanja adenozin deaminaze koje je za CD26 strogo specifično, čime je dokazano da čak 95 % aktivnosti DPPIV dolazi od CD26 (37).

Koncentracija serumske DPP IV/CD26 u odraslih zdravih pojedinaca iznosi oko 7µg/ml (40), a brojna istraživanja pokazuju kako se njezina katalitička aktivnost u prisustvu upala i malignih promjena značajno mijenja (41). Istraživanja koja su provedena na kultivacijama limfocita T bolesnika koji boluju od karcinoma usne šupljine pokazuju da se DPP IV/CD26 otpušta s aktiviranih limfocita T nakon čega cirkulira krvotokom (42). Spoznaja da je podrijetlo topljive DPP IV iz membranskog oblika DPP IV tkiva još nije potvrđena sa sigurnošću. Pretpostavka je da se ona odcjepljuje s površine raznih stanica koje izražavaju CD26, a koje imaju doticaj s krvi. Mehanizmi te faktori oslobađanja membranske DPP IV/CD26 isto tako nisu potvrđeni, no pretpostavka je da se oslobađa s površine stanica proteolitičkim cijepanjem te tako odlazi u cirkulaciju (40).

#### **1.2.4. Uloga DPP IV/CD26**

##### **1.2.4.1. proteolitička svojstva DPP IV/CD26**

S obzirom na uvjete procesa u kojima se uključuje te vrstu stanica gdje se izražava, DPP IV/CD26 ima mnogobrojne uloge. DPP IV je postala značajna u raznim znanstvenim područjima kao što je hematologija, imunologija te endokrinologija, a glavnu ulogu je pokazala u istraživanju terapije šećerne bolesti tipa 2. Njezina proteolitička uloga je hidrolitička razgradnja tj. otcjepljenje

dipeptida koji se nalazi na N-terminalnom kraju proteina ili polipeptida koji u svojoj primarnoj strukturi na predzadnjem mjestu sadrži aminokiseline prolin ili alanin (43). Takvi polipeptidi i proteini su brojni neuropeptidi, citokini, hormoni, kemokini, faktori rasta i ostali (44). DPP IV/CD26 osim što ih razgrađuje, ujedno ima mogućnost aktivacije ili inaktivacije brojnih biološki značajnih peptida. U Tablici 1 su nabrojani neki od najvažnijih supstrata dipeptidil peptidaze IV poput kentsina, somatoliberina, prolaktina, SDF-1 $\alpha$  (engl. *stromal cell derived factor 1 $\alpha$* ), eotaksina, supstancije P,  $\beta$ -kazomorfina i ostalih. Kao što je prikazano u Tablici 1 možemo zaključiti da ima vrlo široki spektar supstrata što ukazuje na činjenicu kako ima bitnu funkciju kod brojnih fizioloških i patoloških procesa.

Neka istraživanja pokazuju kako molekulska masa supstrata utječe na prilazak supstrata aktivnom mjestu dipeptidil peptidaze IV, pri čemu su „bolji“ supstrati oni peptidi koji imaju manju molekulska masu, a oni s većom imaju teži prilaz aktivnom središtu DPP IV/CD26 zbog čega nemaju mogućnost biti proteolitički razgrađeni (15). Otkriveno je nekoliko molekula, homologa i nehomologa dipeptidil peptidaze IV sa sličnom enzimskom funkcijom, te nekoliko enzimski inaktivnih homologa dipeptidil peptidaze IV (45,46).

**Tablica 1.** Prikaz najvažnijih supstrata DPP IV/CD26; izvor (15)

Supstrati koji sudjeluju u fiziološkim procesima	Supstrati koji sudjeluju u neurološkim procesima
$\alpha$ - lanac fibrinogena $\alpha$ 1- mikroglobulin Aprotinin	$\beta$ -kazomorfin Endomorfin 1 i 2 Kentsin

Bradikinin Enterostatin Faktor oslobađanja hormona rasta Gastrični inhibicijski polipeptid (GIP) Gastrični otpuštajući peptid Glukagonu sličan peptid 1 Glukagonu sličan peptid 2 Glukagon Inzulinu sličan faktor rasta 1 Korionski gonadotropin Morficeptin Monocitni kemotaktički protein 1 Monocitni kemotaktički protein 2 Monocitni kemotaktički protein 3 Prokalcitonin Prokolipaza Prolaktin Supstancija P Tripsinogen Tyr-melanostatin Vazoaktivni intestinalni peptid (VIP)	Neuropeptid Y Peptid YY Supstancija P  <b>Supstrati koji sudjeluju u upalnim procesma</b>  Eotaksin Interferon-gama inducibilni protein 10 (IP-10) <sup>1</sup> Interleukini: IL-1, IL-2, IL-6 Kentsin Limfotoksin RANTES (engl. regulated on activation normal T-cell) SDF-1 $\alpha$ SDF-1 $\beta$ TNF- $\alpha$ <sup>2</sup>
--	---

#### 1.2.4.2. DPP IV/CD26 - uloga u metabolizmu glukoze

Uloga DPP IV/CD26 u homeostazi glukoze je izrazito značajna. Biološko djelovanje regulatora metabolizma glukoze, supstrata DPP IV - GLP-1 očituje se stimulacijom sekrecije inzulina, inhibicijom sekrecije glukagona te produljenjem vremena pražnjenja želuca što dovodi do osjećaja sitosti. Navedene funkcije GLP-1 ukazuju na to činjencu kako je ova molekula od velike važnosti u terapiji šećerne bolesti tipa 2 (7). Njenim djelovanjem povisuje se koncentracija inzulina,

<sup>1</sup> IP-10 (engl. interferon gamma-induced protein 10)

<sup>2</sup> TNF- $\alpha$ <sup>2</sup> ( tumorski nekrotizirajući čimbenik  $\alpha$ )

dok koncentracija glukagona se snizuje čime se omogućuje efikasnije iskorištavanje glukoze u krvi kao izvora energije (47).

Godine 1996. godine dokazano je kako se GLP-1 proteolitički razgrađuje od strane DPP IV/CD26 (48). Radi djelovanja DPP IV/CD26 poluživot GLP-1 traje 2-3 minute. Primjenom inhibitora DPP IV/CD26 poluživot GLP-1 te ostalih hormona koji djeluju na metabolizam glukoze poput GIP<sup>3</sup> i VIP<sup>4</sup> se može značajno produljiti (49). U terapiji dijabetesa tipa 2 se takvi inhibitori mogu primjeniti i zajedno s drugom antidijabetičkom terapijom poput metformina. Početkom 2000-ih su zabilježeni prvi klinički dokazi o ulozi DPP IV/CD26 inhibitora u liječenju ove bolesti (50).

Inhibitori DPP IV/CD26 koji se najčešće upotrebljavaju su sitagliptin, saxagliptin i vildagliptin a prikazani su u Tablici 2 zajedno s ostalim inhibitorima. Svi inhibitori DPP IV/CD26 sprječavaju katalitičku aktivnost dipeptidil peptidaze IV, a međusobno se razlikuju u pojedinim svojstvima kao što je jačina djelovanja, vrijeme djelovanja te kemijska i farmakokinetička svojstva. Primjenjuju se samostalno, ali i zajedno s ostalom antidijabetičkom terapijom (50). Brojna su istraživanja pokazala djelotvornost inhibitora DPP IV/CD26 kod osoba sa šećernom bolesti tipa 2. Primjerice, dokazano je snižavanje koncentracije glukagona primjenom LAF237, inhibitora tvrtke Novartis što je posljedično omogućilo efikasniju kontrolu glikemije (51). Primjenom doze od 100 mg dnevno kroz četiri tjedna drugog Novatisovog inhibitora NVP-DPP728 kod bolesnika sa

---

<sup>3</sup> GIP (engl. *gastric inhibitory polypeptide*)

<sup>4</sup> VIP (engl. *vasoactive intestinal peptide*)



šećernom bolesti tipa 2, došlo je do snižavanja koncentracije glukoze u krvi za otprilike 1mmol/l (52). Također, istraživanje provedeno na miševima s dijabetesom kojima se aplicirao sitagliptin je pokazalo smanjenje koncentracije glukoze u krvi, ali i povećanje broja beta stanica u otočićima gušterače zbog čega je i koncentracija inzulina u njima bila povećana (53). Sitagliptin također ima i utjecaj na povećanje proliferacije endotelnih stanica unutar graftova. Pronađene su lokalizacije stanica koje sačinjavaju mikrovaskularne žile te glukagon-pozitivnih stanica oko beta stanica što upućuje na to da je sitagliptin utjecao na povećanje vaskularizacije tako što je aktivirao VEGF-A / VEGF-B signalni put, a posljedično je poboljšao i funkcionalni protok krvi u graftu. Dobiveni rezultati pokazuju pozitivan učinak *sitagliptina* na sekreciju VEGF-a u presađenim svinjskim otočićima koji doprinosi u proliferaciji stanica i angiogenezi tako što povećava izraženost VEGFR-2 (54). Primjenom linagliptina u miševa s dijabetesom isto tako je došlo do smanjenja razine glukoze u krvi te ubrzanja reepitelizacije kože uslijed povećanja razine aktivnog GLP-1 u lizatima rana. Također su kod tretiranih miševa zabilježene i smanjene razine makrofaga te neutrofila (55). Još jedan pozitivan učinak je pokazao inhibitor pod nazivom *vildagliptin*. On je u provedenim kliničkim ispitivanjima doveo do bržeg cijeljenja kroničnih ulkusa kod oboljelih od dijabetesa, pri čemu je došlo do bržeg zatvaranja rane u odnosu na kontrolnu skupinu. Pretpostavlja se da je to rezultat utjecaja vildagliptina na povećanje razine VEGF-a i transkripcijskog faktora HIF-1 $\alpha$  koji ima glavnu ulogu u neovaskularizaciji (56). Povećanjem razine citokina i faktora rasta poput SDF-1 $\alpha$  u plazmi i broja endotelnih prekursorskih stanica u cirkulaciji inhibitori DPP / CD26

pospješuju cijeljenje rana te pokazuju svoje pleiotropne učinke (57). Međutim, unatoč pozitivnim svojstvima, inhibitori DPPIV/CD26 mogu dovesti i do različitih nuspojava poput alergijske reakcije, hipoglikemije i hipoglikemijskog šoka (58), zbog čega su brojna istraživanja farmaceutskih tvrtki usmjerena na usavršavanje postojećih inhibitora radi sprječavanja navedenih nuspojava te radi povećanja njihove terapijske učinkovitosti.

**Tablica 2.** Popis FDA-odobrenih DPP IV inhibitora u 2015. (59)

<b>Ime brenda</b>	<b>Aktivni sastojak (sastojci)</b>
Januvia	sitagliptin
Janumet	sitagliptin i metformin
Janumet XR	sitagliptin i metformin s produljenim otpuštanjem
Onglyza	saxagliptin
Kombiglyze XR	saxagliptin i metformin s produljenim otpuštanjem
Tradjenta	linagliptin
Glyxambi	linagliptin and empagliflozin
Jentadueto	linagliptin i metformin
Nesina	alogliptin
Kazano	alogliptin i metformin
Oseni	alogliptin i pioglitazon

#### **1.2.4.3. Obitelj DPP IV-sličnih proteina**

Postoji šest strukturno sličnih članova koji pripadaju obitelji DPP-sličnih proteina, a to su DPP IV, FAP (engl. *fibroblast activation protein*), DLP1, DLP2, DPP8 i DPP9. Molekule DPP IV, DPP8, DPP9 i FAP posjeduju svojstvo hidrolize peptidne veze s N-terminalnog kraja koje u svojoj strukturi sadrže prolin na predzadnjem mjestu, dok su članovi DLP1 i DLP2 enzimski neaktivni (60). Dipeptidil peptidazi IV strukturno sličan član FAP ima izražaj većinom na stanicama tumorskih tkiva. Uloga DPP IV-sličnih proteina se očituje i kod mobilizacije stanica koštane srži. Uloga DPP IV i FAP u biologiji tumora je posljedica njihove funkcionalne interakcije s ekstracelularnim matriksom. Molekule DPP8 i DPP9 imaju široku rasprostranjenost te indirektno imaju ulogu u radu imunološkog sustava, dok su članovi DLP1 i DLP2 modulatori kalijevih kanala izraženih u mozgu (61).

#### **1.2.4.4. Uloga DPP IV/CD26 u imunološkom sustavu**

Izražaj DPP IV/CD26 se može pronaći na brojnim stanicama kao što su endotelne i epitelne stanice, te na stanicama tkiva organa kao što su pluća, bubrezi, placenta, mozak, prostata, uterus, egzokrini pankreas, gastrointestinalni i bilijarni sustav i drugdje (40).

Na tkivu štakora su provedena znanstvena istraživanja u kojima se pokazalo da se DPP IV/CD26 izražava na endotelnim stanicama koje izgrađuju kapilare mišića, limfnih organa i mozga, ali i na limfocitima (62). Izražaj DPP IV/CD26 u imunološkom sustavu je na aktiviranim limfocitima T, limfocitima B,

makrofazima i njihovim pripadajućim staničnim linijama te na NK-stanicama. Njezin izražaj je pronađen i na aktiviranim CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocitima T (63), te na površini 10 % CD16<sup>+</sup> NK-stanica koje su izolirane iz svježe izoliranih mononuklearnih stanica periferne krvi (64).

DPP IV/CD26 u stanicama imunskog sustava predstavlja važan faktor aktivacije, te se pokazalo kako sudjeluje u staničnoj proliferaciji i diferencijaciji NK-stanica i limfocita B, u autoimunim procesima (59), apoptozi te u aktivaciji limfocita T u *in vivo* i *in vitro* uvjetima (15, 62). Prilikom povećanja izražaja CD26 na površini limfocita T, dolazi do inicijacije proliferacije čiji maksimum nastupa treći dan od stimulacije antigenima. Nakon trećeg dana, snižava se izražaj CD26 te zbog toga nakon jedanaest dana dolazi do terminacije proliferacije, a CD26 više nije stabilan biljeg (15). Nizak izražaj CD26 kod NK-stanica se može povećati stimulacijom s IL-2 (65). Pokazalo se kako se na limfatičkim stanicama s aktivacijskim markerima poput CD71, CD25, CD29 i CD46RO najčešće izražava i CD26 (66). Kod limfocita T koji inače imaju nizak izražaj CD26 (62,67), on se može povećati stimulacijom uz pomoć mitogena ili proteina *Staphylococcus aureus* (65), a pet do deset puta se može povećati kod mirujućih limfocita T stimulacijom s IL-2, anti-CD3 i mitogenima poput fitohemaglutinina (40, 62, 60).

#### **1.2.4.5. DPP IV/CD26 i aktivacija limfocita**

Na čak 60 % limfocita T koji su porijeklom iz humane periferne krvi može se dokazati izražaj DPP IV/CD26. Godine 1985. pokazalo se da

N-Ala-Pro-O(nitrobenzil)-hidroksilamin, koji inhibira nepovratno DPP IV/CD26, potiskuje proliferaciju humanih limfocita koji su stimulirani uz pomoć mitogena, što dovodi do njihovog reduciranog razvoja. Iz toga proizlazi zaključak kako DPP IV ima značajnu ulogu u procesu proliferacije limfocita T (68). Inhibicijsko djelovanje inhibitora DPP IV/CD26 na proliferaciju limfocita te na proizvodnju citokina potvrđuju i mnogobrojni modeli sazrijevanja limfocita T. Pokazano je također i da se uz primjenu specifičnih inhibitora DPP IV/CD26 enzimaska aktivnost svježe izoliranih stanica timusa i slezene iz miša zaustavlja (69).

Za aktivaciju limfocita T su potrebna minimalno dva signala. Prvi signal je stimulacija kompleksa T-staničnog receptora od strane specifičnog peptidnog protutijela ili antigena. Drugi signal dolazi od kostimulacijskih molekula, tzv. pomoćnih molekula koje sudjeluju u antigen-nespecifičnoj interakciji između antigen-prezentirajućih stanica i limfocita T i koje stimuliraju sintezu IL-2, autokrinog čimbenika rasta limfocita T. DPP IV/CD26 i njezina kostimulacijska svojstva su pomno istražena u *in vitro* uvjetima (70).

Limfociti T se poslije rasta diferenciraju u izvršne stanice, a to usmjeravanje diferencijacije označava treći signal. Veoma važan faktor prilikom takvog usmjeravanja čini lučenje specifičnih citokina. S obzirom na brojne čimbenike, dolazi do diferencijacije pomagačkih limfocita T<sub>H0</sub> u različite podvrste, od kojih su osnovne limfociti T<sub>H1</sub> i T<sub>H2</sub>.

Do stvaranja limfocita T<sub>H1</sub> dolazi kada se makrofagi zaraze pojedinim unutarstaničnim bakterijama, virusima, parazitima i antigenima koji su primijenjeni u jakom adjuvansu. Zajedničko svojstvo ovakvim vrstama zaraza je lučenje

citokina IFN tipa I, IL-2 i IL-18. Isto tako kod ove vrste limfocita se izlučuju citokini TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-2 i IFN- $\alpha$ . Nakon diferencijacije ova vrsta limfocita uz potporu CD40L molekule (smještena na limfocitu T) i CD40 molekule (smještena na predočnoj stanici) potiče se citokinsko lučenje makrofaga. Specifična uloga T<sub>H1</sub> im je da brane organizam od unutarstaničnih mikroorganizama.

Do stvaranja limfocita T<sub>H2</sub> dolazi kada organizam stvori imunološki odgovor na mikroorganizme i alergene koji vode do ponavljajuće ili trajne aktivacije limfocita T, uz odsutnost aktivacije makrofaga nužnih za diferencijaciju limfocita T<sub>H1</sub> i nespecifične upalne reakcije. Izazivanje imunskog odgovora na helminte uz lučenje alergen-specifičnog imunoglobulina (IgE) te aktivacija mastocita i eozinofila je primarna funkcija limfocita T<sub>H2</sub>. Izlučuju citokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i IL-11 koji su uključeni u sintezu protutijela i alergijski odgovor te čija je uloga poticanje humoralnog imunskog odgovora (71).

#### **1.2.4.6. Utjecaj DPP IV/CD26 na izražaj makrofaga**

Makrofagi su vrsta fagocita, stanica koje su prve izložene stranim tvarima ili mikroorganizmima koji se pojave u organizmu. Njihov mehanizam djelovanja je takav da najprije vrše endocitozu i pinocitozu topljivih tvari, zatim fagocitozi podliježu strane čestice i mikroorganizmi, a naposljetku dolazi do enzimske razgradnje i lize istih. Makrofagi mogu sudjelovati u aferentnoj reakciji specifične imunosti gdje imaju ulogu predočnih stanica za limfocite T, te u eferentnoj reakciji specifične imunosti gdje se mogu uključivati specifično ili nespecifično. U

specifičnoj imunoreakciji sudjeluju putem mehanizma citotoksične reakcije ADCC<sup>5</sup> i olakšane fagocitoze. Nalazimo ih u različitim seroznim tkivima gdje mogu biti slobodni ili fiksni. S obzirom na vrstu tkiva u kojem se nalaze imaju odgovarajuće nazive, pa tako se u jetri nazivaju Kupfferovim stanicama, u mišićnom i vezivnom tkivu histocitima, u mozgu mikroglija stanicama, u bubrezima mezangijalnim stanicama te u plućima alveolarnim makrofagima. Na svojoj površini sadrže pojedine skupine receptora kojima osjete približavanje opasnih tvari nakon čega se aktiviraju. Receptori koji su najvažniji za aktivnost makrofaga su opsoninski receptori te PRR<sup>6</sup>, receptori za prepoznavanje obrazaca. U opsoninske receptore spadaju FcR<sup>7</sup> i CR<sup>8</sup>. Oni potpomažu da se mikrobi i ostale ciljane stanice oblože produktima imunoreakcije, npr. ulomcima komplemenata ili protutijelima čime omogućuju lakšu fagocitozu. Među najvažnijim PRR receptorima su TLR<sup>9</sup> receptori koji su smješteni na staničnoj membrani i citosolu te lektin čija je uloga vezanje šećernih ostataka poput stjenke mikroorganizama. Uloga TLR receptora je prepoznavanje produkata mikroba nastalih u stanici i izvanstaničnih produkata mikroorganizama.

Aktivacija makrofaga je pod utjecajem brojnih endogenih i egzogenih tvari. U egzogene tvari ubrajaju se stanice mikroorganizama kao što je *Mycobacterium tuberculosis* ili njihovi produkti. U endogene tvari ubrajaju se citokini koje izlučuju

---

<sup>5</sup> ADCC – stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima

<sup>6</sup> PRR (engl. *pattern recognition receptors*)

<sup>7</sup> FcR – receptori za Fc-ulomak imunoglobulina

<sup>8</sup> CR – receptori za komplement

<sup>9</sup> TLR (engl. *Toll-like receptors*)- receptori čija je građa slična proteinu Tollu

vrsta aktiviranih limfocita T, IFN- $\gamma$ <sup>10</sup>. Nakon aktivacije navedenim tvarima makrofagi izražavaju veće koncentracije MHC/HLA II i kostimulacijskih molekula koje pomažu da limfocitima T predoče antigene. Također izlučuju i kemokine, citokine kao primjerice TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, zatim enzime, koagulacijske čimbenike i slično koji imaju ulogu povezivanja specifične i nespecifične imunosti (72).

Na mišjem modelu liječenja oštećenja kože supstrat DPP IV/CD26, RANTES<sup>11</sup> ima glavnu ulogu kod izražaja makrofaga (73). Dokaz da makrofagi imaju važnu ulogu kod neovaskularizacije rana pokazuju i istraživanja provedena na miševima s deficijencijom makrofaga (74). Nadalje, poznato je da se keratinociti i makrofagi ubrajaju u ključne stanice koje luče faktor rasta VEGF koji pospješuje angiogenezu (75). Kako je kod procesa cijeljenja rana uloga makrofaga dobro poznata, može se zaključiti da odsutnost DPP IV/CD26 pogoduje izražaju makrofaga, a samim time i na lučenje faktora rasta VEGF koji pospješuje angiogenezu i cjelokupno izlječenje ranjenog tkiva.

#### **1.2.4.7. Interakcija DPP IV/CD26 i adenzin-deaminaze**

Adenzin deaminaza (ADA) topljivi je globularni protein koji se nalazi kod sisavaca u svim tkivima koja sudjeluju u razvitku i radu limfatičnih tkiva i koji u metabolizmu purina igra vrlo značajnu ulogu. Molekulska masa adenzin deaminaze je 46 kDa. Djeluje kao katalizator za proces nepovratne hidrolitičke

---

<sup>10</sup> IFN- $\gamma$  – interferon-gama

<sup>11</sup> RANTES - engl. regulated on activation normal T-cell



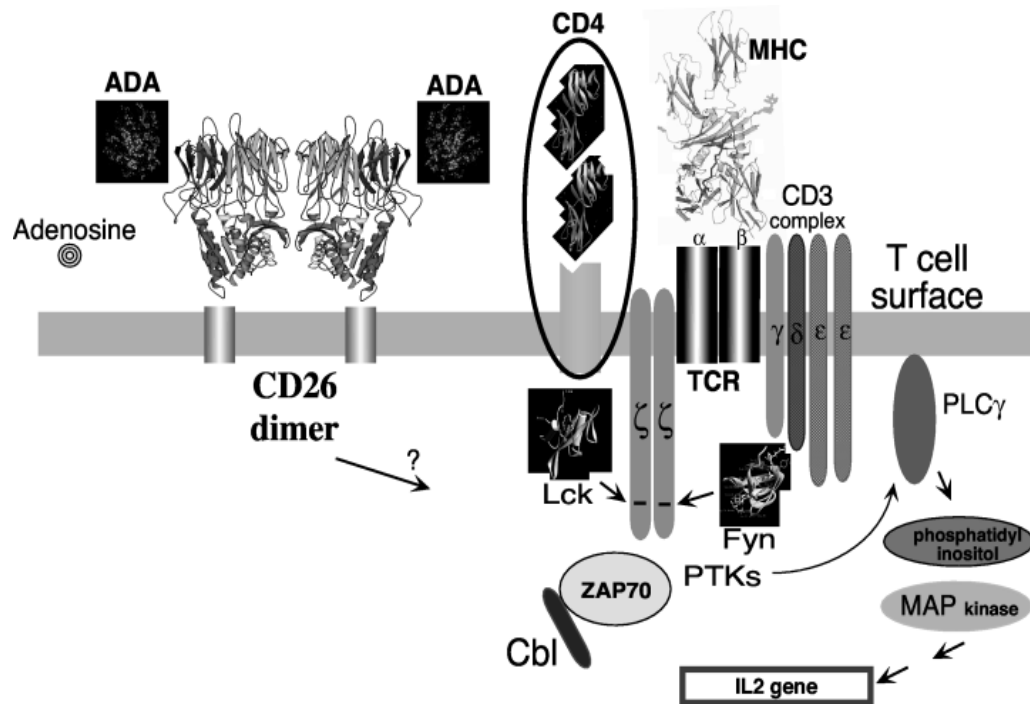
deaminacije adenzina u inozin ili 2'-deoksiadenozina u 2'-deoksiinozin. Smještaj adenzin deaminaze u organizmu je otprilike 90 % unutar stanica, iako je dokazan i njezin izražaj i na površini limfocita B i limfocita T. Prilikom nasljedne deficijencije adenzin-deaminaze dolazi do teške limfopenije i imunodeficijencije što vodi do oštećenja stanične i humoralne imunosti (40). Smatra se da je njezin nedostatak uzrokovan povišenim razinama toksičnih metabolita (76). Nedostatak adenzin-deaminaze prati visoka razina adenzina, patološka stanja koštanog i živčanog sustava te jetre što se i pokazalo eksperimentalno na ADA negativnim miševima koji su upravo radi poremećaja jetre i pluća ugibali perinatalno (40). Oprečno tome, prilikom visokih koncentracija adenzin deaminaze može doći do pojačanog lučenja INF- $\gamma$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ , dok na izlučivanje IL-2 nema izravnog utjecaja (77).

Na površini limfocita T nalaze se brojni markeri među kojima su CD39 i CD73 koji sudjeluju u biosintezi adenzina iz ATP-a<sup>12</sup> dok CD26 kao kompleks CD26-ADA razgrađuje adenzin (78). Metodama imunoprecipitacije i aminokiselinskim sekvencioniranjem pokazano je kako se CD26 direktno veže s ADA-om (79). Ovaj kompleks se stvara samo kod ljudi i viših sisavaca, dok kod štakora i miševa nije pronađen (80). Na površini limfocita T CD26 ima ulogu receptora za adenzin deaminazu (Slika 3) s kojom gradi kompleks čija je funkcija snižavanje razine adenzina (81). Posljedica visoke razine adenzina je toksično djelovanje na organizam koje vodi do inhibicije proliferacije limfocita T, stoga slijedi zaključak da kompleks CD26-ADA ima glavnu ulogu u zaštiti limfocita T od

---

<sup>12</sup> ATP -adenozin-trifosfat, engl. *adenosine triphosphate*

inhibitornog djelovanja adenzina (76, 82). Osim toga, prilikom aktivacije anti-CD3 receptora ovaj kompleks igra ulogu kostimulacijske molekule (81).



**Slika 3.** Shema DPP IV/CD26 i njezine uloge na površini stanice limfocita T; izvor (40)

#### 1.2.4.8. DPP IV/CD26 u ostalim fiziološkim procesima

DPP IV/CD26 ima vrlo raznolike uloge ovisno o vrsti stanica na kojima je izražena, pa tako primjerice u gastrointestinalnom sustavu razgrađuje GLP-1 i inzulinotropni polipeptid ovisan o glukozi čime se i ističe njezina dipeptidazna

aktivnost (48). Također predstavlja receptor za fibronektin i kolagen (16, 83), a *in vitro* istraživanjem je pokazano da se DPP IV/CD26 povezuje zajedno s kolagenom tipa I i kolagenom tipa III (84). Kolagen ima vrlo važnu ulogu u cijeljenju rana, zatim daje koži elastičnost i napetost, potiče njezin oporavak i regeneraciju što dokazuju i podaci o većim razinama kolagena I i kolagena III tijekom procesa oporavka ranjene kože (85).

Kompleks koji nastaje između fibronektina III i DPP IV/CD26 potiče metastaziranje stanica tumora što dovodi do progresije tumora (59). DPP IV/CD26 igra važnu ulogu i u prenošenju signala u stanicu za što su odgovorni kemokini kao MIG, MDC, eotaksin, LD78 $\beta$  i SDF-1 $\alpha$ . S obzirom na to da DPP IV/CD26 aktivira ili inaktivira određene biološki značajne supstrate također ih može i sprječavati da sudjeluju u raznim signalnim putovima putem vezivanja na receptore. Navedeno postiže otcjepljivanjem prolina koji se nalazi na pretposljednem mjestu na N-terminalnom kraju (59, 86). DPP IV/CD26 preko svog veoma važnog supstrata, kemokina RANTES (engl. *regulated on activation normal T cell expressed and secreted*) regulira kemotaksiju monocita i limfocita T. Isto tako, sudjeluje i u sazrijevanju i diferencijaciji limfocita T (87, 88).

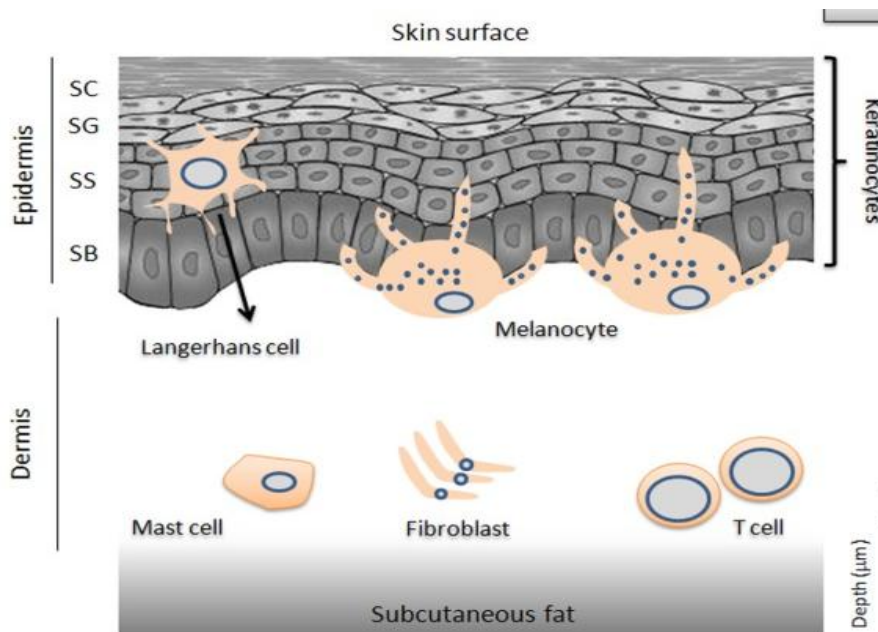
### **1.3. Proces cijeljenja rana**

Najveći organ kod sisavaca je koža, a njena glavna uloga je zaštita organizma od brojnih nepovoljnih vanjskih čimbenika koji mogu biti fizikalni ili mehanički, biološki i kemijski. Koža sprječava dehidraciju organizma, regulira

tjelesnu temperaturu, pruža zaštitu od patogenih mikroorganizama, regulira sekreciju, ali sudjeluje i u imunom odgovoru što znači da je koža osjetni organ.

Građena je iz dva dijela: *epidermisa* ili vanjskog sloja, *dermisa* ili unutarnjeg sloja ispod kojeg je sloj *subcutisa* ili potkožja (Slika 4). *Epidermis* je neposredno izložen okolini i gradi ga oroženi višeslojni pločasti epitel, tzv. keratinociti koji se neprestano ljušte. U *epidermisu* se nalaze Merkelove stanice koje imaju ulogu osjetnih mehanoreceptora, zatim Langerhansove stanice koje predstavljaju antigen predočne stanice i makrofage te melanociti koji proizvode pigment melanin. *Dermis* je sloj kože koji se nalazi ispod *epidermisa*. Sastoji se od vezivnog tkiva koje sadrži retikularna, kolagena i elastična vlakna. U vezivnom tkivu se nalaze i osnovna tvar, osjetna tjelešca, upalne i stalne stanice, živci te krvne i limfne žile. U stalne stanice se ubrajaju makrofagi, fibroblasti i mastociti, a u upalne stanice se ubrajaju plazma stanice, neutrofili, eozinofili i limfociti. Sloj kože ispod *dermisa* se naziva *subcutis* ili potkožje kojeg čini rahlo vezivno tkivo koje u sebi sadrži manje ili više masnih stanica (89).

Izlječenje rana u procesu cijeljenja prati niz složenih staničnih i biokemijskih promjena. Tri su faze na koje se cijeljenje rana može podijeliti i one se međusobno preklapaju. Prva od njih je homeostaza ili nulta faza nakon koje neposredno slijedi upalna faza ili faza I. Nakon upalne faze nastupa proliferacijska faza ili faza II i naposljetku faza sazrijevanja ili remodeliranje (faza III). Ukoliko se bilo koja faza prekine ili produlji moguće su poteškoće ili odgoda cijeljenja rana (90).



**Slika 4.** Građa kože; izvor (91)

### 1.3.1. Faza I – homeostaza i upalna faza

Nakon same ozljede kože nastupa homeostaza za čije je uspostavljanje neophodno stvaranje krvnog ugruška. Krvni ugrušak ima ulogu barijere koja štiti organizam od mikroorganizama te zaustavlja krvarenje. Također predstavlja i medij kojim upalne stanice migriraju te sadrži faktore rasta koji su uključeni u ostale faze cijeljenja rana. Strukturna građa krvnog ugruška se sastoji od mreže fibrina i proteina izvanstaničnog matriksa kao primjerice vitronektina, fibronektina i trombospondina. Nastanak krvnog ugruška je posljedica poremećaja strukture krvnih žila do kojeg dolazi nakon povrede, kada trombociti dođu do rane i stupe u

kontakt s kolagenom. Tada se trombociti aktiviraju i nakupljaju zbog čega se stvara krvni ugrušak (92, 93).

Kada se trombociti u krvnom ugrušku degranuliraju dolazi do oslobađanja faktora rasta, koji potom privlače na mjesto povrede upalne stanice čime počinje upalna faza. Faktori rasta koji su od većeg značaja su TGF- $\beta$ <sup>13</sup>, EGF<sup>14</sup> i PDGF<sup>15</sup>. PDGF zajedno s citokinima kao primjerice IL-1 privlači neutrofile čija je zadaća zaštita rane od infekcije. TGF- $\beta$  privlači monocite koji prelaze u makrofage nakon diferencijacije. Nastali makrofagi fagocitiraju mikroorganizme koji su preostali, ostale stanice i ostatke tkiva. Također izlučuju faktore rasta kao primjerice FGF, PDGF, EGF<sup>16</sup> i TGF- $\beta$  te citokine poput IL-1 i IL-6 (94). Limfociti T se isto tako nalaze u području ranjenog tkiva. Uloga im je pospješiti permeabilnost krvnih žila i usmjeriti aktivnost fibroblasta kod cijeljenja (95).

Upalna faza sprječava nastanak infekcije u organizmu, potiče proliferaciju i čisti ranu. Stišavanjem upalne faze postepeno se smanjuje lučenje citokina i faktora rasta, pa i neutrofila koji se zamijenjuju makrofagima koji usklađuju prijelaz iz upalne u proliferacijsku fazu (96).

### 1.3.2. Faza II – proliferacijska faza

U upalnoj fazi trombociti izlučuju faktore rasta TGF- $\beta$  i VEGF<sup>17</sup> čija je uloga veoma važna u proliferacijskoj fazi (94). Faktor rasta TGF- $\beta$  je glavni signal koji

---

<sup>13</sup> TGF- $\beta$  (engl. *transforming growth factor- $\beta$* )

<sup>14</sup> EGF (engl. *epidermal growth factor*)

<sup>15</sup> PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*)

<sup>16</sup> EGF (engl. *fibroblast growth factor*)

<sup>17</sup> VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*)

stimulira fibroblaste i pritom potiče inhibiciju proteaza. On također potiče sintezu elastina, kolagena, fibronektina i proteoglikana. Zbog pojačane metaboličke aktivnosti u ovoj fazi područje rane zahtijeva optimalnu razinu hranjivih tvari te kisika koja se postiže povećanjem dotoka krvi. Ukoliko se razina kisika smanji ispod optimalne razine, dolazi do aktivacije HIF- $\alpha$ <sup>18</sup>. HIF- $\alpha$  utječe na izražaj VEGF-a tako što se veže na točno određeni dio DNA, stimulira transkripciju, čime se posljedično potiče angiogeneza. Faktori rasta FGF, TGF- $\beta$  i VEGF potiču angiogenezu koja na povrijeđenom području iz malih kapilara i venula stvara nove krvne žile te se posljedično stabilizira i razina kisika. Stabilizacijom razine kisika HIF-1 $\alpha$  se naposljetku veže s kisikom što značajno smanjuje sintezu VEGF-a (93).

Angiogeneza je fiziološki proces nastajanja novih krvnih žila kojeg karakterizira otapanje bazalne membrane, pri čemu nastupa proliferacija endotelnih stanica usmjerena k izvoru izlučivanja faktora rasta. Endotelne stanice se dijele sve dok ne oblikuju niz cjevastih struktura koje se kasnije povezuju u kapilarne petlje kroz koje će cirkulirati krv. Nakon formiranja krvne žile, u njezinu stjenku se ugrađuju glatka mišićna vlakna i na taj način nastaju arteriole te veće arterije (97).

Ključne stanice uključene u sintezu ekstracelularnog matriksa su fibroblasti. Iz ekstracelularnog matriksa se nadalje stvara granulacijsko tkivo koje je ima ulogu u formiranju novih krvnih žila i cijeljenju ranjenog područja. Tijekom proizvodnje novog matriksa, trenutni matriks koji se nalazi oko ruba rane biva razgrađen putem enzimskih sustava aktivatora plazminogena i matričnih metaloproteina

---

<sup>18</sup> HIF (engl. hypoxia-inducible factor)

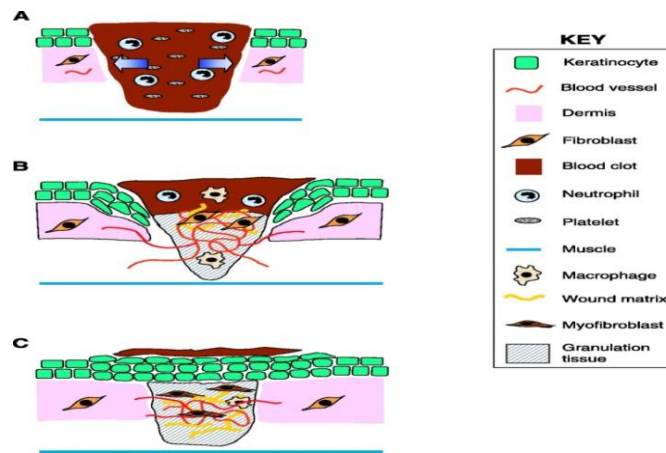
(96). Fibroblasti također izazivaju sintezu kolagena tipa I koji ima važnu ulogu tijekom cijeljenja, te kolagena tipa III koji čini najveći dio vezivnog tkiva u ožiljku. Najprije se sintetizira kolagen tipa III koji je veoma značajan za proliferaciju, a potom kolagen tipa I koji je važan za krajnji dio cijeljenja (93, 98). Fibroblasti pod djelovanjem faktora rasta TGF- $\beta$  i PDGF-a prelaze u miofibroblaste koji pozitivno utječu na zatvaranje rane. Keratinociti koji se nalaze na rubu rane proliferiraju, a ostali podliježu obilježenoj transformaciji čime dobivaju svojstvo fagocitoze krhotina i migracije preko rane. Ishod istovremene migracije keratinocita i stezanja rane je reepitelizacija i zatvaranje ranjenog tkiva (94, 96).

### **1.3.3. Faza III – faza sazrijevanja ili remodeliranja**

Faza III ili sazrijevanje može trajati nekoliko tjedana, pa sve do nekoliko godina. Kada fibroblasti prijeđu u miofibroblaste potiče se zatvaranje rane što označava početak faze III koju karakterizira nastanak epitela i stvaranje ožiljka. Pritom je vrlo važna ravnoteža između sinteze i razgradnje tvari. Ekstracelularni matriks čiju strukturu grade vlaknasti proteini kao primjerice elastin i kolagen se pregrađuje. Kolagen tipa III se zamjenjuje s kolagenom tipa I čime se postiže zatvaranje rane i prethodna čvrstoća tkiva. Čvrstoća tkiva zavisi od kovalentnih veza između kolagenih vlakana koje su ovisne o vitaminu C. Elastin vraća krvnim žilama i koži prvotnu strukturu. Ostale stanice koje se također nalaze u rani podliježu procesu apoptoze, protok krvi se usporava, zaustavlja se rast krvnih žila, a metabolička aktivnost se usporava. Rezultat faze III je u potpunosti formiran



ožiljak s vrlo malo stanica i krvnih žila, te velikom čvrstoćom tkiva (Slika 5) (98, 99, 100).



**Slika 5.** Shema različitih faza tijekom procesa cijeljenja rane; izvor (92)

#### 1.3.4. Uloga DPP IV / CD26 u cijeljenju rana u dijabetesu

Proces cijeljenja rana je u prisustvu hiperglikemije mnogo teži radi različitih unutarnjih i vanjskih faktora (101). Patofiziološke abnormalnosti koje su posljedica kroničnih rana poput kroničnih ulkusa dovode do usporenog cijeljenja rana gdje nije sinkronizirana progresija regeneracije tkiva. Unutarnji čimbenici poput vaskularnih problema, neuropatije te ostalih hiperglikemijom uzrokovanih komplikacija dovode do otežavanja cijeljenja rana kod šećernih ulkusa (102). Vanjski čimbenici koji utječu na cijeljenje rana su mehanički stres ili ponovljene traume koji uzrokuju infekcije rana, zatim nastanak kalusa i ponovno stvaranje ulkusa. Kod dijabetesa visoka koncentracija glukoze utječe na smanjenje proliferacije i diferencijacije keratinocita, kemotaksiju te fagocitozu u početnoj fazi

cijeljenja rana, a također u rani dolazi i do promjene izgleda čimbenika rasta i citokina. Kod dijabetičkih rana je zabilježeno i taloženje fibronektina i kolagena u prevelikim količinama (103,104).

Uloga DPP IV/CD26 u procesu cijeljenja rana je mnogobrojna. Ima ulogu kostimulacijske molekule aktivacije imunskih stanica, ulazi u međudjelovanje s različitim proteinima, ima ulogu u regulaciji biološke aktivnosti brojnih supstrata kao primjerice kemokina, citokina, kolagena i ostalo. Također djeluje i na proliferaciju limfocita T koji tijekom upalne faze luče faktore rasta i citokine. Istraživanja pokazuju da je tijekom lučenja citokina na limfocitima T izražaj DPP IV/CD26 povećan (68, 71), zbog čega se može zaključiti da se djelovanjem na DPP IV/CD26 može regulirati lučenje citokina kao primjerice INF- $\gamma$ , IL-2, IL-10 i IL-12 (105). Ukoliko se DPP IV/CD26 inhibira, izlučivanje citokina se isto tako smanjuje, a time se i na limfocitima T smanjuje izražaj DPP IV/CD26 čime njihova proliferacija biva smanjena. Tijekom faze proliferacije u procesu cijeljenja rana limfociti T imaju utjecaj na moduliranje fibroblasta koji imaju važnu ulogu u sintezi ekstracelularnog matriksa. Može se zaključiti da ukoliko se DPP IV/CD26 inhibira posljedično postoji djelovanje i na navedenu ulogu limfocita T (95). Degradaciju ekstracelularnog matriksa DPP IV/CD26 uzrokuje vezivanjem na adenozin deaminazu i tako utječe na povećanje koncentracije plazmina i degradaciju kolagena, fibronektina te laminina do kojih dolazi zbog aktivacije metaloproteaza matriksa (106). DPP IV/CD26 ima ulogu i u adheziji, migraciji i apoptozi stanica tijekom procesa cijeljenja rana (83). Pri niskim razinama kisika tijekom cijeljenja

rana nastupa hipoksija koja izaziva DPP IV/CD26 da proteolitički djeluje na NPY<sup>19</sup> što uzrokuje nemogućnost njegovog vezivanja sa svojim receptorom Y1, dok se i dalje može povezati s receptorima Y2 i Y5. Na ovaj način DPP IV/CD26 ima mogućnost regulacije procesa upale, proliferacije i angiogeneze. Međudjelovanje ekstracelularnog matriksa i DPP IV/CD26 djeluje na bFGF što se ima učinka na proliferaciju, angiogenezu, migraciju i preživljavanje stanica. U procesu cijeljenja rana zbog duljeg trajanja upalne faze može doći do kroničnih rana, a posljedično i do trajnog oštećenja tkiva (107). U fazi kada nastupaju hipoksični uvjeti GLP-1 koji je supstrat DPP IV/CD26 regulira HIF-1 $\alpha$ , faktor koji regulira izražaj VEGF. VEGF je faktor rasta koji potiče angiogenezu i neovaskularizaciju te tako utječe na cijeljenje rana. U slučaju niske razine ovog faktora kod dijabetičara dolazi do slabe vaskularizacije i duljeg oporavka rane (108). Pokazano je i da DPP IV/CD26 djeluje proteolitički na supstanciju P što ima učinak na osjećaj boli ranjenog područja (59, 109).

Kemokini su vrsta citokina koji sudjeluju u prijenosu signala u stanicu (86, 94). DPP IV/CD26 djeluje proteolitički na kemokine kao što je IP-10 čija je uloga regrutiranje u jetri aktiviranih NK stanica, CD4 i CD8, pri čemu se njegova sposobnost kemotaksije smanjuje, dok svojstvo inhibicije angiogeneze ostaje očuvano. Zbog toga dolazi do neuspješnog obnavljanja krvnih žila te se povećava sklonost prema ulceracijama i dehiscenciji (110). Kemokini RANTES, eotaksin i SDF-1 $\alpha$  također radi prethodno navedenog djelovanja DPP IV/CD26 gube svojstvo kemotaksije što posljedično utječe na monocite i limfocite. SDF-1 $\alpha$  pritom

---

<sup>19</sup> NYP – neuropeptid Y

gubi i kemotaktičnost za endotelne prekursorske stanice na mjestu upale. Angiogena svojstva SDF-1 $\alpha$  su isto tako smanjena radi enzimske aktivnosti DPP IV /CD26 (111). Proteolitičko djelovanje DPP IV/CD26 na kemokine isto tako utječe na migraciju i apoptozu stanica. Tijekom faze proliferacije i sazrijevanja DPP IV/CD26 sudjeluje u razgradnji kolagena, a kako utječe i na ekstracelularni matriks sudjeluje u migraciji stanica (105).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

**Pretpostavka** ovog istraživanja je da DPP IV/CD26 ima značajnu ulogu u modulaciji imunosnog odgovora u procesu cijeljenja rana u hiperglikemiji, obzirom na svoju proteolitičku i kostimulacijsku ulogu. **Svrha** istraživanja bila je ispitati utječe li i na koji način nedostatak DPP IV/CD26 na specifičnosti imunosnog odgovora u procesu cijeljenja rana u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije.

Kako bismo ispitati pretpostavku ovog istraživanja, postavili smo slijedeće **ciljeve** rada:

1. Uspostaviti pokusni model dijabetesa te uspostaviti model cijeljenja rana u u CD26 deficijentnom (CD26<sup>-/-</sup>) te divljem tipu miša (C57BL/6) s eksperimentalnom hiperglikemijom.
2. Ispitati utječe li i na koji način nedostatak DPP IV/CD26 na makroskopske i/ili mikroskopske promjene tijekom procesa cijeljenja rana kože u dijabetesu;
3. Istražiti izražaj limfocita T te makrofaga u različitim vremenskim periodima cijeljenja rana u CD26<sup>-/-</sup> te C57BL/6 tipu miša s induciranim dijabetesom;
4. Utvrditi postoje li promjene u aktivnosti DPP IV/CD26 u serumu divljeg tipa miša tijekom procesa cijeljenja rana u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Kemikalije i reagensi**

Kemikalije i reagensi koji su upotrijebljeni u provedenom istraživanju za izvedbu analitičkih metoda su sljedeći:

Depilacijska krema, *Veet*

Eozin, *Shandon Inc.*

Etanol (50 %, 70 %, 90 %, 96 %, 100 %) *Kemika*

Fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS), *Sigma-Aldrich Life Sciences*

Glicin-prolin-p-nitroanilid (Gly-Pro-p-NA), *Sigma-Aldrich Life Sciences*

Hematoksilin, *Shandon Inc.*

Kloridna kiselina (HCl, 37 %), *Kemika*

Kromogen DAB sustav za vizualizaciju, Dako real en vision system, *Dako Inc.*

Ksilol, *Kemika*

Medij za montiranje Entellan, *Merck*

Paraformaldehid (4 %), *Sigma-Aldrich Life Sciences*

Parafin, *Shandon Inc.*

Streptavidin-POD konjugat, (ref. 11 089153 001), *Roche Diagnostics*

### 3.1.2. Protutijela

Primarna protutijela koja su korištena za imunohistološka bojenja koja su izvođena za potrebe ovog rada su: primarno zečje poliklonsko protu-mišje-CD3 protutijelo (Abnova, AB5690) protutijelo za dokaz limfocita u tkivu u razrijeđenju 1 : 50, primarno štakorsko protutijelo F4/80 Alexa Flour (Bio-Rad, MCA497A488T) protutijelo za dokaz makrofaga u tkivu u razrijeđenju 1:50 te primarno štakorsko monoklonsko protu-mišje-Ki67 (Dako Inc., M7249) protutijelo koje se koristi kao marker proliferacije stanica. Sekundarno protutijelo upotrebljeno u imunohistološkim bojenjima je biotinizirano kozje protu-štakorsko IgG H&L protutijelo, *Invitogen* u razrijeđenju 1 : 100.

### 3.1.3. Uređaji

Analitičke metode u provedenom istraživanju su izvođene uz pomoć sljedećih uređaja i instrumenata (abecednim redom):

Analitička vaga, *Mettler Toledo*

Aparat za dobivanje ultra čiste vode, *TKA MicroPure*

Automatske pipete, *Eppendorf*

Centrifuga ROTINA 420R, *Hettich Zentrifugen*

Čitač mikrotitarskih pločica Bio-tek EL808, *Bio-tek instruments INC*

Destilator vode, *TAK Pacific*

Digitalna kamera (TMC 76S), *Pulnix*

Digitalni fotoaparat, *Olympus*

Digitalna vaga, *Mettler Toledo*

Fluorescentni mikroskop, *Olympus*

Histokinet, *MSE*

Instrument za uzimanje bioptičkog materijala i indukciju rana, *Biopsy Punch, Miltex*

Kombinirani hladnjak s ledenicom +4/-20 °C, *Gorenje*

Mašinica za brijanje, *Simbo*

Mikroton (HM340 E), *Laica*

pH-metar (MP 222), *Mettler Toledo*

Svjetlosni mikroskop (BX 40), *Olympus B201*

Zamrzivač do -80 °C (VXE 490), *Jouane*

#### **3.1.4. Pufferi i otopine reagensa**

U ovom istraživanju su pripremljeni i korišteni sljedeći pufferi i otopine reagensa:

##### **Acetatni puffer (pH = 4,5)**

Acetatni puffer pH=4,5 pripremljen je u odmjernoj tikvici čiji je volumen 50 ml, miješanjem 6,5 ml 1 M otopine etanske kiseline i 2,5 ml 1 M otopine NaOH. Preostali volumen tikvice nadopunjen je do oznake destiliranom vodom nakon čega je pripremljenoj otopini izmjerena pH vrijednost uz pomoć digitalnog pH-metra. Ukoliko pH vrijednost ne odgovara željenoj vrijednosti, podešava se dodatkom destilirane vode, NaOH ili par kapi HCl. Acetatni puffer koji je pripremljen se koristio za zaustavljanje katalitičke reakcije prilikom određivanja aktivnosti dipeptidil peptidaze IV, te se čuvao na +4 °C.



### **Citratni pufer (pH = 6,0)**

Citratni pufer pH=6,0 je pripremljen u odmjernoj tikvici čiji je volumen 1000 ml na način da se 2,94 g natrij-citrata dihidrata otapi u destiliranoj vodi. Nakon potpunog otapanja natrij-citrata dehidrata, preostali volumen tikvice je do oznake nadopunjen destiliranom vodom. Ukoliko pH vrijednost ne odgovara željenoj vrijednosti, podešava se dodatkom destilirane vode, NaOH ili HCl. Citratni pufer koji je pripremljen se koristio za imunohistokemijske analize, te se čuvao na +4 °C.

### **EDTA pufer (pH = 8,0)**

EDTA pufer pH=8,0 je pripremljen na način da se najprije pripremila 1M otopina EDTA tako što se 0,37 g etilen-diamin-tetraacetata otopilo u 1000 ml destilirane vode. Potrebno je miješati otopinu sve dok se čestice krutog etilen-diamin-tetraacetata ne otope u potpunosti. Ukoliko pH vrijednost ne odgovara željenoj vrijednosti, podešava se dodatkom 1M otopine NaOH. U tako pripremljenu otopinu je dodano 0,5 ml Tween 20 te je sve zajedno dobro promiješano. EDTA pufer koji je pripremljen je čuvan na sobnoj temperaturi na kojoj se može čuvati 3 mjeseca, a čuvan na +4 °C ima rok valjanosti dulje od 3 mjeseca.

### **Tris-HCl pufer (pH = 8,0)**

Tris-HCl pufer pH=8,0 je pripremljen na način da se najprije pripremila otopina 1M Tris-a tako što se 1,2114 g krutog Tris-a otopilo u 10 ml destilirane

vode. Zatim se u odmjernoj tikvici volumena 50 ml promiješalo 4,305 ml 1M otopine Tris-a i 2,5 ml 1 M otopine HCl. Preostali volumen tikvice se nadopunio s destiliranom vodom do oznake. Pomoću digitalnog pH-metra je provjerena pH vrijednost pripremljene otopine. Ukoliko pH vrijednost ne odgovara željenoj vrijednosti, podešava se dodatkom destilirane vode, NaOH ili par kapi HCl. Tris pufer koji je pripremljen se koristio za stvaranje povoljnih uvjeta koji su potrebni da bi se odvijala hidroliza supstrata prilikom određivanja aktivnosti dipeptidil-peptidaze IV.

### **Otopina streptozocina u citratnom puferu**

Otopina streptozocina je priređena prije same intraperitonealne aplikacije otapanjem 22,5 mg streptozocina u 1,0 ml citratnog pufera pH vrijednosti 4,5, svježe priređenog. Kako streptozocin ima sklonost brze razgradnje te je osjetljiv na svjetlost, otopinu je potrebno utrošiti u kratkom vremenu i zaštititi od utjecaja svjetlosti.

### **3.1.5. Laboratorijske životinje korištene u istraživanju**

Za potrebe provedenog istraživanja korištena su dva soja laboratorijskih miševa: divlji tip (C57BL/6, CD26<sup>+/+</sup>) i CD26 deficijentni miševi (CD26<sup>-/-</sup>) koji su dobiveni iz divljeg tipa tipa, utišavanjem gena za DPP IV/CD26. Ljubaznošću dr. Didiera Margueta (Centre d'Immunologie de Marseille Luminy, Parc Scientifique de Luminy, Merseille Cedex, Francuska) dobiveni su CD26<sup>-/-</sup> miševi potrebni za ovo istraživanje. Postupak dobivanja CD26<sup>-/-</sup> životinja bio je slijedeći: prvi korak je

izolacija i restrikcija gena koji kodira enzim DPP IV/CD26. Nakon restrikcije gena dolazi do zamjene 2,3 kb *Pst*I-*Sph*I fragmenta s 13,5 kb *Sal*I-*Eco*RI CD26 genomskim fragmentom koji je dobiven iz B10.A-izvedenog  $\lambda$  klon 10 s NEO genom kontroliran od strane PGK1 (engl. *phosphoglycerate kinase 1*). Tako dobiveni mutirani gen se transficira u C57BL/6-izvedenu embrionalnu matičnu stanicu linije B6III koja se dalje injektira u blastocistu C57BL/6 ženke u kojoj se uzgaja. Na ovaj način su dobiveni kimerički mužjaci C57BL/6 miševa, uz napomenu da se iz svake prirodne linije heterozigota dobiva CD26<sup>-/-</sup> homozigot.

Za potrebe ovog istraživanja laboratorijske životinje su uzgojene na Medicinskom fakultetu u Rijeci u središnjem vivariju za uzgoj laboratorijskih miševa LamRi. Tijekom trajanja eksperimentalnog istraživanja laboratorijski miševi su boravili u vivariju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci u standardnim kavezima za laboratorijske miševe. Hranjeni su standardnom laboratorijskom hranom (Standard diet GLP; Mucedola, Italija) i vodom *ad libitum* u prirodnim uvjetima izmjene tame i svjetla.

#### **3.1.5.1. Etičko gledište istraživanja na eksperimentalnim životinjama**

Istraživanja provedena na eksperimentalnim životinjama izvođena su u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN br. 135/06) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN br. 55/13) Republike Hrvatske, pri čemu su poštovana temeljna etička i znanstvena načela vezana za izvođenje eksperimenata na životinjama. Patnja i nepotrebni eksperimenti na životinjama su

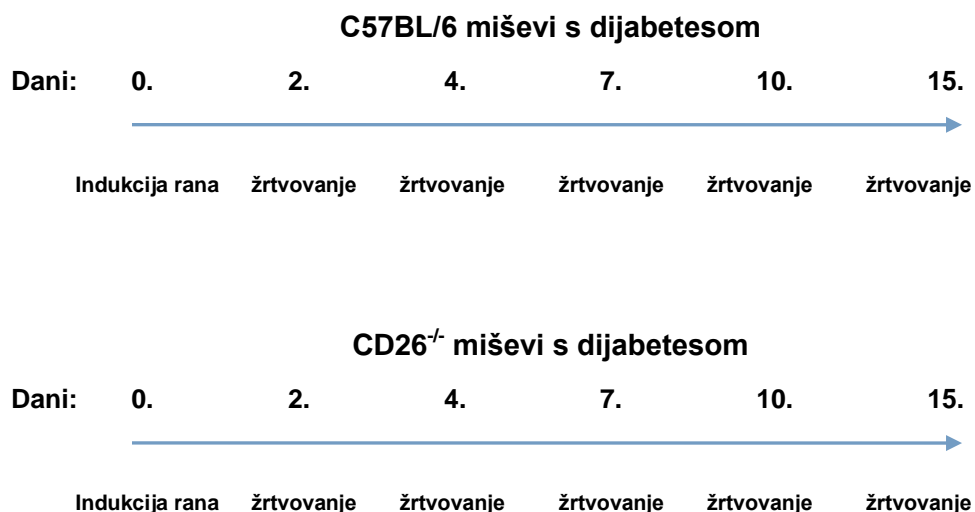
maksimalno izbjegnuti. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Rijeci, te je izvedeno sukladno 3R načelima koja označavaju:

1. Engl. *replacement* – nadomještanje životinja,
2. Engl. *reduction* – smanjenje broja životinja i
3. Engl. *refinement* – oplemenjivanje postupaka).

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Plan eksperimenta**

Eksperimentalne životinje podjeljene su u dvije skupine: prvu skupinu su činili miševi divljeg tipa, odnosno soja C57BL/6 (CD26<sup>+/+</sup>) a drugu skupinu su činili CD26 deficijenti miševi, odnosno CD26<sup>-/-</sup>. Sve eksperimentalne životinje bili su mužjaci starosti između 10 i 12 tjedana. Pojedine skupine životinja podijeljene su u podskupine, ovisno o danu planiranog žrtvovanja. Pojedina ispitivana podskupina se sastojala od 6 do 8 eksperimentalnih životinja. Potom je svim životinja inducirana eksperimentalna hiperglikemija a nakon uspješno uspostavljenog modela dijabetesa, učinjene su im eksperimentalne rane čiji se proces cijeljenja pomno pratio. Tijekom procesa cijeljenja rana miševi su žrtvovani drugog, četvrtog, sedmog, desetog te petnaestog dana od dana indukcije rana (Slika 6).



**Slika 6.** Plan eksperimenta

### 3.2.2. Indukcija pokusnog modela dijabetesa

Kako bi uspostavili pokusni model dijabetesa kod C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa, svakom je mišu intraperitonealno jednom dnevno aplicirano prethodno priređene otopine 0,05 mg streptozocina u citratnom puferu po 1 g tjelesne težine miša. Postupak je ponavljan tijekom 5 dana, a pritom se miševima svakog dana određivala koncentracija glukoze u krvi te tjelesna težina. Koncentracija glukoze u krvi određivana je glukometrom (Accu-Chek®). Samo pokusne životinje kojima je uspostavljena stabilna hiperglikemija (miševi s koncentracijom glukoze u krvi većom od 17 mmol/L tijekom najmanje 3 uzastopna dana) su sudjelovali u daljnjem istraživanju.

### 3.2.3. Postupak anesteziranja eksperimentalnih životinja

Anesteziranje pokusnih životinja izvedeno je prije same indukcije rana kombiniranim anestetikom pripremljenim miješanjem otopine ksilapana

(Xylapan<sup>®</sup>, injekcijska otopina, Vetoquinol) i otopine narketana (Narketan<sup>®</sup> 10, injekcijska otopina, Vetoquinol) u omjeru 1:1 (Slika 7).

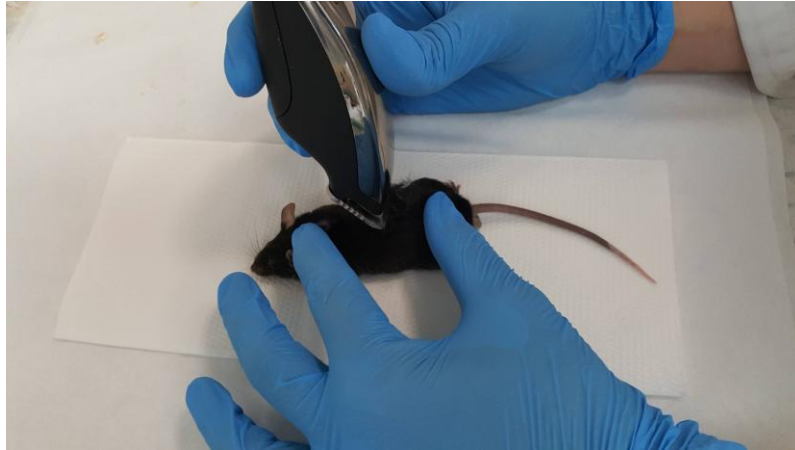
Otopina ksilapana je priređena miješanjem 2 ml izvorne otopine ksilapana te 18 ml sterilne fiziološke otopine puferirane fosfatom, nakon čega je razdijeljena u doze po 1 ml i pohranjena na -20 °C. Otopina narketana je priređena miješanjem 2 ml izvorne otopine narketana te 8 ml sterilne fiziološke otopine puferirane fosfatom, nakon čega se alikvotira i pohrani na -20 °C. Alikvoti obiju otopina se neposredno prije postupka anesteziranja odmrznu te pomiješaju u omjeru 1:1. Anesteziranje se vrši aplikacijom 100 µl pripremljenog kombiniranog anestetika u trbušnu šupljinu eksperimentalne životinje pomoću tanke inzulinske šprice. Postupak je proveden u digestoru, u prostoriji koja je grijana. Duljina trajanja anesteziranog stanja miševa je iznosila približno dvadeset minuta..



**Slika 7.** Kombinirani anestetik ksilapana i narketana

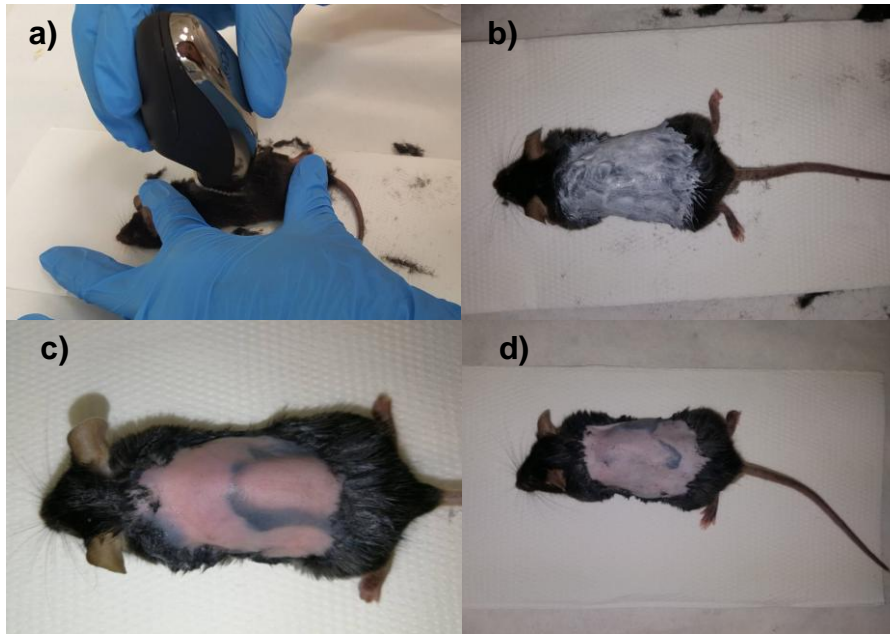
### 3.2.4. Indukcija rana

Nakon anesteziranja eksperimentalnim miševima smo najprije aparatom za brijanje s leđa uklonili dlake kako bi ih pripravili za indukciju rana (Slika 8).



**Slika 8.** Uklanjanje dlaka s mišjih leđa aparatom za brijanje

Aparatom za brijanje je uklonjena najveća količina dlaka, a kremom za depilaciju su uklonjene preostale dlačice uz kožu kako bi se spriječilo oštećenje kože, što je prikazano na Slici 9 pod a) i b). Mišju kožu smo nakon depilacije prebrisali PBS-om, a zatim dezinficirali 70 %-tnim etanolom. Navedeni postupak je prikazan na Slici 9 pod c) i d).



**Slika 9.** Postupak uklanjanja dlaka s leđa miša

Eksperimentalnim miševima je na temeljito dezinficiranoj koži interskapularno inducirano 6 rana. Ranjavanje je izvršeno sa sterilnim instrumentom za uzimanje bioptičkog materijala, engl. *Biopsy punch* (Slika10).



**Slika 10.** Sterilni instrument za uzimanje bioptičkog materijala, promjera 5 mm (engl. *Biopsy punch*)

Prije same indukcije rana mišju kožu leđa smo spojili kako bi istovremeno mogli inducirati po dvije jednake rane. Tako spojenu kožu smo snažno pritislili prethodno navedenim sterilnim instrumentom te inducirali šest jednakih rana promjera 5 mm. Slika 11 pod a) i b) prikazuje postupak indukcije rana.





**Slika 11.** Indukcija rana na mišjim leđima

### **3.2.5. Dobivanje uzorka mišjeg seruma**

Uzorak mišjeg seruma dobiven je punkcijom orbitalnog sinusa tijekom žrtvovanja eksperimentalnih miševa u zadanim danima, pri čemu se izdvojila periferna krv u epruvete. Uzorci periferne krvi su potom odstajali na sobnoj temperaturi 30 minuta, nakon čega su se centrifugirali 10 minuta na 3000 okretaja po minuti. Izdvojeni serum se premjestio s oprezom u čistu epruvetu i pohranio za daljnje potrebe analize na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.6. Uklapanje tkivnih preparata u parafin**

Uzorci kontrolne kože i tkiva rana su uzeti svim ispitivanim miševima u zadanim danima žrtvovanja za potrebe histološke analize. Uzorci su tijekom uzimanja ispirani u PBS-u nakon čega su pohranjeni u histološke kazetice (Slika 12). Histološke kazetice s uzorkom se inkubiraju 24 sata u 4 %-nom paraformaldehidu, a zatim se provodi postupak dehidracije uzoraka kroz rastuće koncentracije alkohola od 70 %, 80 %, 96 % i 100 % radi uklanjanja vode iz tkiva.



**Slika 12.** Histološke kazetice

Uzorci se zatim uranjaju u ksilol i time prosvjetljuju u tkivnom procesoru histokinetu, nakon čega se uklapaju uranjanjem u parafin čija temperatura iznosi od +50 do +60 °C. Na tim temperaturama agregatno stanje parafina je tekuće. Uranjanjem uzoraka, postupkom tri izmjene parafina ksilol u tkivu se mijenja s parafinom. Nakon toga se uzorci tkiva hlade na +4 °C čime se dobiju kruti parafinski blokovi. Za potrebe daljnje analize blokovi se zalede na -20 °C kako bi se mogli rezati mikrotomom. Na mikrotomu se uzorci režu serijski pri čemu svi tkivni rezovi imaju debljinu 4 µm. Tkivni rezovi se na kraju adheriraju na predmetna stakalca koja su prije toga silanizirana.

### **3.2.7. Hematoksilin-eozin bojanje preparata tkiva**

Tkivne rezove koje smo adherirali na stakalca smo obojili hematoksilin-eozin bojenjem (HE). Hematoksilin-eozin bojenje je postupak histološkog bojenja s kombinacijom dviju boja, hematoksilinom i eozinom.

Hematoksilin se koristi za bojenje bazofilnih struktura u stanici kao što su jezgra i kromatin u plavo-ljubičastu boju. Eozin se koristi za bojenje acidofilnih struktura u stanici poput citoplazme u crvenu boju.

Postupak bojenja smo izvršili tako da smo najprije deparafinizirali tkiva na predmetnim stakalcima u otopini ksilola 3 puta po 5 minuta, ali smo svaki put premjestili kadnicu s preparatima u novu otopinu. Zatim smo preparate rehidrirali uranjanjem u otopine alkohola koji imaju padajuće koncentracije po 4 minute u svakoj otopini. Najprije su bili uronjeni 2 puta po 4 minute u 100 % alkoholu, a potom po 4 minute u 90 %, 70 % te 50 % alkoholnoj otopini. Nakon rehidracije preparate smo 4 minute ispirali u destiliranoj vodi, a onda bojili 4 minute u otopini hematoksilina na način da je otopina prekrila sve tkivne preparate u kiveti. Preparate smo nadalje ispirali 15 minuta pod mlazom tekuće vode, a potom diferencirali 2 sekunde u otopini HCl-etanola koja se sastoji od 0,5 ml HCl i 100 ml 70 %-nog etanola. Slijedilo je ponovno ispiranje 10 minuta tekućom vodom, pa 3 minute destiliranom vodom. Nakon ispiranja tkivne preparate smo bojili 3 minute u otopini eozina i ponovno isprali uranjanjem 3 puta po 5 minuta u destiliranu vodu. Preparate smo nakon ispiranja dehidrirali otopinama alkohola koji imaju rastuće koncentracije, to jest 30 sekundi u 70 %, 2 puta po 30 sekundi u 96 % i 2 puta po 30 sekundi u 100 % otopini alkohola. Na kraju su preparati stajali 3 puta po 5 minuta u ksilolu, nakon čega su se sušili na sobnoj temperaturi i tako osušeni uklopili s entelanom (Slika 13).



**Slika 13.** Otopine za hematoksilin-eozin bojanje preparata tkiva

### **3.2.8. Imunohistokemijska bojanja tkivnih preparata**

Metodom imunohistokemijskog bojenja smo obojili tkivne preparate kako bi vizualizirali CD3, Ki67 i F4/80 pozitivne stanice. Analiza je napravljena slijedeći protokol za imunohistokemijsko bojenje. Najprije smo deparafinirali preparate tako što smo ih uronili 3 puta po 5 minuta u otopinu ksilola, nakon čega smo ih rehidrirali u otopinama alkohola padajućih koncentracija, to jest po 3 minute u 100 % (dva puta), 90 % i 70 % otopini alkohola. Preparate smo nakon rehidracije isprali uranjanjem 2 puta po 3 minute u destiliranu vodu, a zatim 5 minuta u PBS. Slijedeći korak je bio postupak razotkrivanja antigena ili tzv. „*antigen retrieval*“ gdje smo tkivne preparate uronili u citratni pufer i stavili u mikrovalnu pećnicu najprije na 800 W kroz 3,30 minute do ključanja, potom na 350 W kroz 10 minuta. Ukoliko se dio citratnog pufera tijekom procesa izgubi ključanjem potrebno ga je nadodati i

još 5 minuta staviti u mikrovalnu pećnicu na 350 W. Preparate u citratnom puferu smo nakon kuhanja hladili 20 minuta na sobnoj temperaturi, zatim ispirali najprije 2 puta po 3 minute u destiliranoj vodi, a potom 5 minuta u TBS-u. Sljedeći korak je bio blokiranje endogene peroksidaze koji smo izveli tako da smo u posebnoj kadici pripremili otopinu koja se sastoji od 1,2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 35 ml metanola i 35 ml PBS-a. Zatim smo tkivne preparate uronili u kadicu s pripremljenom otopinom kroz 35 minuta. Preparate smo potom ispirali 2 puta po 5 minuta u PBS-u, nakon čega smo na svaki nakapali po 150 µl seruma koji potječe iz životinje u kojoj su sekundarna protutijela proizvedena (engl. *normal goat serum*) kako bi onemogućili nespecifično vezanje protutijela. Serum sa preparata se ne ispiri, već se odlije višak te se na njega dodaju primarna protutijela. Za potrebe ovog istraživanja koristili smo sljedeća primarna protutijela: primarno zečje poliklonsko protu-mišje-CD3 protutijelo (Abnova, AB5690) protutijelo za dokaz limfocita u tkivu u razrjeđenju 1 : 50, primarno štakorsko protutijelo F4/80 Alexa Flour (Bio-Rad, MCA497A488T), protutijelo za dokaz makrofaga u tkivu u razrjeđenju 1:50, te primarno štakorsko monoklonsko protu-mišje-Ki67 (Dako Inc., M7249) protutijelo koje se koristi kao marker proliferacije. Potom je slijedila inkubacija tkivnih preparata preko noći u vlažnoj komori na +4 °C. Sljedeći dan nakon inkubacije preparate smo isprali 3 puta po 5 minuta u PBS-u i na njih dodali odgovarajuće sekundarno protutijelo. Na preparate na koje smo inkubirali primarno protutijelo F4/80 nismo vezali sekundarno protutijelo. Sekundarno protutijelo koje je korišteno za potrebe ovog istraživanja je kozje protu-štakorsko IgG H&L protutijelo, *Invitogen* u razrjeđenju 1 : 100. Inkubacija sekundarnog

protutijela se odvijala na sobnoj temperaturi 30-45 minuta. Preparate smo zatim ispirali 3 puta po 5 minuta u PBS-u, a onda inkubirali 45 minuta u vlažnoj komori streptavidinom za koji je vezan enzim peroksidaza. Sljedeći korak je bilo ispiranje 3 puta po 5 minuta u PBS-u, nakon čega su na tkivnim preparatima vizualizirane CD3 i Ki67 pozitivne stanice pomoću kromogenog supstrata DAB kroz 20-30 sekundi. Zadovoljavajuća razina vizualizacije je provjerena mikroskopom. Preparati su nakon vizualizacije ispirani 10 minuta u tekućoj vodi, a potom 5 minuta u destiliranoj vodi. Nadalje smo preparate kontrastirali 15 sekundi s hematoksilinom i ponovno ispirali 10 minuta u tekućoj i 5 minuta u destiliranoj vodi. Slijedila je dehidracija tkivnih preparata u otopinama alkohola rastućih koncentracija, po 3 minute u svakom (70 %, 80 %, 96 % po dva puta i dva puta u 100 % ), zatim uranjanje 3 puta po 5 minuta u ksilol i na samom kraju uklapanje entelanom. Preparati s vezanim F4/80 primarnim protutijelom koje na sebi sadrži fluorescentnu boju su uklapani s Mowiolom i vizualizirani su metodom imunoflorescencije.

### **3.2.9. Histomorfometrijska i imunohistokemijska analiza preparata tkiva**

Na tkivnim preparatima koji su pripremljeni metodama imunohistokemije i hematoksilin-eozin bojenjem izvršena je patohistološka, histomorfometrijska te imunohistokemijska analiza. Sva mjerenja je učinio iskusni histolog pomoću kompjuterskog sustava koji se sastoji od svjetlosnog mikroskopa (Olympus, Tokio, Japan) te fluorescentnog mikroskopa i digitalne kamere (TMC 76S, Tokio, Japan). Pomoću kompjuterskog programa ImageJ2 (112) izvršena je analiza

digitalnih fotografija raznih uvećanja s histološkim preparatima. Svi dobiveni rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

### **3.2.10. Intraperitonealni test tolerancije glukoze**

Test tolerancije glukoze uobičajeni je postupak koji procjenjuje sposobnost organizma da metabolizira glukozu, odnosno mjeri se vrijeme koje je potrebno da se egzogena glukoza ukloni iz krvi. Primjenjuje se kod nepravilnog rada  $\beta$ -stanica pankreasa, tijekom inzulinske rezistencije, kao test za utvrđivanje dijabetesa, za otkrivanje nepravilnosti u metabolizmu ugljikohidrata i drugo. Za potrebe provedenog istraživanja primijenili smo intraperitonealni test tolerancije glukoze ili IPGTT <sup>20</sup> kojim smo u točno određenim vremenskim točkama odredili koncentraciju glukoze u krvi, nakon što smo intraperitonealno aplicirali injekciju s 10 %-tnom otopinom glukoze u oba soja eksperimentalnih miševa. Otopinu 10 %-tne glukoze smo priredili otapanjem 1g glukoze (beta-D(+)-glukoza) u sterilnom PBS-u volumena 10 ml. Eksperimentalni miševi su prije aplikacije 10 %-tne glukoze izvagani, te se ovisno o masi miša određuje potreban volumen za aplikaciju prema sljedećoj formuli:

$$\text{Volumen } (\mu\text{l}) = \text{masa miša (g)} \times 20.$$

Miševi su prije same aplikacije 10 %-tne otopine glukoze gladovali 16 sati te im je izmjerena razina glukoze. Isto tako 15, 30, 60, 90, 120 i 240 minuta nakon aplikacije otopin im je također izmjerena koncentracija glukoze u krvi.

---

<sup>20</sup> IPGTT - engl. *Intraperitoneal glucose tolerance test*

### **3.2.11. Određivanje enzimske aktivnosti DPP IV/CD26 u serumu C57BL/6 miševa**

Spektrofotometrijski je određena enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u serumu svih eksperimentalnih miševa C57BL/6 mjerenjem apsorpcije svjetlosti uz pomoć čitača mikrotitarskih pločica na valnoj duljini od 405 nm. Određivanje se temelji na hidrolizi glicin-prolin-p-nitroanilida (Gly-Pro-p-NA), supstrata DPP IV/CD26. U Tablici 3 je prikazan postupak pripreme probe i slijepa probe u jažicama mikrotitarske pločice što predstavlja prvi korak u određivanju enzimske aktivnosti. Proba i slijepa proba se sastoje od 34  $\mu$ l Tris-HCl pufera (pH = 8,0) i 2  $\mu$ l komercijalnog kromogenog supstrata (Sigma Chemical, Njemačka). Smjesa probe sadrži još i 4  $\mu$ l mišjeg seruma. Nakon pripreme smjesa slijedi njihova inkubacija 30 minuta na 37 °C radi postizanja optimalnih uvjeta kako bi došlo do hidrolize između DPP IV/CD26 iz seruma i spomenutog supstrata. Sljedeći korak je podešavanje pH vrijednosti u smjesama radi zaustavljanja reakcija dodatkom 160  $\mu$ l acetatnog pufera čija pH vrijednost iznosi 4,5. Nakon zaustavljanja reakcije slijepoj probi se dodaje 4  $\mu$ l mišjeg seruma (tada više supstrat ne može biti razgrađen od strane DPP IV/CD26, a u cilju uklanjanja moguće interferencije boje seruma na rezultate mjerenja). Intenzitet žutog obojenja koje je nastalo u reakciji hidrolize se određuje naspram slijepa probe svakog pojedinog uzorka. Mikrotitarska pločica se nakon pripreme ubacuje u čitač pri čemu se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 405 nm mjeri apsorpcija svjetlosti probe u odnosu na slijepu probu. Od ukupno izmjerene apsorpcije se oduzme apsorpcija slijepa probe i na taj način dobije stvarna apsorpcija probe.



**Tablica 3.** Određivanje enzimске aktivnosti serumske DPP IV/CD26 u C57BL/6 eksperimentalnim miševima

	SLIJEPA PROBA	PROBA
	V / $\mu\text{L}$	V / $\mu\text{L}$
Tris-HCl pufer (pH = 8,0)	34	34
Supstrat (Gly-Pro-p-NA)	2	2
Serum	-	4
<b><i>Inkubacija uzoraka 30 minuta na 37 °C</i></b>		
Acetatni pufer (pH = 4,5)	160	160
Serum	4	-

Jednadžba prema kojoj se računa enzimska aktivnost serumske DPP IV/CD26 je sljedeća:

$$\text{Enzimska aktivnost} = \frac{V_{uk} \times 10^6}{\epsilon \cdot d \cdot t \cdot V_{uz}} \cdot A_p$$

Legenda:

$A_p$  = apsorbancija probe

$V_{uk}$  = ukupni volumen reakcijske smjese

$10^6$  = faktor pretvorbe mola u  $\mu\text{mol}$

$V_{uz}$  = volumen uzorka

$d$  = debljina kivete (1 cm)

$t$  = vrijeme inkubacije u minutama (30 min)

$\epsilon$  = molarni apsorpcijski koeficijent (za p-nitroanilid pri 405 nm iznosi  $9,9 \times 10^3 \text{ mol}^{-1}$ )

Kod svih skupina C57BL/6 eksperimentalnih miševa specifična aktivnost serumske DPP IV/CD26 se izrazila u internacionalnim jedinicama po litri (IU/l) za koje vrijedi da je 1 IU/L jednaka hidrolizi 1  $\mu$ mol-a supstrata po 1 L mišjeg seruma.

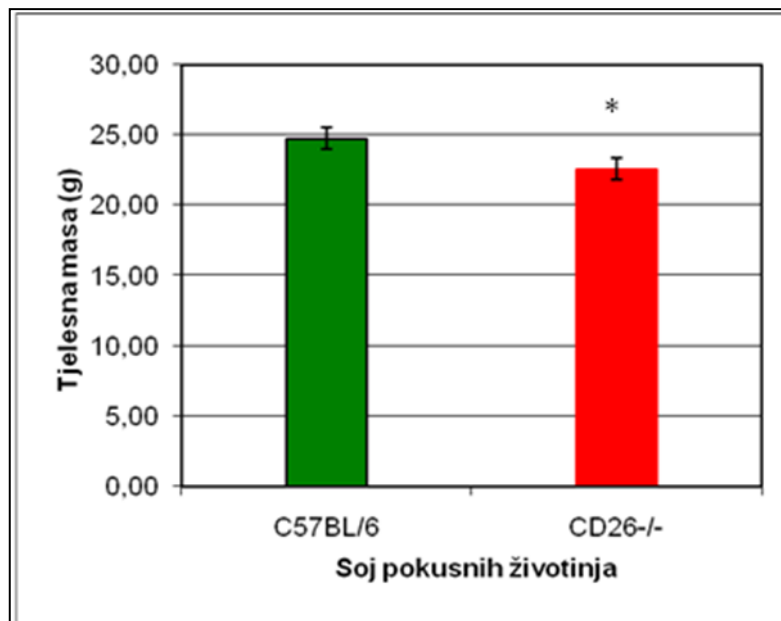
### **3.3. Statistička obrada podataka**

Svi podaci koji su prikupljeni u ovom istraživanju su sačuvani u bazi podataka putem programa Windows Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 2007. Zavisno od pripadajuće kategorije dobiveni rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija brojčanih podataka, to jest prikazani su kontingencijskim tablicama za kategoričke podatke, a potom i grafički. Zavisno od mjerne ljestvice koju slijede i raspodjele, vrijednosti varijabli između ispitivanih skupina miševa komparirane su parametrijskim i neparametrijskim postupcima statističke raščlambe. Razlike koje su uočene između pojedinih skupina eksperimentalnih miševa su se testirale ANOVA testom, u kojem se razlika od  $P < 0,05$  smatrala statistički značajnom. Pomoću programa Windows Microsoft Excel<sup>®</sup> 2007 uz potporu računalnog programa STATISTICA<sup>®</sup> 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK 74104, SAD) su izvedeni postupci statističke raščlambe..

## 4. REZULTATI

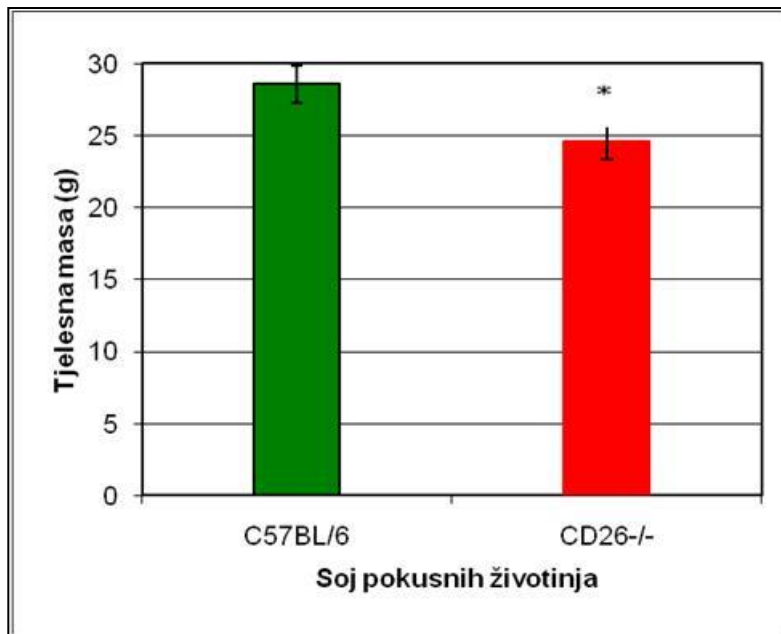
### 4.1. Osobine eksperimentalnih miševa

U provedenom istraživanju primjećeno je kako su oba soja eksperimentalnih miševa, odnosno divlji tip C57BL/6 i CD26 deficijenti tip (CD26<sup>-/-</sup>) jednakih fenotipskih obilježja, jednakog ponašanja, te da pokazuju isti način prehrane kao i razmnožavanja. Također je uočeno kako oba soja miševa imaju približno jednaku duljinu života. Međutim, prilikom analize tjelesnih masa životinja u fiziološkim uvjetima, ali i prilikom uspostavljanja eksperimentalne hiperglikemije, uočeno je kako je kod CD26 deficijentnih miševa koji su jednakog spola i starosti tjelesna masa statistički značajno niža ( $p < 0,05$ ) u odnosu na C57BL/6 životinja, što je prikazano na Slici 14 i Slici 15.



**Slika 14.** Prosječne tjelesne mase ekperimentalnih miševa u fiziološkim uvjetima (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija)

\*, statistički značajna razlika između sojeva eksperimentalnih miševa (C57BL/6) ( $p < 0,05$ )

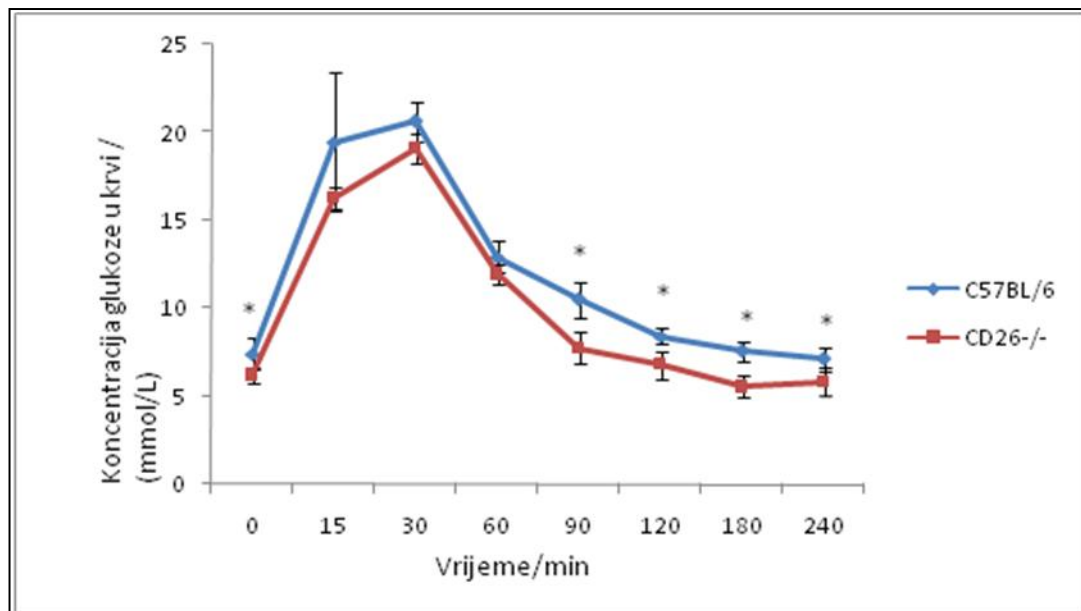


**Slika 15.** Prosječne tjelesne mase ekperimentalnih miševa u uvjetima hiperglikemije (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija)  
 \*, statistički značajna razlika između sojeva ekperimentalnih miševa (C57BL/6) ( $p < 0,05$ )

#### 4.1.2. Intraperitonealni test tolerancije glukoze

Intraperitonealni test tolerancije glukoze proveden je kod oba soja ekperimentalnih miševa radi praćenja utjecaja DPP IV/CD26 na koncentraciju glukoze u krvi. Uočeno je kako su C57BL/6 životinje u svim vremenskim intervalima mjerenja imali višu koncentraciju glukoze u krvi. U vremenu od 15 i 30 minuta nakon aplikacije otopine glukoze primijećeno je da su kod oba soja miševa razine glukoze najveće. 30 minuta nakon aplikacije otopine glukoze primijećeno je kako u oba soja miševa pada razina glukoze u krvi, a 240 minuta nakon aplikacije otopine glukoze razina glukoze postiže početno stanje, to jest razinu izmjerenu

prije aplikacije otopine glukoze. Kod CD26<sup>-/-</sup> miševa koji su prethodno gladovali 16 sati, u 0. minuti, tj. početnoj točki mjerenja, primijećena je statistički značajno niža razina glukoze u krvi ( $p < 0,05$ ) u odnosu na divlji tip životinja. Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) je također primijećena u 90-toj, 120-toj, 180-toj i 240-toj minuti nakon aplikacije otopine glukoze između C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa.

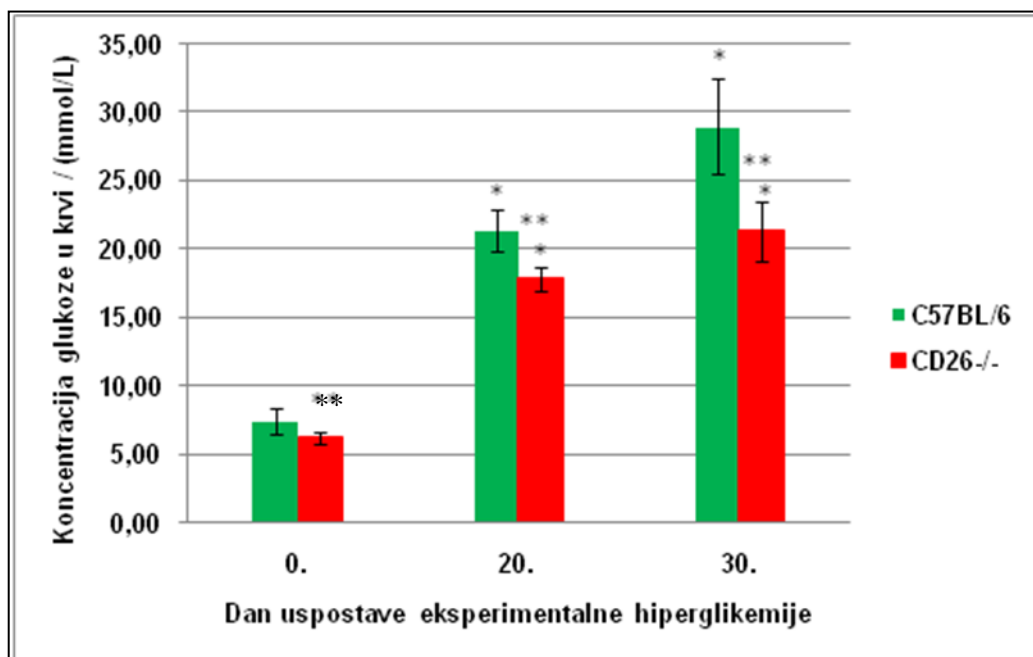


**Slika 16.** Koncentracije glukoze izmjerene u krvi oba soja eksperimentalnih miševa tijekom intraperitonealnog testa tolerancije glukoze  
\*, statistički značajna razlika između sojeva eksperimentalnih miševa ( $p < 0,05$ )

#### 4.1.3. Pokusni model dijabetesa

Tijekom procesa uspostavljanja dijabetesa svim eksperimentalnim miševima pratila se razina glukoze u krvi svakog dana od dana aplikacije otopine streptozocina pa sve do dana žrtvovanja. Isto tako pratili su se karakteristični klinički znakovi dijabetesa poput poliurije, polidipsije, polifagije te tipičan, po ketonskim tijelima miris mokraće. U oba soja eksperimentalnih miševa je nakon

približno 30 dana od dana aplikacije otopine streptozocina potvrđen uspješno induciran model dijabetesa. Tijekom mjerenja glukoze u krvi utvrđeno je kako postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u koncentracijama glukoze već na dan aplikacije otopine streptozocina, pri čemu su C57BL/6 imali značajno veću koncentraciju glukoze u krvi u odnosu na CD26<sup>-/-</sup> miševe. Isto tako, 20 dana nakon aplikacije otopine streptozocina izmjerene su statistički značajno veće ( $p < 0,05$ ) razine glukoze kod C57BL/6 miševa u odnosu na CD26<sup>-/-</sup> miševe, a u oba soja postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na fiziološke uvjete. Najveća statistički značajna razlika u razini glukoze u krvi izmjerena je 30. dana pri čemu su C57BL/6 miševi imali znatno višu razinu glukoze u odnosu na CD26<sup>-/-</sup> miševe. Na isti dan je također prisutna i statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) kod oba soja u odnosu na fiziološke uvjete (Slika 17).



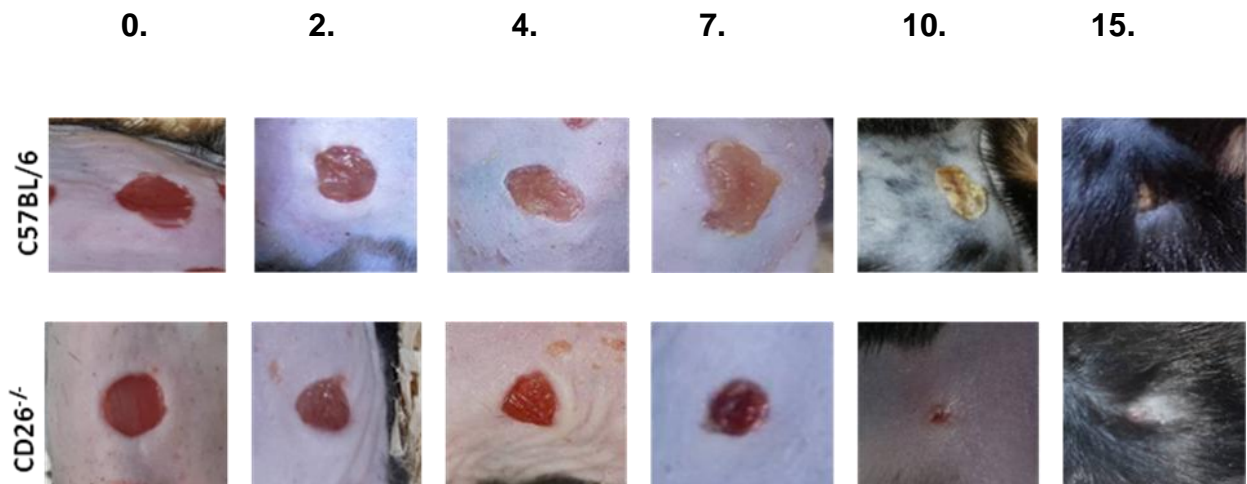
**Slika 17.** Koncentracije glukoze u krvi u različitim danima uspostave pokusnog modela dijabetesa

\* , statistički značajna razlika u odnosu na fiziološke uvjete ( $p < 0,05$ )  
\*\* , statistički značajna razlika u odnosu na divlji tip životinja ( $p < 0,05$ )

## 4.2. Model cijeljenja rana

### 4.2.1. Makroskopski prikaz cijeljenja rana eksperimentalnih miševa u hiperglikemiji

Eksperimentalnim miševima su radi praćenja utjecaja DPP IV/CD26 na proces cijeljenja rana u uvjetima hiperglikemije na dorzalnom dijelu tijela inducirane rane jednakog promjera. Makroskopske promjene rana koje su nastale tijekom procesa cijeljenja rana svakog su dana fotografirane i praćene kroz 15 dana (Slika 18). Primijećeno je kako su rane relativno bolje zacijelile kod CD26<sup>-/-</sup> miševa nego kod C57BL/6 soja miševa, što je izraženo četvrtog, sedmog i najviše desetog dana od dana ranjavanja. Zatim na Slici 19 je vidljivo da je kod C57BL/6 miša došlo do pojave kroničnog ulkusa koji ni tijekom 15 dana nije zacijelio.



**Slika 18.** Makroskopski prikaz rana kod oba soja eksperimentalnih miševa u različitim danima



**Slika 19.** Makroskopski prikaz kroničnog ulkusa nastalog kod CD26<sup>-/-</sup> miša u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije tijekom petnaestog dana procesa cijeljenja rana

#### **4.2.2. Mikroskopski prikaz cijeljenja rana eksperimentalnih miševa u uvjetima hiperglikemije**

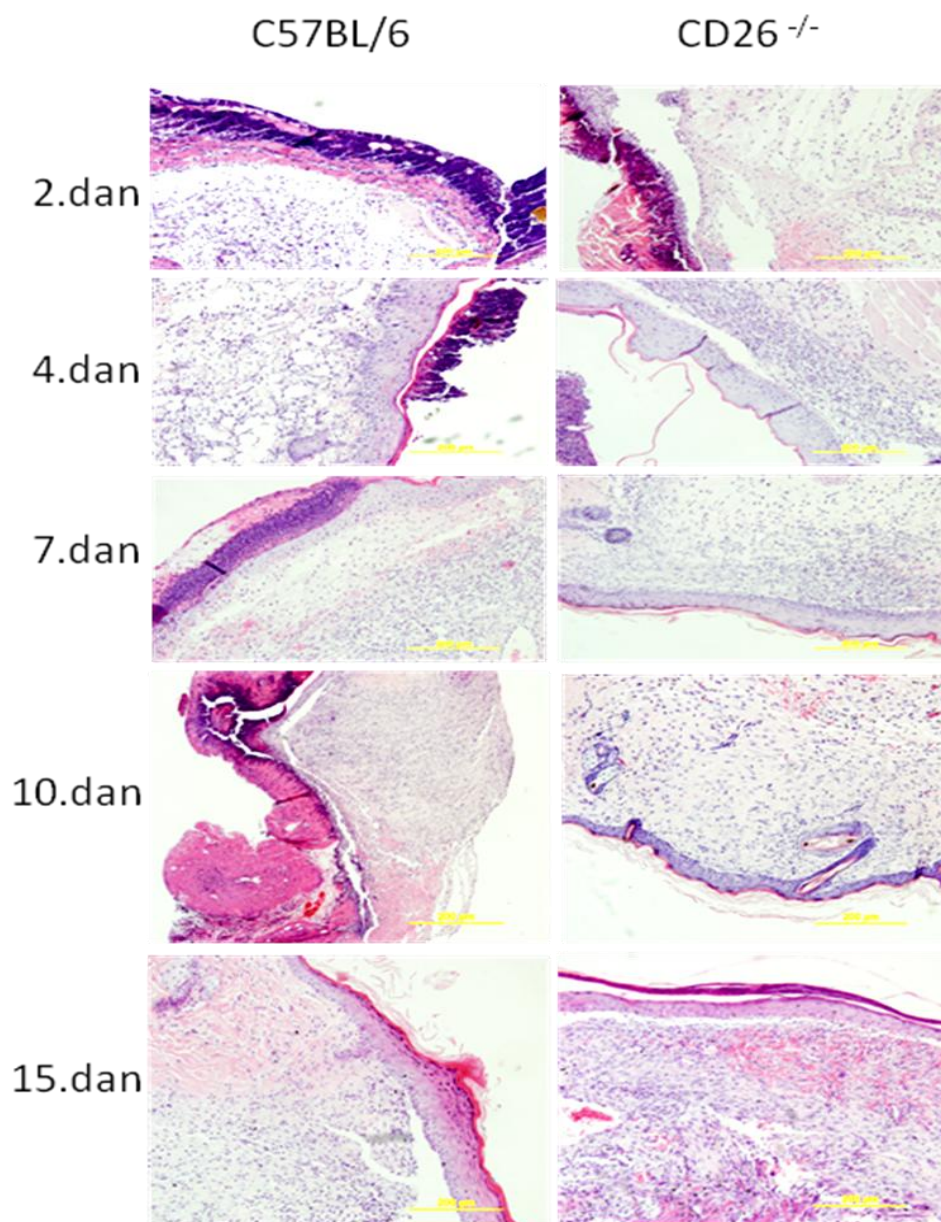
Kako bi utvrdili postoje li značajnije razlike u cijeljenju rana između sojeva C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> u uvjetima hiperglikemije u oba soja miševa uzorci rana nakon fiksacije paraformaldehidom te dobiveni parafinskom postupkom su histopatološki analizirani. Pokazano je kako je u području koriuma došlo do postupnog cijeljenja tkiva uz obnovu osnovne tvari i vlaknatih dijelova matriksa te nastanka ožiljkastog tkiva kao i do reepitelizacije epidermisa kod oba ispitivana soja pokusnih životinja.

Tijekom zadanog vremenskog razdoblja primijećene su razlike u cijeljenju rana između sojeva. Kod CD26<sup>-/-</sup> miševa primijećen je relativno brži nastanak novog epitelnog sloja te prekrivanje rane u odnosu na C57BL/6 miševe. Kod C57BL/6 miševa sporije dolazi do uslojavanja epitela do očekivanog izgleda



mnogoslojnog pločastog epitela, što se primjećuje 4. i 7. dana kada je on ponešto tanji dok 10. dana cijeljenja dolazi do njegove nagle hipertrofije. Površinsko stvaranje keratiniziranog sloja je otežano radi ostataka fibrina te propalih stanica koriuma koje prekrivaju novonastali epidermis. Nasuprot tome, kod CD26<sup>-/-</sup> miševa je 15-tog dana epidermis gotovo potpuno obnovljen te se mogu primijetiti izražene vezivnotkivne papile kao i dlačni folikuli koji su u početnoj fazi rasta.

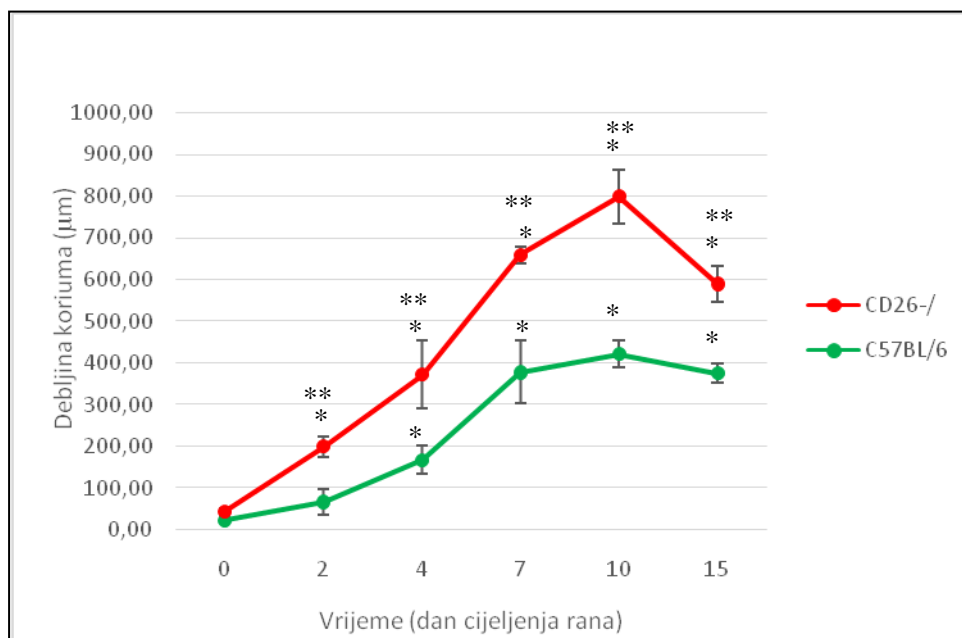
U području dermisa su također primijećene razlike između C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa. Kod CD26<sup>-/-</sup> miševa u početnoj fazi cijeljenja uočeno je jače bujanje veziva, dok je u kasnijim danima cijeljenja došlo do njegovog smanjivanja kao rezultat bržeg povlačenja edema i uspostavljanja čvrste mreže vlakana ECM čime je stvoren preduvjet za brži i kvalitetniji nastanak ožiljka. U području koriuma kod CD26<sup>-/-</sup> miševa 15. dana cijeljenja rana moguće je razlikovati retikularni sloj koriuma od papilarnog sloja, što kod C57BL/6 miševa nije moguće (Slika 20).



**Slika 20.** Histološki prikaz ranjenog područja nakon kod oba soja eksperimentalnih miševa u uvjetima hiperglikemije; HE bojenje, povećanje 200X

Histološki uzorci kontrolne kože i ranjenog područja C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa s eksperimentalnom hiperglikemijom su tijekom različitih dana cijeljenja rana analizirani histomorfometrijskom metodom. Podaci koji su dobiveni pokazuju

kako između ispitivanih životinja ne postoji statistički značajna razlika u debljini koriuma nulti dan prije ranjavanja tj. u kontrolnim kožama. Može se vidjeti kako drugog dana cijeljenja rana kod CD26<sup>-/-</sup> miševa postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na debljinu koriuma kod C57BL/6 miševa, te u odnosu na nulti dan istog soja prije ranjavanja. U sljedećim danima cijeljenja rana kod oba soja je zabilježen porast debljine koriuma, sve do desetog dana kada postiže svoju najveću vrijednost, nakon čega opada. Četvrtog, sedmog, desetog i petnaestog dana od ranjavanja, kod oba soja miševa se debljina koriuma statistički značajno razlikuje ( $p < 0,05$ ) od debljine koriuma prije ranjavanja miševa. U navedenim danima debljina koriuma je kod CD26<sup>-/-</sup> miševa statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ) od debljine koriuma C57BL/6 miševa, što upućuje na činjenicu kako CD26<sup>-/-</sup> miševi ostvaruju bolji i brži oporavak ranjenog područja (Slika 21).



**Slika 21.** Grafički prikaz debljine koriuma u C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> soju životinja za ispitane dane cijeljenja rana u uvjetima hiperglikemije.

\*-statistički značajna ( $p < 0,05$ ) razlika u odnosu na kontrolnu skupinu

\*\* - statistički značajna ( $p < 0,05$ ) razlika u odnosu na divlji tip životinja za ispitivani dan cijeljenja rana

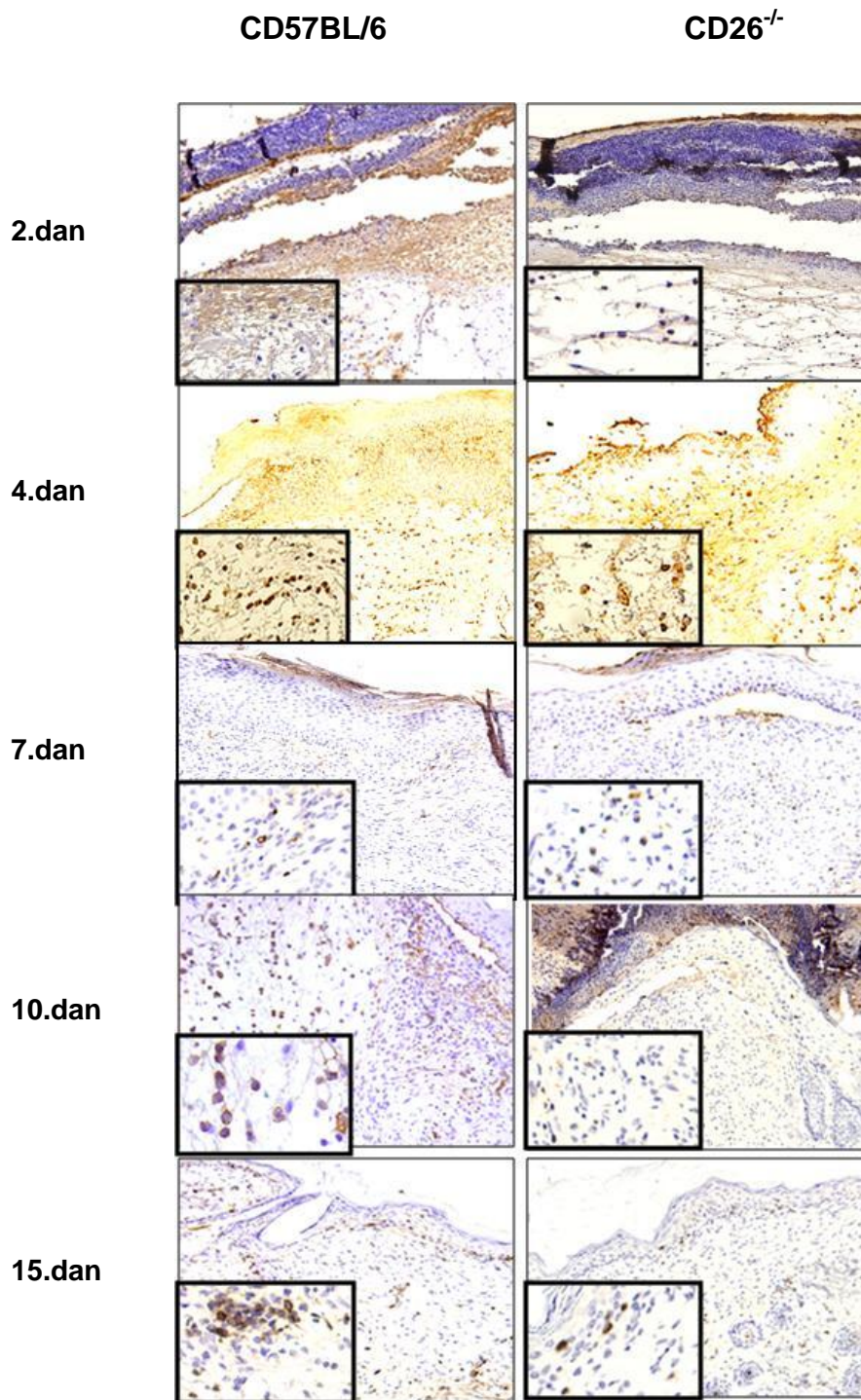
#### **4.2.3. Utjecaj nedostatka DPP IV/CD26 na imunski sustav**

Kako bi utvrdili utječe li nedostatak DPP IV/CD26 na izražaj makrofaga i limfocita T te postoje li razlike u njihovom izražaju među ispitivanim sojevima miševa korištena je imunohistokemijska metoda dokaza CD3 i F4/80 pozitivnih stanica na histološkim preparatima.

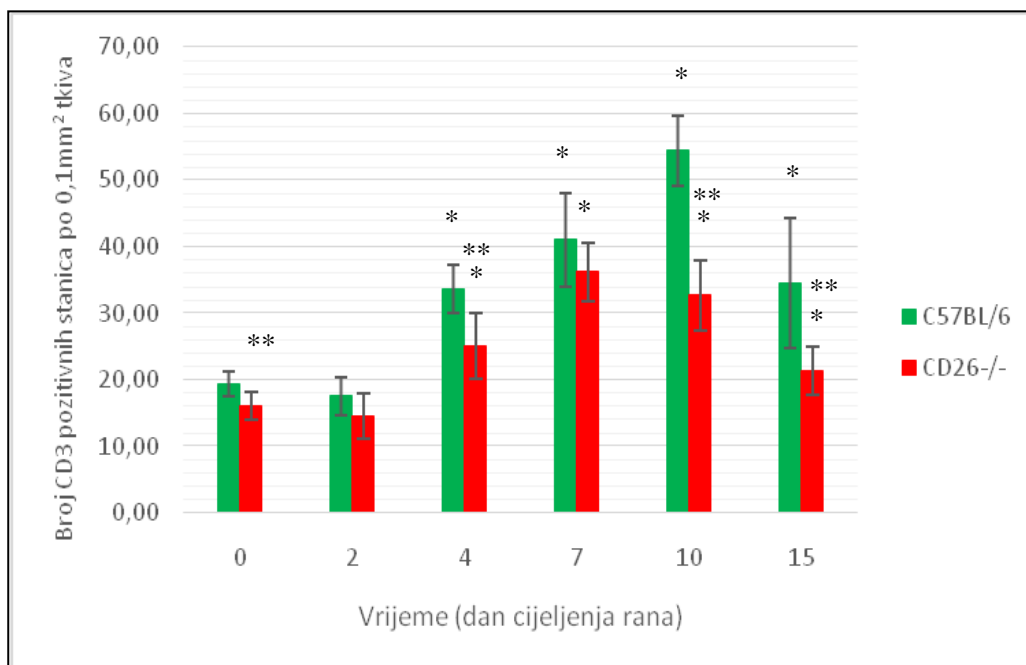
##### **4.2.3.1. Utjecaj nedostatka DPP IV/CD26 na izražaj limfocita T kod miševa s eksperimentalnom hiperglikemijom**

Analizirani su uzorci kože C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa u ispitivanim danima u uvjetima hiperglikemije, gdje je dobiven imunohistološki prikaz CD3 pozitivnih stanica koje su vizualizirane DAB-om uz kontrastno bojanje hematoksilinom (Slika 22). Na Slici 23 se može vidjeti kako je kod CD26<sup>-/-</sup> miševa broj CD3 pozitivnih stanica prije indukcije rana statistički značajno manji ( $p < 0,05$ ) u odnosu na C57BL/6 miševe. Četvrtog dana od ranjavanja kod oba soja miševa je zabilježena statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine, a kod CD26<sup>-/-</sup> miševa i statistički značajno niža razina CD3 stanica ( $p < 0,05$ ) u odnosu na divlji tip. Nadalje, sedmog dana od ranjavanja izražaj CD3 pozitivnih stanica kod C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa je i dalje statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) u odnosu na nulti dan prije ranjavanja. Kod CD26<sup>-/-</sup> miševa je desetog dana najviše istaknuta statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u izražaju CD3 pozitivnih stanica u

odnosu na divlji tip životinja. Tog dana se može vidjeti kako je kod C57BL/6 miševa broj limfocita T najveći, te se oba soja miševa statistički značajno razlikuju od odgovarajućih kontrolnih skupina. U daljnjim danima dolazi do pada broja CD3 pozitivnih stanica, pri čemu je petnaestog dana kod CD26<sup>-/-</sup> miševa njihov broj ponovno statistički značajno niži ( $p < 0,05$ ) nego kod divljeg tipa, što potvrđuje prethodna istraživanja o utjecaju DPP IV/CD26 na aktivaciju proliferacije limfocita T.



**Slika 22.** Uzorci kože C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miša u ključnim danima po nastanku rane, u uvjetima hiperglikemije, imunohistološki prikaz CD3 pozitivnih stanica; vizualizacija DAB-om, kontrastno bojanje hematoksilinom, povećanje 100x



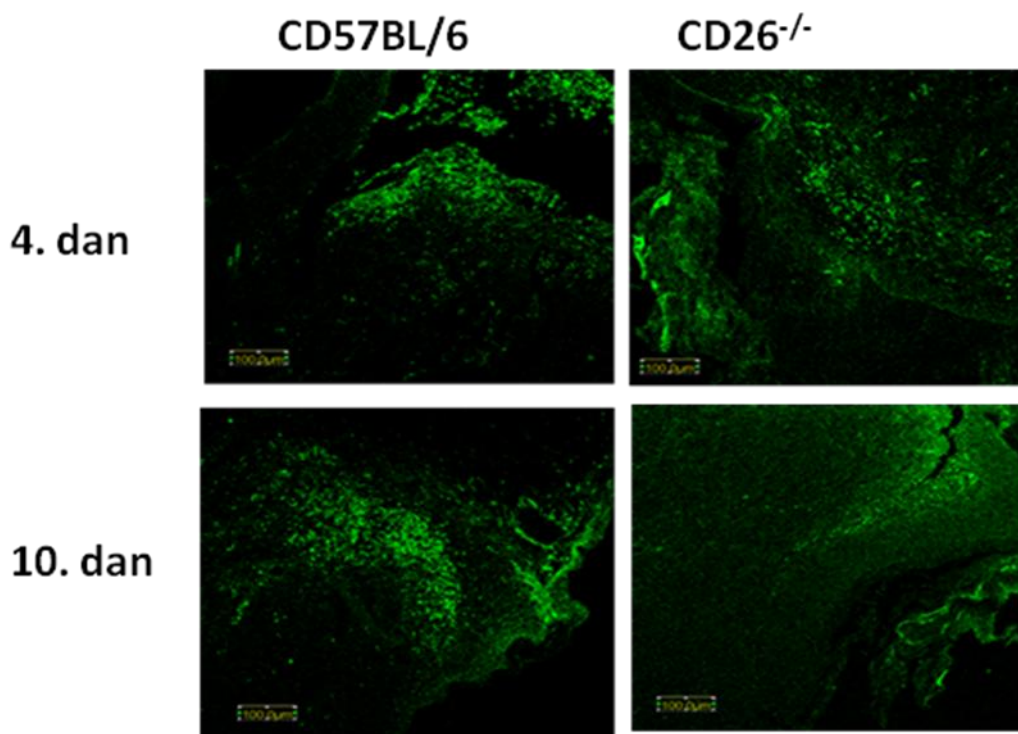
**Slika 23.** Grafički prikaz CD3 pozitivnih stanica kod C57/BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa u ključnim danima po nastanku rane, u uvjetima hiperglikemije. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. \*-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu (p<0,05). \*\* - statistički značajna (p<0,05) razlika u odnosu na divlji tip životinja za ispitivani dan cijeljenja rana.

#### 4.2.3.2. Utjecaj nedostatka DPP IV/CD26 na izražaj makrofaga kod miševa s ekperimentalnom hiperglikemijom

Tijekom svih ključnih dana od indukcije rana analiziran je i kvantificiran broj F4/80 pozitivnih stanica po jedinici površine tkiva, koji je određen metodom imunofluorescencije na histološkim uzorcima C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa (Slika 24). Nultog dana prije indukcije rana nije primijećena razlika među kontrolnim skupinama životinja. Vidljivo je kako su F4/80 pozitivne stanice drugog dana od ranjavanja statistički značajno brojnije (p<0,05) kod CD26<sup>-/-</sup> miševa nego kod

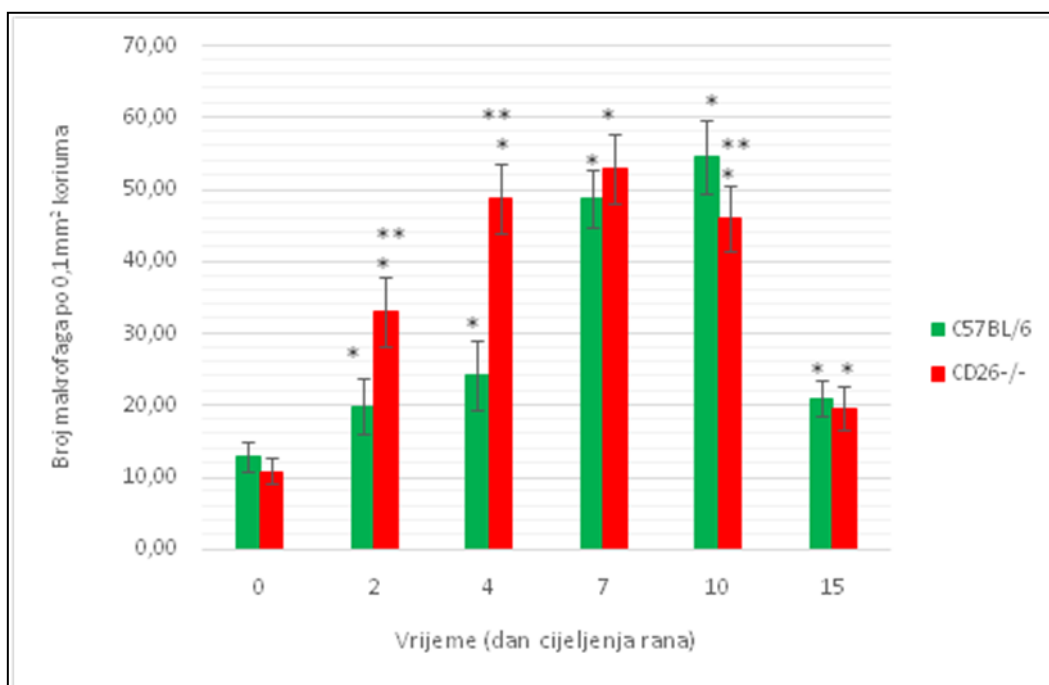


C57BL/6 miševa. Njihov broj nastavlja rasti te je četvrtog statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) kod CD26<sup>-/-</sup> miševa u odnosu na divlji tip, a kod istog soja sedmog dana postiže najvišu vrijednost te nakon toga počinje opadati. Desetog dana je također primjećen statistički značajno niži broj F4/80 pozitivnih stanica kod CD26<sup>-/-</sup> miševa, a kod divljeg tipa tada postiže najvišu vrijednost nakon čega se do petnaestog dana smanjuje za više od polovice vrijednosti. Statistički značajna razlika je zabilježena kod oba soja miševa u odnosu na kontrolne skupine drugog, četvrtog, sedmog, desetog i petnaestog dana od ranjavanja (Slika 25).



**Slika 24.** Karakterističan prikaz izražaja F4/80 pozitivnih stanica nakon četiri i deset dana od induciranja rana kod oba soja pokusnih životinja; imunofluorescencija, primarno protutijelo obilježeno FITC-om

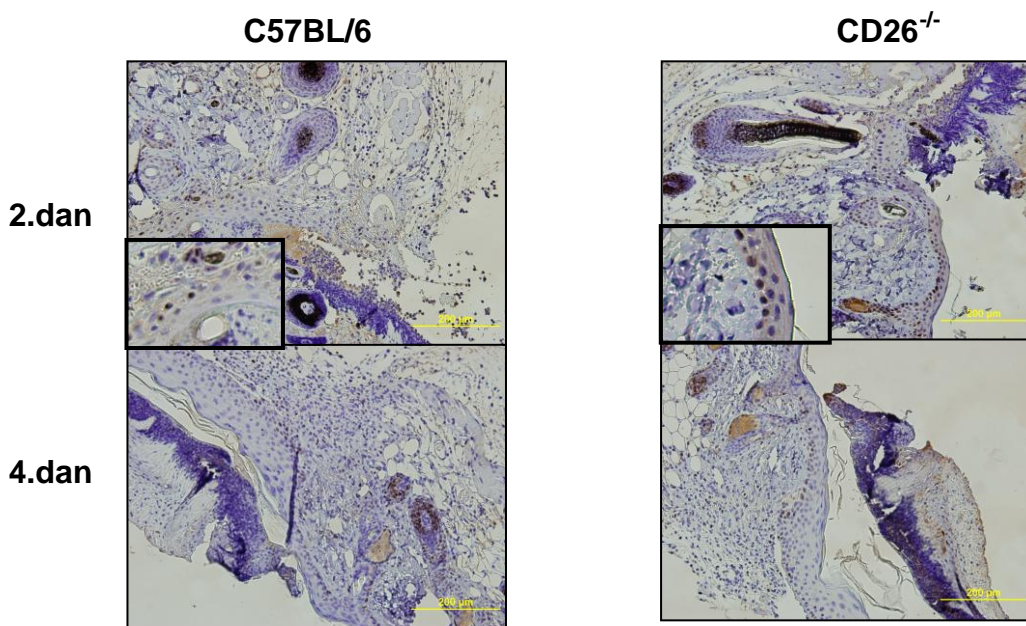




**Slika 25.** Grafički prikaz broja F4/80 pozitivnih stanica nakon dva, četiri, sedam, deset i petnaest dana od induciranja rana kod oba soja eksperimentalnih miševa \*-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ) \*\* - statistički značajna ( $p < 0,05$ ) razlika u odnosu na divlji tip životinja za ispitivani dan cijeljenja rana

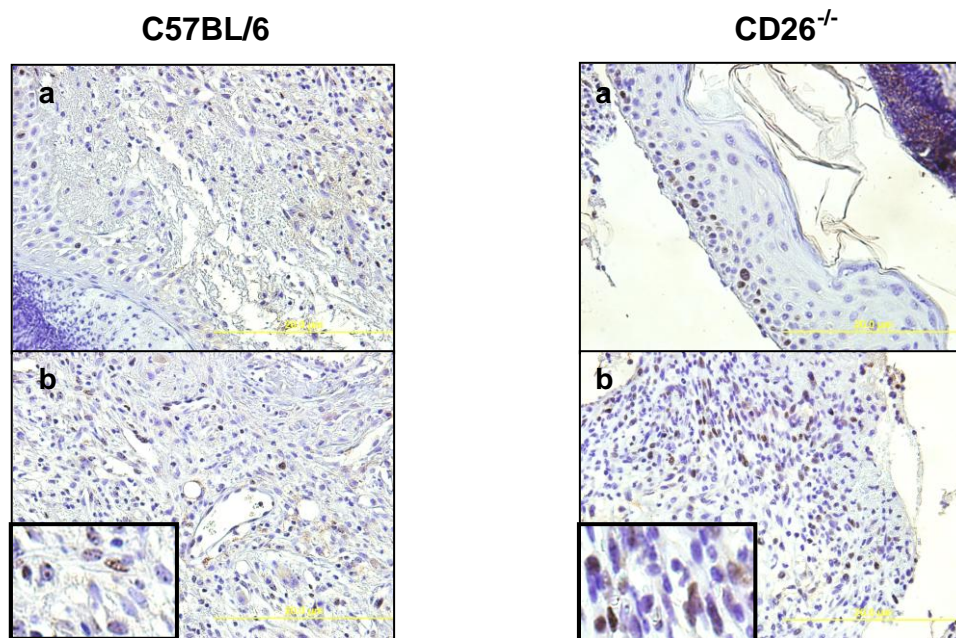
#### 4.2.3.3. Proliferacija stanica bazalnog sloja epidermisa kod ispitanih miševa s eksperimentalnom hiperglikemijom

U cilju dobivanja podataka o razini proliferacije bazalnog sloja epidermisa kao i u vezivu koriuma, histološke uzorke CD26<sup>-/-</sup> i C57BL/6 miševa smo analizirali imnohistokemijski, gdje smo vizualizirali Ki67 pozitivne stanice. Cilj je bio utvrditi postoje li razlike između ispitivanih sojeva pokusnih životinja u uvjetima hiperglikemije, te utječe li nedostatak DPP IV/CD26 na razinu proliferacije. Slika 26 prikazuje mikroskopski prikaz Ki67 pozitivnih stanica drugog i četvrtog dana od dana ranjavanja eksperimentalnih miševa.



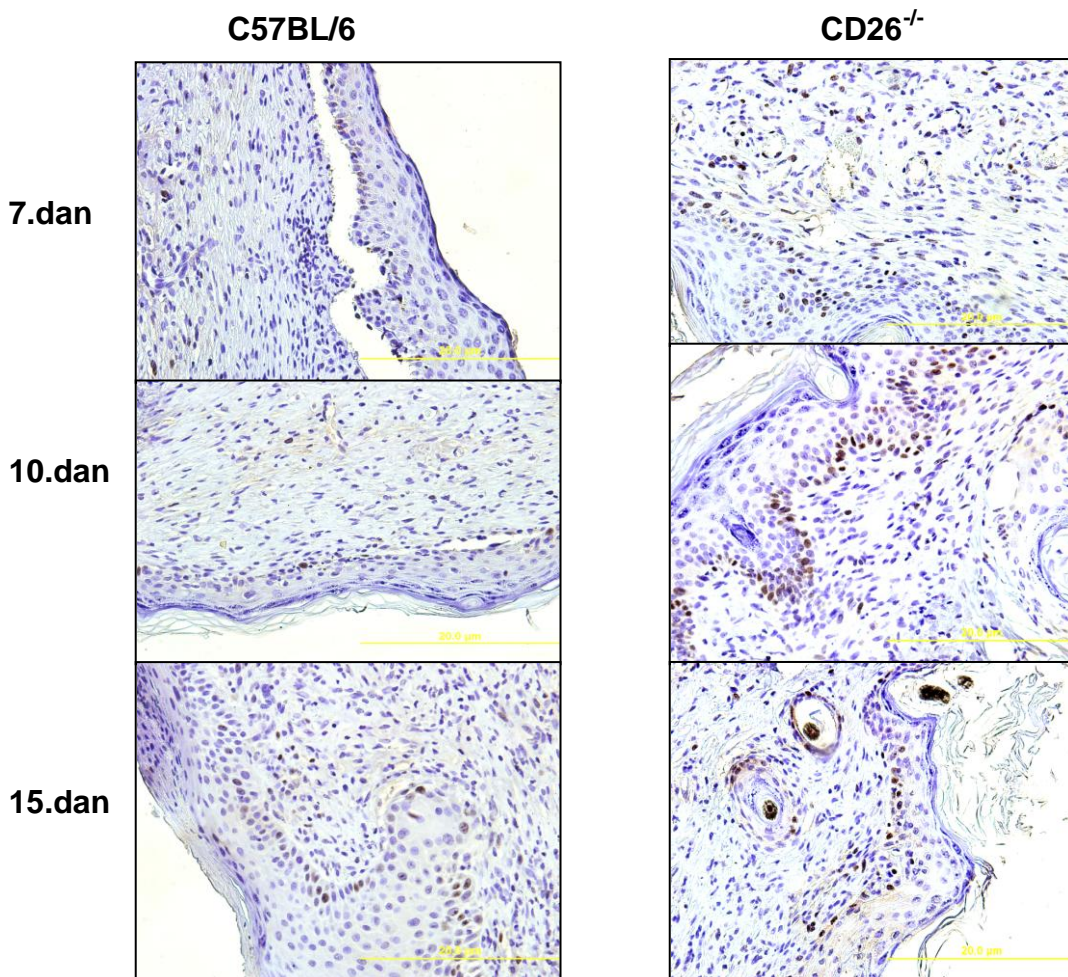
**Slika 26.** Mikroskopski prikaz Ki67 pozitivnih stanica kod C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije drugog i četvrtog dana od indukcije rana; imunohistološka metoda, vizualizacija s DAB-om uz kontrastno bojanje hematoksilinom, povećanje 100x

Na Slici 27 može se vidjeti razlika u izražaju Ki67 pozitivnih stanica u bazalnom sloju epidermisa i u koriumu kod oba soja miševa s dijabetesom tijekom četvrtog dana od indukcije rana. Vidljivo je kako je izražaj Ki67 pozitivnih stanica u odsutnosti DPP IV/CD26 značajno veći nego li u divljem tipu miševa, što upućuje na činjenicu kako je proliferacija stanica bazalnog sloja epidermisa izraženija kod CD26<sup>-/-</sup> miševa.



**Slika 27.** Mikroskopski prikaz Ki67 pozitivnih stanica kod C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije četvrtog dana od indukcije rana u bazalnom sloju epidermisa i u koriumu; imunohistološka metoda, vizualizacija s DAB-om uz kontrastno bojanje hematoksilinom, povećanje 200x  
**a-** mikroskopski prikaz Ki67 pozitivnih stanica u epidermisu  
**b-** mikroskopski prikaz Ki67 pozitivnih stanica u koriumu

Slika 28 prikazuje izražaj Ki67 pozitivnih stanica sedmog, desetog i petnaestog dana od ranjavanja eksperimentalnih miševa. Primijećeno je kako je kod CD26<sup>-/-</sup> miševa izražaj Ki67 pozitivnih stanica gotovo dvostruko viši u odnosu na divlji soj sedmog dana od ranjavanja, a nakon toga njihov broj postupno opada.

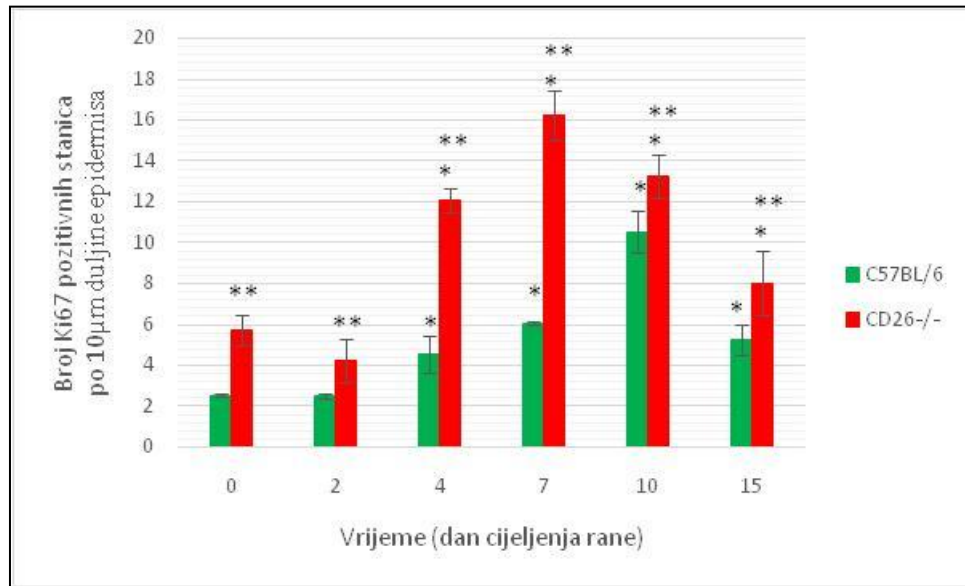


**Slika 28.** Mikroskopski prikaz Ki67 pozitivnih stanica u tkivu kože kod C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije sedmog, desetog i petnaestog dana od indukcije rana; imunohistološka metoda, vizualizacija s DAB-om uz kontrastno bojanje hematoksilinom, povećanje 200x

Uzorci tkiva ispitivanih sojeva miševa u uvjetima hiperglikemije su također analizirani i histomorfometrijski, čime je broj Ki67 pozitivnih stanica kvantificiran kako bi dobili detaljnije podatke o razini proliferacije. Na Slici 29 je grafički prikazan broj Ki67 pozitivnih stanica u bazalnom sloju epidemisa kod C57BL/6 i



CD26<sup>-/-</sup> miševa u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije tijekom ključnih dana cijeljenja rana.

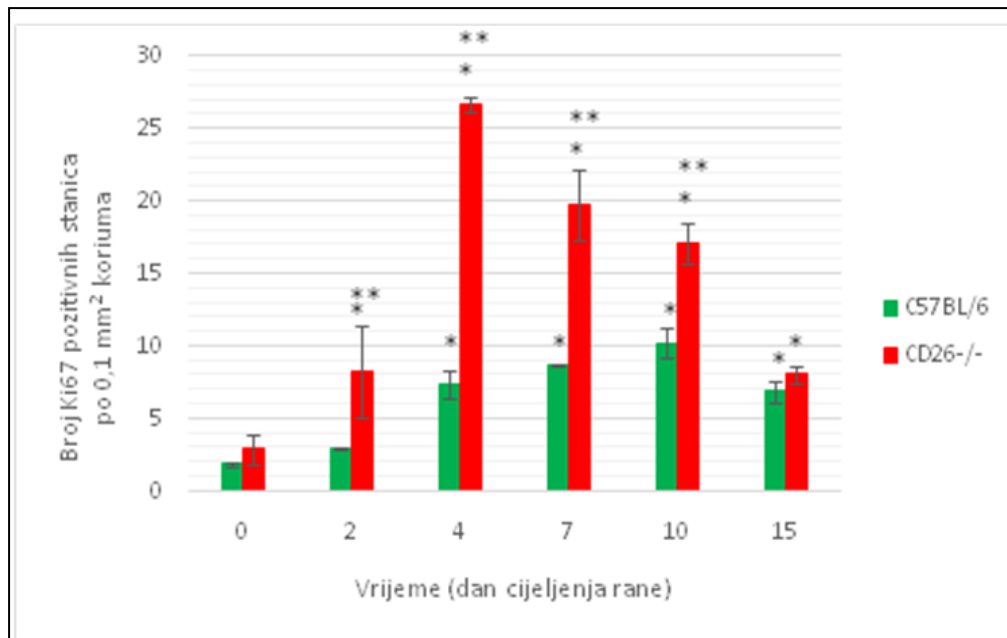


**Slika 29.** Grafički prikaz Ki67 pozitivnih stanica po 10 μm dužine bazalnog sloja epidermisa kod C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije u ključnim danima cijeljenja rana  
\*-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ )  
\*\*- statistički značajna ( $p < 0,05$ ) razlika u odnosu na divlji tip životinja za ispitivani dan cijeljenja rana

Primijećeno je kako bazalni sloj epidermisa CD26<sup>-/-</sup> miševa u uvjetima hiperglikemije već nultog dana sadrži statistički značajno veći broj ( $p < 0,05$ ) proliferirajućih stanica u odnosu na C57BL/6 soj. Razlika se može vidjeti tijekom cijelog vremenskog perioda istraživanja. Razina proliferirajućih stanica je drugog statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ) u svim ispitivanim točkama u usporedbi s divljim tipom miševa. Izražaj Ki67 četvrtog dana od ranjavanja gotovo je tri puta veća u CD26<sup>-/-</sup> životinje odnosu na C57BL/6. U oba soja je prisutna statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolne skupine životinja tijekom četvrtog,

sedmog, desetog i petnaestog dana cijeljenja rana. CD26<sup>-/-</sup> miševi svoj maksimalni izražaj postižu sedmog dana cijeljenja rana nakon čega njihov broj postupno opada. Izražaj Ki67 pozitivnih stanica je također statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) u odnosu na divlji tip i u sljedećim danima (sedmog, desetog i petnaestog dana). Maksimalni izražaj Ki67 pozitivnih stanica u C57BL/6 miševa je zapažen desetog dana cijeljenja rana, a petnaestog dana poprima polovicu vrijednosti zabilježenu desetog dana cijeljenja rane.

Slika 30 prikazuje grafički prikaz Ki67 pozitivnih stanica u koriumu kod C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije tijekom ključnih dana cijeljenja rana.



**Slika 30.** Grafički prikaz Ki67 pozitivnih stanica po 0,1 mm<sup>2</sup> dužine koriuma kod C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije u ključnim danima cijeljenja rana

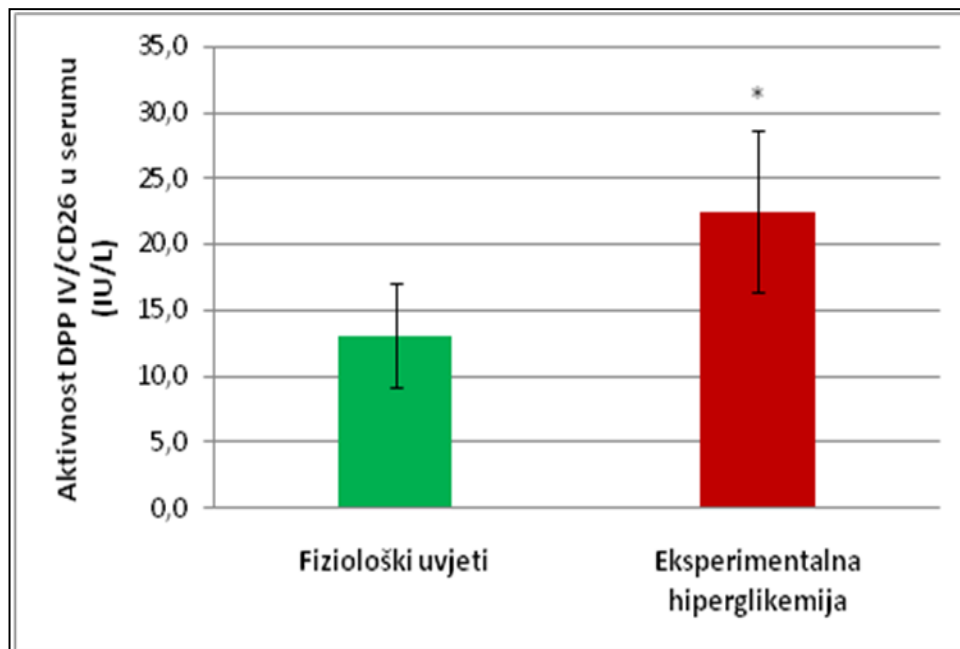
\*-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ )

\*\* - statistički značajna ( $p < 0,05$ ) razlika u odnosu na divlji tip životinja za ispitivani dan cijeljenja rana

CD26<sup>-/-</sup> miševi pokazuju jaču i bržu proliferaciju stanica koriuma nego C57BL/6 miševi što se uočava drugog, četvrtog, sedmog te desetog dana cijeljenja rana, kada je broj proliferirajućih stanica statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) u uvjetima nedostatka DPP IV/CD26 u hiperglikemiji. Drugog dana se primjećuje statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) izražaj Ki67 pozitivnih stanica kod CD26<sup>-/-</sup> miševa s obzirom na nulti dan. Može se primjetiti kako je četvrtog dana nakon ranjavanja njihov broj je čak trostruko veći u uvjetima nedostatka DPP IV/CD26 nego kod divljeg tipa miševa, a zatim postepeno opada. Tijekom četvrtog, sedmog, desetog i petnaestog dana postoji statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) broj navedenih stanica kod oba soja u odnosu na nulti dan prije ranjavanja. Izražaj proliferirajućih stanica kod C57BL/6 postiže svoj maksimum tek desetog dana od ranjavanja, a do petnaestog dana blago opada. Može se zaključiti kako je prisutna velika razlika u izražaju Ki67 pozitivnih stanica između CD26<sup>-/-</sup> i C57BL/6 eksperimentalnih miševa, što upućuje činjenicu kako je proliferacija stanica kod C57BL/6 miševa mnogo sporija i dugotrajnija u odnosu na CD26<sup>-/-</sup> miševe. Tijekom proliferacije stanica u epidermisu C57BL/6 miševa broj proliferirajućih stanica se s vremenom smanjuje, ali je njihov broj nešto veći u koriumu. Kod kontrolnih uzoraka kože broj Ki67 pozitivnih stanica u epidermisu i koriumu se također razlikuje među sojevima.

### 4.3. Enzimska aktivnost serumske DPP IV/CD26 kod C57BL/6 miševa s eksperimentalnim dijabetesom

Tijekom provedenog istraživanja određivana je enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u serumu C57BL/6 miševa u fiziološkim uvjetima te u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije. Na Slici 31 su prikazane dobivene vrijednosti (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija).

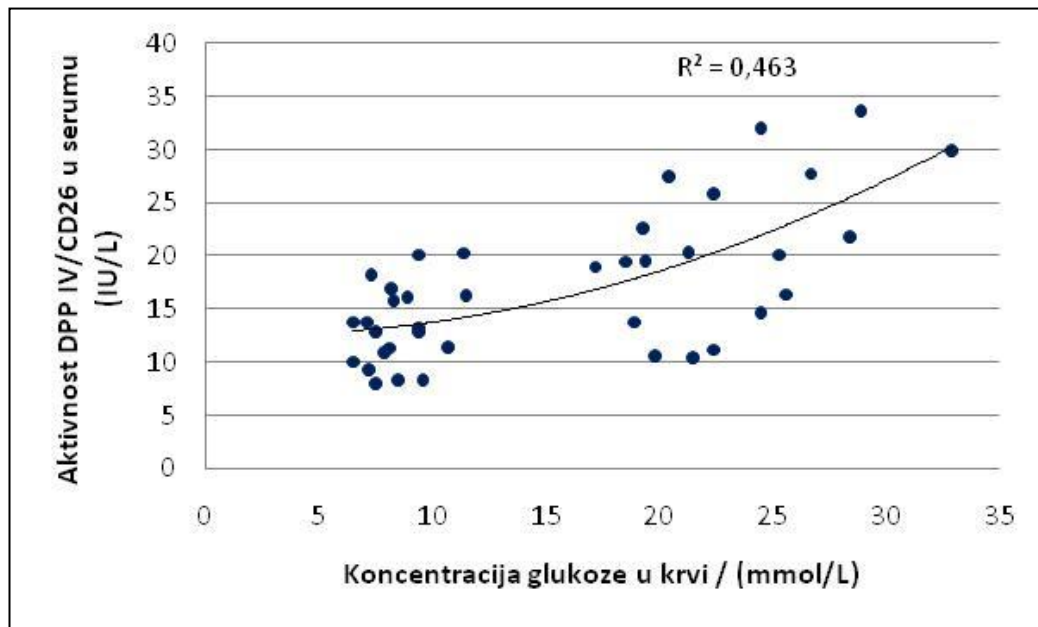


**Slika 31.** Aktivnost DPP IV/CD26 (IU/L) u serumu C57BL/6 miševa u fiziološkim uvjetima te u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije  
\*-statistički značajna razlika u odnosu na fiziološke uvjete ( $p < 0,05$ )

Analizom dobivene vrijednosti pokazuju da je aktivnost DPP IV/CD26 kod miševa s eksperimentalnom hiperglikemijom statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ) u odnosu na C57BL/6 miševe u fiziološkim uvjetima.



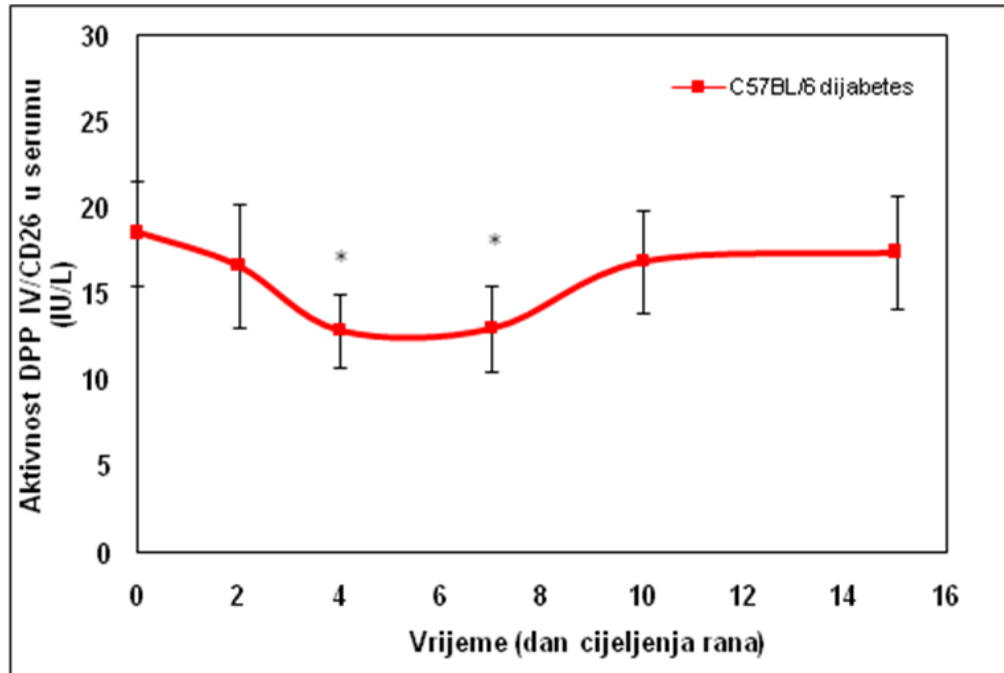
Statističkom obradom podataka analizirane su vrijednosti aktivnosti serumske DPP IV/CD26 i koncentracije glukoze u krvi kod C57BL/6 životinja s eksperimentalno uspostavljenom hiperglikemijom kako bi se mogle utvrditi korelacije između analiziranih parametara. Na Slici 32 je prikazano kako postoji pozitivna korelacija između analiziranih parametara ( $R^2=0,4636$ ), tj., utvrđeno je kako enzimska aktivnost serumske DPP IV/CD26 raste proporcionalno s koncentracijom glukoze u krvi.



**Slika 32.** Korelacija aktivnosti DPP IV/CD26 u serumu i koncentracije glukoze u krvi kod C57BL/6 miševa ( $R^2=0,4636$ )

Također je određivana i aktivnost serumske DPP IV/CD26 tijekom promatranog razdoblja kod C57BL/6 miševa s eksperimentalno uspostavljenim dijabetesom koji nisu bili ranjavani (kontrolna skupina), te kod istog soja miševa s dijabetesom kod kojih je praćen proces cijeljenja rana. Slika 33 prikazuje

dobivene vrijednosti enzimске aktivnosti DPP IV/CD26 kontrolne skupine te one izmjerene drugog, četvrtog, sedmog, desetog i petnaestog dana cijeljenja rana.



**Slika 33.** Aktivnost DPP IV/CD26 (IU/L) u serumu kontrolne skupine C57BL/6 miševa u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije tijekom procesa cijeljenja rana \*, statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu (0. dan)

Rezultati dobiveni statističkom analizom pokazuju kako je kod ranjavanih C57BL/6 miševa s dijabetesom četvrtog i sedmog dana od indukcije rana enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u serumu statistički značajno niža ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. Nakon sedmog dana aktivnost serumske DPP IV/CD26 počinje ponovno rasti na vrijednost izmjerenu kod kontrolne skupine te do petnaestog dana postiže približno jednake vrijednosti.

## 5. RASPRAVA

Dijabetes (lat. *diabetes mellitus*) metabolička je bolest uzrokovana nedostatkom i/ili poremećajem lučenja inzulina do kojeg dolazi zbog niza patogenih procesa poput autoimune destrukcije  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočića gušterače ili abnormalnosti koje uzrokuju rezistenciju na djelovanje inzulina. Radi nedostatnog djelovanja inzulina dolazi do poremećaja metabolizma ugljikohidrata, bjelančevina i masti što uzrokuje hiperglikemiju koja je osnovna značajka dijabetesa. Rani simptomi hiperglikemije su poliurija, polidipsija, zamagljen vid te gubitak težine koji može biti i u kombinaciji s polifagijom (1).

Komplikacije kod osoba koje boluju od dijabetesa uzrokovane su oštećenjem makrovaskularnog i mikrovaskularnog sustava u ciljnim organima. Među vodećim uzrokom smrti dijabetičara ubrajaju se kardiovaskularne bolesti, odnosno hipertenzija te dislipidemija. Mikrovaskularne komplikacije najviše oštećuju periferne živce, bubrege te mrežnicu što uzrokuje neuropatiju, nefropatiju te retinopatiju (3). Kronični ulkus se pojavljuje u 15 % dijabetičara te uzrokuje 84 % ukupnih amputacija donjih ekstremiteta (5). Cijeljenje rana kod dijabetičara radi oslabljenih mehanizama regeneracije tkiva još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno, no dosadašnjim istraživanjima se pokazalo da inhibicija DPP IV/CD26 ima pozitivan učinak na navedeni proces (113).

Dipeptidil-peptidaza IV je transmembranski protein koji ima veliku važnost u procesu cijeljenja rana te u metabolizmu glukoze. Izražava se na različitim stanicama poput endotelnih i imunskih stanica. Ima ulogu u procesima angiogeneze, adhezije, migracije i apoptoze stanica važnih tijekom cijeljenja

ranjenog tkiva (83), utječe na sazrijevanje i diferencijaciju limfocita T (88), razgrađuje GLP-1 inzulintropni polipeptid koji je ovisan o glukozu (48) te igra ulogu receptora za kolagen i fibronektin (16, 83). Inhibitori DPP IV koji se primjenjuju u terapiji šećerne bolesti omogućuju bolju glikemijsku kontrolu tako što sprječavaju razgradnju inkretina, što je od velike važnosti u kliničkoj praksi.

Pretpostavka ovog istraživanja, temeljem prethodnih saznanja o funkcijama DPP IV/CD26 jest da ova molekula ima važnu ulogu u modulaciji imunskog odgovora u procesu cijeljenja rana u hiperglikemiji. Cilj je bio istražiti utječe li nedostatak DPP IV/CD26 na cijeljenje rana kod miševa s uspostavljenim pokusnim dijabetesom. Osim makroskopskih i mikroskopskih promjena, praćen je izražaj limfocita T i makrofaga kako bi vidjeli postoje li promjene u izražaju imunskih stanica u uvjetima hiperglikemije te utječe li molekula DPP IV/CD26 svojim kostimulacijskim djelovanjem na njihov izražaj. Ispitana je i aktivnost DPP IV/CD26 u serumu divljeg tipa miševa u uvjetima hiperglikemije.

Tijekom ovog istraživanja, nisu primijećene fenotipske razlike između C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa. Također nisu uočene niti razlike u razmnožavanju i drugim fiziološkim procesima te životnom vijeku čime su potvrđena prethodno provedena istraživanja (115). Međutim, primijećeno je kako CD26<sup>-/-</sup> miševi imaju statistički značajno manju ( $p < 0,05$ ) tjelesnu masu nego C57BL/6 životinje u uvjetima hiperglikemije, što je u skladu s istraživanjima koja ukazuju na činjenicu kako CD26<sup>-/-</sup> životinje pokazuju bolju toleranciju glukoze zbog duljeg životnog vijeka inkretina zbog čega se lučenje inzulina povećava što utječe pozitivno na glikemijsku kontrolu (93). Intraperitonealni test tolerancije glukoze koji je proveden

kod oba soja eksperimentalnih miševa u uvjetima hiperglikemije pokazuje kako je koncentracija glukoze kod C57BL/6 miševa u svim točkama mjerenja bila veća u usporedbi s CD26<sup>-/-</sup> miševima. Dobivene vrijednosti potkrepljuju provedena istraživanja o pozitivnom učinku inhibitora DPP IV/CD26 na smanjenje koncentracije glukoze u krvi što omogućuje bolju glikemijsku kontrolu (44).

Prilikom aplikacije streptozocina u citratnom puferu kod C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa je praćena razina glukoze, koja je 20. i 30. dana od aplikacije bila statistički značajno viša ( $p < 0,05$ ) kod oba soja u usporedbi s kontrolnim skupinama. Razina glukoze je kod CD26<sup>-/-</sup> miševa bila statistički značajno niža ( $p < 0,05$ ) nego kod divljeg tipa, čime se također zaključuje kako je u uvjetima nedostatka DPP IV/CD26 tolerancija glukoze bolja.

Dosadašnja istraživanja pokazuju kako je u uvjetima hiperglikemije proces cijeljenja rana otežan. Posljedice koje nastaju uslijed hiperglikemije, poput mikroangiopatije, makroangiopatije te neuropatije, onemogućuju prikladnu opskrbu tkiva kisikom i hranjivim tvarima što dodatno utječe na brzinu oporavka ranjenog tkiva. Poznato je kako DPP IV/CD26 sudjeluje u ključnim procesima važnim za cijeljenje rana kao što su proliferacija, angiogeneza, apoptoza i migracija stanica (92).

Eksperimentalnim miševima su interskapularno inducirane rane kako bismo utvrdili postoji li utjecaj odsutnosti DPP IV/CD26 na proces cijeljenja u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije. Razlike u cijeljenju rana među sojevima su praćene makroskopskom i mikroskopskom analizom u određenom vremenskom periodu (drugog, četvrtog, sedmog, desetog i petnaestog dana). Makroskopskom

analizom utvrđeno je relativno uspješnije cijeljenje rana kod CD26<sup>-/-</sup> miševa, dok je kod divljeg tipa životinja cijeljenje bilo dugotrajnije te vidljivo otežano. Makroskopski vidljive razlike smo potvrdili histopatološkim metodama analize. Dobiveni rezultati pokazuju da je kod oba soja miševa došlo do postepenog obnavljanja tkiva, ali je kod CD26<sup>-/-</sup> miševa prisutno brže stvaranje novog epitela i prekrivanje rane u usporedbi s C57BL/6 miševima. U C57BL/6 miševa je otežano stvaranje keratiniziranog sloja, dok se kod CD26<sup>-/-</sup> miševa 15. dana cijeljenja rane može primjetiti epidermis koji je obnovljen te vezivnotkivne papile s dlačnim folikulama u početnoj fazi rasta. Nadalje, u dermisu CD26<sup>-/-</sup> miševa je primjećeno jače bujanje veziva i brže uspostavljanje mreže vlakana ekstracelularnog matriksa, te je uočljiva granica između retikularnog sloja i papilarnog sloja koriuma. Dobivene vrijednosti debljine koriuma pokazuju kako nema razlike među sojevima u fiziološkim uvjetima. Međutim, tijekom određenog vremenskog perioda uočena je statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ) debljina koriuma kod CD26<sup>-/-</sup> miševa u usporedbi s C57BL/6 miševima, što potvrđuje činjenicu da nedostatak DPP IV/CD26 doprinosi boljem i bržem oporavku ranjenog područja.

Istraživanja pokazuju kako DPP IV/CD26 igra važnu ulogu u imunosnom odgovoru utječući na proliferaciju limfocita T. Pretpostavlja se da ima utjecaj na upalnu fazu tijekom procesa cijeljenja rana te da se njezinom inhibicijom smanjuje mogućnost nastanka kroničnih rana (115). Pokazano je da se broj limfocita T u upalnoj fazi povećava što za posljedicu ima širenje krvnih žila te povećan dotok krvi na oštećeno područje. Utjecaj nedostatka DPP IV/CD26 na imunosni odgovor, odnosno na limfocite T i makrofage u uvjetima hiperglikemije ispitan je

imunohistokemijskim metodama analize u različitim danima cijeljenja rana. Izražaj limfocita T je prikazan CD3 pozitivnim stanicama. Analizirani uzorci pokazuju statistički značajno manji ( $p < 0,05$ ) izražaj CD3 pozitivnih stanica kod CD26<sup>-/-</sup> miševa u usporedbi s C57BL/6 miševima prije same indukcije rane, u uvjetima hiperglikemije. Statistički značajno niža razina CD3 pozitivnih stanica ( $p < 0,05$ ) zabilježena je i četvrtog dana kod CD26<sup>-/-</sup> miševa u odnosu na kontrolnu skupinu. Desetog dana je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) najviše izražena te je kod divljeg tipa miševa broj CD3 pozitivnih stanica tada najveći nakon čega opada u oba soja. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako u nedostatku DPP IV/CD26 dolazi do bržeg ulaska u fazu proliferacije što znači da je trajanje upalne faze kraće.

Makrofagi se ubrajaju u fagocite, a uloga im je endocitoza, pinocitoza te fagocitoza mikroba ili stranih tvari koje dospiju u organizam koje zatim liziraju ili razgrade enzimskom aktivnošću (72). Makrofagi izlučuju faktor rasta VEGF koji potiče angiogenezu (75), što je od ključnog značaja za proces regeneracije i reparacije te neovaskularizacije tkiva.

Kako bi utvrdili postoji li utjecaj nedostatka DPP IV/CD26 na izražaj makrofaga u procesu cijeljenja rana u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije, metodom imunofluorescencije je analiziran i kvantificiran broj F4/80 pozitivnih stanica tijekom ključnih dana kod C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa. Između kontrolnih skupina nije vidljiva razlika u izražaju F4/80 pozitivnih stanica. Međutim, tijekom drugog i četvrtog dana cijeljenja rana njihov broj je statistički značajno veći u usporedbi na divlji soj. Zabilježen je porast sve do sedmog dana nakon čega broj

makrofaga počinje opadati. Vrijednosti F4/80 pozitivnih stanica kod divljeg tipa miševa su desetog dana najviše, a do petnaestog dana se dvostruko smanjuju. Obje skupine su u svim ključnim danima imale statistički značajno više vrijednosti F4/80 pozitivnih stanica u usporedbi s kontrolnim skupinama. Dobiveni rezultati pokazuju da je izražaj makrofaga (F4/80 pozitivnih stanica) kod CD26<sup>-/-</sup> miševa u uvjetima hiperglikemije veći nego kod divljeg soja, pa se pretpostavlja da je i lučenje VEGF-a veće što pozitivno utječe na angiogenezu ranjenog tkiva.

Ki67 predstavlja izvrstan marker proliferacije stanica u imunohistokemijskim analizama (117) kojeg možemo pronaći u aktivnim fazama dijeljenja stanica. Zbog navedenih karakteristika korišten je u ovom istraživanju kako bi na histološkim uzorcima CD26<sup>-/-</sup> i C57BL/6 miševa ispitali stupanj proliferacije bazalnih stanica epidermisa i veziva koriuma u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije pomoću imunohistokemijskih i histomorfometrijskih metoda te utvrdili postoje li razlike između ispitanih sojeva. U nedostatku DPP IV/CD26 je primjećen brži i veći stupanj proliferacije u svim ispitanim danima, a naročito četvrtog dana kada je veći za više od polovice vrijednosti izmjerene kod divljeg tipa miševa. Oba soja su tijekom četvrtog, sedmog, desetog i petnaestog dana pokazala statistički značajno veću vrijednost ( $p < 0,05$ ) Ki67 pozitivnih stanica u odnosu na kontrolne skupine miševa. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da odsutnost DPP IV/CD26 u uvjetima hiperglikemije pozitivno utječe i na proliferaciju bazalnih stanica epidermisa i veziva koriuma. Nadalje, dosadašnja su istraživanja pokazala i kako nedostatak DPP IV/CD26 povećava razine VEGF-a koji potiče proliferaciju



endotelnih stanica i transkripcijskog faktora HIF-1 $\alpha$  koji ima značajnu ulogu u procesu neovaskularizacije (41).

Provedena istraživanja pokazuju kako je aktivnost DPP IV/CD26 u serumu tijekom upalnih procesa kao što su primjerice bolesti crijeva, reumatoidne bolesti te multipla skleroza znatno snižena. Aktivnost DPP IV/CD26 predložena je i kao potencijalni upalni biljeg s obzirom na to činjenicu da su njezina aktivnost i intenzitet upale obrnuto proporcionalni (118). U svrhu dobivanja podataka o aktivnosti DPP IV/CD26 u uvjetima hiperglikemije izvršeno je mjerenje aktivnosti serumske DPP IV/CD26 u C57BL/6 miševima tijekom procesa cijeljenja rana u uvjetima hiperglikemije ali i u fiziološkim uvjetima. Vrijednosti koje su dobivene pokazuju statistički značajno veću ( $p < 0,05$ ) aktivnost DPP IV/CD26 kod miševa s induciranom hiperglikemijom u usporedbi na kontrolne miševe tj. C57BL/6 životinjama u fiziološkim uvjetima. Usporedbom aktivnosti serumske DPP IV/CD26 između kontrolne skupine C57BL/6 miševa s eksperimentalno uspostavljenim dijabetesom koji nisu bili ranjavani i miševa s dijabetesom koji su ranjavani tijekom četvrtog i sedmog dana uočena je statistički značajno niža ( $p < 0,05$ ) aktivnost kod ranjavanih miševa, a nakon sedmog dana raste i u narednim danima dostiže gotovo jednaku vrijednost kao i nultog dana. U dosadašnjim istraživanjima je također zabilježena veća aktivnost DPP IV/CD26 nakon sedmog dana kada se može uočiti formiranje novog tkiva (119). Statističkom obradom podataka također je pokazano kako enzimska aktivnost serumske DPP IV/CD26 pozitivno korelira s koncentracijom glukoze u krvi.

Rezultati koji su dobiveni ovim istraživanjem potvrđuju značajnu ulogu DPP IV/CD26 u metabolizmu glukoze te u modulaciji imunskog odgovora u uvjetima eksperimentalne hiperglikemije. Pokazano je kako je izražaj limfocita T i makrofaga izmijenjen u odsutnosti DPP IV/CD26 te pokazuje određene specifičnosti. Broj limfocita T bio je veći u prisutnosti DPP IV/CD26 čime je potvrđena njezina uloga u aktivaciji limfocita T. Broj makrofaga je u uvjetima deficijencije DPP IV/CD26 značajno veći tijekom upalne faze čime je potvrđen njezin utjecaj na izražaj makrofaga. Pokazano je kako utišavanje aktivnosti DPP IV/CD26 ima pozitivan učinak na upalne procese te procese proliferacije epitelnih stanica što posljedično utječe na uspješnije cijeljenje rana. Temeljem dobivenih rezultata pokazano je kako inhibicija ove molekule ima veliki terapijski značaj u liječenju šećerne bolesti tipa 2, osobito kod oboljelih koji kao komplikacije dijabetesa imaju odgođeno cijeljenje rana, što ukazuje na brojne mogućnosti primjene.

## 6. ZAKLJUČAK

Temeljem rezultata dobivenih ovim istraživanjem doneseni su sljedeći zaključci:

1. Pokusni model dijabetesa uspješno je uspostavljen u CD26 deficijentnom (CD26<sup>-/-</sup>) te divljem tipu miša (C57BL/6) što je potvrđeno kliničkim, patohistološkim te biokemijskim analizama.
2. U uvjetima nedostatka DPP IV/CD26 pokazana je bolja tolerancija glukoze.
3. Deficijencija DPP IV/CD26 povezana je s uspješnijom regeneracijom koriuma, bržim ulaskom u fazu proliferacije, kraćim trajanjem upalne faze te bržim stvaranjem ožiljka, što je dovelo do uspješnijeg cijeljenja rana u usporedbi s C57BL/6 miševima.
4. Imunosni odgovor u procesu cijeljenja rana kože u hiperglikemiji u uvjetima nedostatka DPP IV/CD26 pokazuje određene specifičnosti: broj limfocita T značajno je manji tijekom regeneracije i reparacije tkiva u uvjetima hiperglikemije u CD26<sup>-/-</sup> životinja što potvrđuje utjecaj DPP IV/CD26 na upalni odgovor koji traje kraće i manje je izražen u odnosu na divlji tip životinja.
5. Porast broja makrofaga tijekom procesa cijeljenja rana brži je i značajno izraženiji u uvjetima nedostatka DPP IV/CD26 u procesu cijeljenja rana u hiperglikemiji čime je također potvrđena uloga ove molekule u modulaciji imunosnog odgovora.

6. Aktivnost serumske DPP IV/CD26 pozitivno korelira s koncentracijom glukoze u krvi dok negativno korelira s intenzitetom upale tijekom procesa cijeljenja rana kože u C57BL/6 životinjama.

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju pretpostavku o značajnoj ulozi DPP IV/CD26 u procesu cijeljenja rane u uvjetima hiperglikemije te utjecaj ove molekule na imunski odgovor. Potkrijepljena je važnost uporabe inhibitora DPP IV/CD26 u terapiji dijabetesa te komplikacija cijeljenja rana u ovom metaboličkom poremećaju.

## 7. LITERATURA

1. American Diabetes Association; Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.; *Diabetes Care* 2010; 33(1): S62–S69.
2. Baynes, HW; Classification, pathophysiology, diagnosis and management of diabetes mellitus.; *J Diabetes Metab* 2015;6:541.
3. American Diabetes Association; Standards of Medical Care in Diabetes—2015 Abridged for Primary Care Providers.; *Clin Diabetes* 2015;33(2): 97-111.
4. Saboo A, Rathnayake A, Vangaveti VN, Malabu UH; Wound healing effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: An emerging concept in management of diabetic foot ulcer - A review.; *Diabetes Metab Syndr* 2016; 10(2):113-9.
5. Marfella R, Sasso FC, Rizzo MR, Paolisso P, Barbieri M et al.; Dipeptidyl peptidase 4 inhibition may facilitate healing of chronic foot ulcers in patients with type 2 diabetes.; *Exp Diabetes Res* 2012;2012:892706.
6. Samikannu B, Chen C, Lingwal N, Padmasekar M, Engel FB et al.; Dipeptidyl Peptidase IV inhibition activates creb an improves islet vascularization through VEGF-A/VEGFR-2 signaling pathway.; *PLoS ONE* 2013;8: e82639.
7. Deacon CF; Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1.; *Diabetes*. 2004;53(9):2181-9.
8. Koivisto V; Discovery of dipeptidyl-peptidase IV – a 40 year journey from bench to patient; *Diabetologia* 2008;51:1088-1089.
9. Hopsu- Havu VK, Glenner GG; A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide.; *Histochemie* 1966; 7(3):197-201
10. Lojda Z; Studies on glycyl-proline naphthylamidase. I. Lymphocytes.; *Histochemistry* 1977;54(4):299-309
11. Shrader WP, Stacy AR; Purification and subunit structure of adenosine deaminase from human kidney; *J Biol Chem* 1977;252(18): 6409-6415

12. Morrison ME, Vijayasaradhi S, Engelstein D, Albino AP, Houghton AN; A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase; *J Exp Med* 1993;177(4):1135-43
13. Kullertz G, Fischer G, Barth A; Catalytic mechanism of dipeptidyl-peptidase IV; *Acta Biol Med Ger* 1978;37:559-567
14. Rosenblum JS, Kozarich JW; Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery.; *Curr Opin Chem Biol* 2003;7(4):496-504
15. Boonacker E, Van Noorden CJ; The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV.; *Eur J Cell Biol* 2003;82(2):53-73
16. Hanski C, Huhle T, Reutter W; Involvement of plasma membrane dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated adhesion of cells on collagen.; *Biol Chem Hoppe Seyler* 1985;366(12):1169-1176
17. Hanski C, Huhle T, Gossrau R, Reutter W; Direct evidence for the binding of rat liver DPP IV to collagen in vitro.; *Exp Cell Res* 1988;178(1):64-72
18. von Bonin A, Hühn J, Fleischer B; Dipeptidyl-peptidase IV/CD26 on T cells: analysis of an alternative T-cell activation pathway.; *Immunol Rev* 1998;161:43-53
19. Ulmer AJ, Mattern T, Feller AC, Heymann E, Flad HD; CD26 antigen is a surface dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) as characterized by monoclonal antibodies clone TII-19-4-7 and 4EL1C7.; *Scand J Immunol* 1990;31(4):429-35
20. Ishii T, Ohnuma K, Murakami A, I suradnici; CD26-mediated signaling for T cell activation occurs in lipid rafts through its association with CD45RO; *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(21):12138-43
21. Abbott CA, Baker E, Sutherland GR, McCaughan GW; Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene.; *Immunogenetics*. 1994;40(5):331-8
22. Misumi Y, Hayashi Y, Arakawa F, Ikehara Y; Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface.; *Biochim Biophys Acta* 1992; 1131(3):333-336
23. Böhm SK, Gum JR, Jr, Erickson RH, Hicks JW, Kim YS; Human dipeptidyl peptidase IV gene promoter: tissue-specific regulation from a TATA-less GC-rich

sequence characteristic of a housekeeping gene promoter.; *Biochem J* 1995; 311(Pt 3): 835–843

24. Bernard AM, Mattei MG, Pierres M, Marguet D; Structure of the mouse dipeptidyl peptidase IV (CD26) gene.; *Biochemistry* 1994;33(50):15204-15214

25. David F, Bernard AM, Pierres M, Marguet D; Identification of serine 624, aspartic acid 702, and histidine 734 as the catalytic triad residues of mouse dipeptidyl-peptidase IV (CD26). A member of a novel family of nonclassical serine hydrolases.; *J Biol Chem* 1993;268(23):17247-17252

26. Engel M, Hoffmann T, Wagner L, Wermann M, Heiser U, Kiefersauer R, Huber R, Bode W, Demuth HU, Brandstetter H; The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism.; *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(9):5063-5068

27. Hiramatsu H, Kyono K, Higashiyama Y, i sur. ; The structure and function of human dipeptidyl peptidase IV, possessing a unique eight-bladed beta-propeller fold; *Biochem Biophys Res Commun* 2003;302(4):849–854

28. Bjelke JR, Christensen J, Branner S, Wagtmann N, Olsen C, Kanstrup AB, Rasmussen HB; Tyrosine 547 Constitutes an essential part of the catalytic mechanism of dipeptidyl peptidase IV.; *J Biol Chem* 2004; 279(33):34691-34697

29. Aertgeerts K, Ye S, Tennant MG, Kraus ML, Rogers J, Sang B-C, Skene RJ, Webb DR, Prasad GS; Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation; *Protein Sci* 2004; 13(2):412-421

30. Ludwig K, Fan H, Dobers J, Berger M, Reutter W, Böttcher C; 3D structure of the CD26-ADA complex obtained by cryo-EM and single particle analysis.; *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313(2):223-9

31. Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, De Meester I; Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV.; *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003;40(3):209-94

32. Hansen JE, Lund O, Tolstrup N, Gooley AA, Williams KL, Brunak S; NetOglyc: prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility.; *Glycoconj J* 1998;15(2):115-30
33. Ansorge S, Langner J, Bühling F, Lendeckel U; Proteolytic signals from Magdeburg.; *Immunol Today* 2000;21(4):166-7
34. Gorrell MD, Abbott CA, Kähne T, Levy MT, Church WB, McCaughan GW; Relating structure to function in the beta-propeller domain of dipeptidyl peptidase IV. Point mutations that influence adenosine deaminase binding, antibody binding and enzyme activity.; *Adv Exp Med Biol* 2000;477:89-95
35. Nagatsu T, Hino M, Fuyamada H, Hayakawa T, Sakakibara S; New chromogenic substrates for X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase.; *Anal Biochem* 1976;74(2):466-76
36. Wilson MJ, Ruhland AR, Pryor JL, i sur.; Prostate specific origin of dipeptidylpeptidase IV (CD-26) in human seminal plasma.; *J Urol* 1998;160(5):1905-9
37. Durinx C, Lambeir AM, Bosmans E, i sur.; Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides.; *Eur J Biochem.* 2000;267(17):5608-13
38. Iwaki-Egawa S, Watanabe Y, Kikuya Y, Fujimoto Y; Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence.; *J Biochem* 1998;124(2):428-33
39. Ogata S, Misumi Y, Ikehara Y; Primary structure of rat liver dipeptidyl peptidase IV deduced from its cDNA and identification of the NH<sub>2</sub>-terminal signal sequence as the membrane-anchoring domain.; *J Biol Chem* 1989;264:3596-3601
40. Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW; CD26: A multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes.; *Scand J Immunol* 2001;54(3):249-264



41. Hildebrandt M, Reutter W, Arck P, Rose M, Klapp BF; A guardian angel: the involvement of dipeptidyl peptidase IV in psychoneuroendocrine function, nutrition and immune defence.; Clin Sci 2000; 99(2):93-104
42. Uematsu T, Urade M, Yarnaoka M, Yoshioka W; Reduced expression of dipeptidyl peptidase (DPP) IV in peripheral blood T lymphocytes of oral cancer patients; J Oral Pathol Med 1996; 25(9):507–512
43. De Meester I, Korom S, Van Damme J, Scharpé S; CD26, let it cut or cut it down.; Immunol Today 1999;20(8):367–375
44. Yaron A, Naider F, Scharpe S; Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins.; Crit Rev Biochem Molr Biol 1993; 28(1):31-81
45. Sedo A, Malik R; Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities?.; Biochim Biophys Acta 2001;1550(2):107–116
46. Wada K, Yokotani N, Hunter C, Doi K, Wenthold RJ, Shimasaki S; Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family; Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89(1):197-201
47. Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR; Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man.; Lancet 1987;2(8571):1300-4
48. Pauly RP, Rosche F, Wermann M, McIntosh CH, Pederson RA, Demuth HU; Investigation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-(1-42) and glucagon-like peptide-1-(7-36) degradation in vitro by dipeptidyl peptidase IV using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. A novel kinetic approach.; J Biol Chem. 1996;271(38):23222-9
49. Baggio LL, Drucker DJ; Biology of incretins: GLP-1 and GIP.; Gastroenterology 2007;132(6):2131-57
50. Deacon CF, Holst JJ; Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes: comparison, efficacy and safety.; Expert Opin Pharmacother 2013;14(15):2047-58
51. Ahrén B, Landin-Olsson M, Jansson PA, Svensson M, Holmes D, Schweizer A; Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels,

and reduces glucagon levels in type 2 diabetes.; J Clin Endocrinol Metab 2004;89(5):2078-2084

52. Ahrén B, Simonsson E, Larsson H, Landin-Olsson M, Torgeirsson H, Jansson PA, Sandqvist M, Båvenholm P, Efendic S, Eriksson JW, Dickinson S, Holmes D; Inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves metabolic control over a 4-week study period in type 2 diabetes.; Diabetes Care 2002; 25(5):869-875

53. Schürmann C, Linke A, Engelmann-Pilger K, Steinmetz C, Mark M et al.; The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin attenuates inflammation and accelerates epithelialization in wounds of diabetic ob/ob mice.; J Pharmacol Exp Ther 2012;342:71-80

54. Marfella R, Sasso FC, Rizzo MR, Paolisso P, Barbieri M et al.; Dipeptidyl peptidase 4 inhibition may facilitate healing of chronic foot ulcers in patients with type 2 diabetes.; Exp Diabetes Res 2012;2012:892706.

55. Fadini GP, Boscaro E, Albiero M, Menegazzo L, Frison V et al.; The oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin increases circulating endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes: Possible role of stromal-derived factor-1alpha.; Diabetes Care 2010;33:1607-1609

56. Marfella R1, Sasso FC, Rizzo MR, Paolisso P, Barbieri M, Padovano V, Carbonara O, et.al.; Dipeptidyl peptidase 4 inhibition may facilitate healing of chronic foot ulcers in patients with type 2 diabetes.; Exp Diabetes Res 2012;2012:892706

57. Witte MB, Barbul A.; General principles of wound healing.; Surg Clin North Am 1997;77:509-28

58. Palalau AI, Tahrani AA, Piya MK, Barnett AH.; DPP-4 inhibitors in clinical practice.; Postgrad Med 2009;121:70-100

59. Popis FDA-odobrenih DPP IV inhibitora u 2015. (FDA Drug Safety Communication; Preuzeto s

<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/UCM460038.pdf> (pristupljeno: lipanj 2018)

60. Yu DM, Yao TW, Chowdhury S, Nadvi NA, Osborne B, Church WB, McCaughan GW, Gorrell MD; The dipeptidyl peptidase IV family in cancer and cell biology.; FEBS J 2010;277(5):1126-44
61. Gorrell MD; Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders.; Clin Sci 2005;108(4):277-92
62. Gorrell MD, Wickson J, McCaughan GW; Expression of the rat CD26 antigen (dipeptidyl peptidase IV) on subpopulations of rat lymphocytes.; Cell Immunol 15;134(1):205-15
63. Fleischer B; A novel pathway of human T cell activation via a 103 kD T cell activation antigen.; J Immunol 1987;138(5):1346-50
64. Bühling F, Kunz D, Reinhold D, Ulmer AJ, Ernst M, Flad HD, Ansorge S; Expression and functional role of dipeptidyl peptidase IV (CD26) on human natural killer cells.; Nat Immun 1994;13(5):270-9
65. Kahne T, Lendeckel U, Wrenger S, Neubert K, Ansorge S, Reinhold D; Dipeptidyl peptidase IV: a cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (review).; Int J Mol Med 1999;4(1):3-15
66. Bednarczyk JL, Carroll SM, Marin C, McIntyre BW; Triggering of the proteinase dipeptidyl peptidase IV (CD26) amplifies human T lymphocyte proliferation.; J Cell Biochem 1991;46(3):206-18
67. Fleischer B, Sturm E, De Vries JE, Spits H; Triggering of cytotoxic T lymphocytes and NK cells via the Tp103 pathway is dependent on the expression of the T cell receptor/CD3 complex.; J Immunol 1988;141(4):1103-7
68. Schön E, Mansfeld HW, Demuth HU, Barth A, Ansorge S; The dipeptidyl peptidase IV, a membrane enzyme involved in the proliferation of T lymphocytes.; Biomed Biochim Acta 1985;44(2):K9-15
69. Reinhold D, Bank U, Bühling F, Täger M, Born I, Faust J, Neubert K, Ansorge S; Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) induces secretion of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in stimulated mouse splenocytes and thymocytes.; Immunol Lett 1997;58(1):29-35

70. Morimoto C, Schlossman SF; The structure and function of CD26 in the T-cell immune response.; *Immunol Rev* 1998;161:55-70
71. Andreis I, Batinić D, Čulo F i suradnici; *Imunologija*, sedmo, obnovljeno i dopunjeno izdanje; Medicinska naklada, Zagreb 2010; str. 202-204
72. Andreis I, Batinić D, Čulo F i suradnici; *Imunologija*, sedmo, obnovljeno i dopunjeno izdanje; Medicinska naklada, Zagreb 2010; str. 41-44
73. Frank S, Kampfer H, Wetzler C, Stallmeyer B, Pfeilschifter J; Large induction of the chemotactic cytokine RANTES during cutaneous wound repair: a regulatory role for nitric oxide in keratinocyte-derived RANTES expression.; *Biochem J* 2000;347(1):265-273
74. Brancato SK, Albina JE; Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function.; *Am J Pathol* 2011;178(1):19-25
75. Hsu CW, Poché RA, Saik JE, Ali S, Wang S, Yosef N i suradnici; Improved Angiogenesis in Response to Localized Delivery of Macrophage-Recruiting Molecules.; *PLoS One* 2015;10(7):e0131643
76. Dong RP, Kameoka J, Hegen M, Tanaka T, Xu Y, Schlossman S, Morimoto C; Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response.; *J Immunol* 1996;156(4):1349-55
77. Pacheco R, Martinez-Navio JM, Lejeune M, Climent N, Oliva H, Gatell JM, Gallart T, Mallol J, Lluís C, Franco R; CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse.; *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(27):9583-9588
78. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G; Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine.; *Nat Rev Cancer* 2013;13(12):842–857
79. Kameoka J, Tanaka T, Nojima Y, Schlossman SF, Morimoto C; Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26.; *Science* 1993;261(5120):466-469

80. Iwaki-Egawa S, Watanabe Y, Fujimoto Y; CD26/dipeptidyl peptidase IV does not work as an adenosine deaminase-binding protein in rat cells.; *Cell Immunol* 1997;178(2):180-186
81. Franco R, Valenzuela A, Lluís C, Blanco J; Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes.; *Immunol Rev* 1998;161(1):27–42
82. Weihofen WA, Liu J, Reutter W, Saenger W, Fan H; Crystal structure of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in complex with adenosine deaminase reveals a highly amphiphilic interface.; *J Biol Chem* 2004;279(41):43330-43335
83. Wang XM, Yu DM, McCaughan GW, Gorrell MD; Extra-enzymatic roles of DPIV and FAP in cell adhesion and migration on collagen and fibronectin.; *Adv Exp Med Biol* 2006;575:213-222
84. Löster K, Zeilinger K, Schuppan D, Reutter W; The cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD 26) is the collagen binding site.; *Biochem Biophys Res Commun* 1995;217(1):341–348
85. Cheng W, Yan-hua R, Fang-gang N, Guo-an Z; The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury.; *Afr J Biotechnol* 2011;10(13):2524-2529
86. Liu Z, Christensson M, Forslöw A, De Meester I, Sundqvist KG; A CD26-controlled cell surface cascade for regulation of T cell motility and chemokine signals.; *J Immunol* 2009;183(6):3616-3624
87. Dang NH, Torimoto Y, Sugita K, Daley JF, Schow P, Prado C, Schlossman SF, Morimoto C; Cell surface modulation of CD26 by anti-1F7 monoclonal antibody. Analysis of surface expression and human T cell activation.; *J Immunol* 1990;145(12):3963-71
88. Ansorge S, Schön E, Kunz D; Membrane-bound peptidases of lymphocytes: functional implications.; *Biomed Biochim Acta* 1991;50(4-6):799-807
89. Lipozenčić J i suradnici; *Dermatovenerologija*, 3. Izmijenjeno i dopunjeno izdanje; Medicinska naklada, Zagreb 2008; str. 5-9

90. Witte MB, Barbul A; General principles of wound healing.; Surg Clin North Am 1997;77(3):509-28
91. Lee CH, Wu SB, Hong CH, Yu HS, Wei YH; Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis and its effects on skin residential cells: The implication in UV-based phototherapy.; Int J Mol Sci 2013;14(3):6414–6435
92. Werner S, Grose R; Regulation of wound healing by growth factors and cytokines.; Physiol Rev 2003;83(3):835-70
93. Diegelmann RF, Evans MC; Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing.; Front Biosci 2004;9:283-9
94. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M; Growth factors and cytokines in wound healing.; Wound Repair Regen 2008;16(5):585-601
95. Peterson JM, Barbul A, Breslin RJ, Wasserkrug HL, Efron G; Significance of T-lymphocytes in wound healing.; Surgery 1987;102(2):300-5
96. Harding KG, Morris HL, Patel GK, Science, medicine and the future: healing chronic wounds.; BMJ 2002;324(7330):160-3
97. Guyton AC; Fiziologija čovjeka i mehanizmi bolesti, 5. Izdanje; Medicinska naklada, Zagreb 1995; str. 133-134
98. Damjanov I i suradnici, Patologija, četvrto, prerađeno i dopunjeno izdanje; Medicinska naklada, Zagreb 2014; str.63-72
99. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V; The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms.; J Int Med Res 2009;37(5):1528-1542
100. Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA; Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration.; Cell Mol Life Sci 2013;70(12):2059-2081
101. Tsourdi, E, Barthel A, Rietzsch H, Reichel A, Bornstein SR; Current aspects in the pathophysiology and treatment of chronic wounds in diabetes mellitus.; Biomed Res Int 2013;2013:385641
102. Falanga V; Wound healing and its impairment in the diabetic foot.; Lancet 2005;366(9498):1736-43

103. Waumans Y, Baerts L, Kehoe K, Lambeir AM, De Meester I; The dipeptidyl peptidase family, prolyl oligopeptidase and prolyl carboxypeptidase in the immune system and inflammatory disease, including atherosclerosis.; *Front Immunol* 2015;6:387
104. Itou M, Kawaguchi T, Taniguchi E; Sata, M. Dipeptidyl peptidase-4: A key player in chronic liver disease.; *World J Gastroenterol* 2013;19(15): 2298–2306.
105. Bauvois B; Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis?; *Oncogene* 2004;23(2):317–329
106. Abe K, Tilan JU, Zukowska Z; NPY and NPY receptors in vascular remodeling.; *Curr Top Med Chem* 2007;7(17):1704-9
107. Parvardia JK, Keswani SG, Vaikunth S, Mldonado AR, Marwan A et al; Role of VEGF in small bowel adaptation after resection: the adaptive response is angiogenesis dependent.; *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293: 591-598
108. Andreis I, Batinić D, Čulo F i sur; *Imunologija*, sedmo, obnovljeno i dopunjeno izdanje.; *Medicinska naklada*, Zagreb 2010; str. 41-44.
109. Matheeußen V, Jungraithmayr W, De Meester I; Dipeptidyl peptidase 4 as a therapeutic target in ischemia/reperfusion injury.; *Pharmacol Ther* 2012;136(3):267–282
110. Frank S, Kampf H, Wetzler C, Stallmeyer B, Pfeilschifter J; Large induction of the chemotactic cytokine RANTES during cutaneous wound repair: a regulatory role for nitric oxide in keratinocyte-derived RANTES expression.; *Biochem J* 2000;347:265-273
111. Metzemaekers M, Van Damme J, Mortier A, Proost P; Regulation of chemokine activity – A focus on the role of dipeptidyl peptidase IV/CD26.; *Front Immunol* 2016;7:483
112. Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW; The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis.; *Molecular Reproduction and Development*; 82: 518–529

113. Lee SA, Kim YR, Yang EJ, Kwon E-J, Kim SH, Kang SH, et al.; CD26/DPP4 levels in peripheral blood and T cells in patients with type 2 diabetes mellitus.; *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*; 2013;98(6):2553-61
114. Marguet D, Baggio L, Kobayashi T i suradnici; Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26; *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(12):6874-6879
115. Diegelmann RF, Evans MC; Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing.; *Front Biosci* 2004;9:283-289
116. Salimi Elizei S, Poormasjedi –Meibod M-S, Li Y, Baradar Jalili R, Ghahary A; Effects of kynurenine on CD3+ and macrophages in wound healing.; *Wound Repair Regen.* 2015;23(1):90-7
117. Booth DG, Takagi M, Sanchez-Pulido L, Petfalski E, Vargiu G, Samejima K, et al.; Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery, *eLife Sciences Publications Limited.*2014;3:e01641
118. Busso N, Wagtmann N, Herling C, Chobaz-Peclat V, Bischof-Delaloye A, So A, et al.; Circulating CD26 is negatively associated with inflammation in human and experimental arthritis.;*The American journal pathology* 2005;166(2):433-42
119. Schurmann C, Linke A, Engelmann-Pilger K, Steinmetz C, Mark M, Pfeilschifter J et al.; The Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Linagliptin 73 Attenuates Inflammation and Accelerates Epithelialization in Wounds of Diabetic ob/ob Mice.; *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2012;342:71–80



## 8. ŽIVOTOPIS

### Alaa Sharbini

#### Datum i mjesto rođenja:

18. listopad 1992., Damask, Sirijska Arapska Republika

#### Obrazovanje:

1999.-2007.: Osnovna škola „Jelenje-Dražice“, Rijeka

2007.-2011.: Medicinska škola u Rijeci

- Farmaceutski tehničar

2012. – u tijeku: Pomorski fakultet u Rijeci

Preddiplomski studij „Logistika i menadžment u pomorstvu i prometu“

2013.-2016.: Medicinski fakultet u Rijeci

Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva

2016.-2018.: Medicinski fakultet u Rijeci

Diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva

#### Zaposlenja:

2011.-2012.: Ljekarna Đukić Mira i Ana-Maria, mr.pharm.