

# Promjene izražaja dipeptidil-peptidaze 8 i 9 u kolitisu

---

**Franović, Barbara**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:184:493229>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-06**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULETET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Barbara Franović

PROMJENE IZRAŽAJA DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE 8 I 9 U KOLITISU

Diplomski rad

Rijeka, 2020

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULETET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Barbara Franović

PROMJENE IZRAŽAJA DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE 8 I 9 U KOLITISU

Diplomski rad

Rijeka, 2020

II

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Dijana Detel, dr.med.

Završni rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na Medicinskom fakultetu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc.dr.sc. Lara Batičić
2. Doc.dr.sc. Slađana Burać
3. Izv.prof. dr.sc. Dijana Detel

Rad ima \_\_65\_\_ stranica, \_\_13\_\_ slika, \_\_2\_\_ tablica, \_\_37\_\_ literaturnih navodva

## SAŽETAK

**UVOD:** Ulcerozni kolitis (UK) je jedan od dva patohistološka oblika upalne bolesti crijeva. Predstavlja imunološki posredovanu bolest obilježenu ponavljajućim upalnim procesima koji rezultiraju oštećenjem i gubitkom funkcije crijevne sluznice. Pokazano je da su proteini obitelji dipeptidil-peptidaze (DP)4, posebice, nedovoljno istraženi članovi, DP8 i 9 putem svojih enzimskih i kostimulacijskih učinaka uključeni u modulaciju imunoloških mehanizama te proliferaciju i aktivaciju stanica koji vode k razvoju upalne bolesti crijeva.

**CILJ:** Cilj je istraživanja ispitati promjene transkripcijske aktivnosti DP8 i 9, signalnog pretvarača i aktivatora transkripcije (STAT)3 i 6 te inducibilne dušične sintetaze (iNOS) na eksperimentalnom modelu UK izazvanog primjenom natrijevog dekstran sulfata (DSS).

**MATERIJAL I METODE:** Eksperimentalni akutni kolitis je izazvan je u C57BL/6 miševa primjenom 3 % otopine DSS tijekom sedam dana u vodi za piće. Tijekom pokusnog perioda pratio se razvoj i intenzitet kolitisa temeljem promjena kliničkih manifestacija, indeksa aktivnosti bolesti, te lokalnih promjena. Nadalje, pratile su se promjene izražaja DP8 i 9, iNOS te STAT3 i STAT6 na transkripcijskoj razini u tkivu debeloga crijeva tijekom razvoja DSS kolitisa u miša.

**REZULTATI:** Razvoj upalnog procesa na sistemskoj razini rezultirao je pojavom kliničkih manifestacija, porastom indeksa aktivnosti bolesti i hepatosomatskog indeksa. Na lokalnoj razini, razvoj kolitisa praćen je porastom mikroskopskog indeksa oštećenja sluznice debelog crijeva i skraćanjem debelog crijeva. Trećeg dana pokusnog perioda zabilježen je značajan porast transkripcijske aktivnosti DP8, DP9, STAT3 i iNOS. Značajan porast transkripcijske

aktivnosti STAT3 i iNOs zabilježen je i sedmog dana. Izražaj STAT6 gena se tijekom razvoja kolitisa nije mijenjao.

**ZAKLJUČAK:** Rezultati ukazuju na ulogu ispitivanih proteaza i signalnih molekula u razvoju i progresiji DSS kolitisa.

## SUMMARY

**Introduction.** Ulcerative colitis (UC) is one of the two major pathohistological forms of inflammatory bowel disease. It represents an immune mediated disease which is characterized by recurrent episodes of the colon inflammation resulting in damage and loss of the intestinal mucosal function. It has been shown that the proteases dipeptidyl peptidase (DP)4 and recently discovered DP8 and 9 are involved in the modulation of immune mechanisms leading to colitis development as well as in the proliferation and activation of immune cells.

**Aim.** Considering our previous results and experience, we hypothesized that changes in the expression of DP8 and 9 influence on the colitis development. Therefore, the aim of the research was to investigate the role of DP8 and 9, STAT3 and STAT6, and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the induction and progression of dextran sulfate sodium (DSS)-induced experimental colitis in mice.

**Material and Methods.** Colitis was induced in C57BL/6 mice by oral administration of 3% solution of DSS. The health status of animals, changes in body weight, and development of clinical symptoms of colitis were monitored during the experimental period. Animals were sacrificed on day 7. Transcriptional expression of the DP8, DP9, STAT3, STAT6, and iNOS in the colonic tissue were evaluated by RT-qPCR.

**Results.** The development of the colonic inflammation resulted in the appearance of clinical manifestations, an increase in the disease activity index, microscopic damage score and hepatosomatic index. A significant increase in transcriptional activity of DP8, DP9 in the colon was determined on the third day of the experimental period. Likewise, the increase in

transcriptional activity of STAT3 and iNOS were determined on the day 3 and 7. Interestingly, development of the colon inflammation has not influenced on the STAT6 gene expression.

**Conclusion.** The results indicate the importance of investigated proteases and signal molecules in the DSS colitis induction and progression.



## SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA RADA .....	1
1.1 Upalne bolesti crijeva.....	1
1.1.1 Ulcerozni kolitis.....	1
1.1.2 Povijest .....	2
1.1.3 Epidemiologija .....	3
1.1.4 Patogeneza.....	3
1.1.5 Klinička slika .....	4
1.1.6 Dijagnoza ulceroznog kolitisa.....	5
1.1.7 Terapija.....	6
1.2 Peptidaze .....	7
1.2.1 Obitelj dipeptidil-peptidaze 4 .....	8
1.2.2 Dipeptidil-peptidaza 8 i 9 .....	8
1.2.3 Strukturna obilježja DP8 i 9 proteina.....	10
1.2.4 Geni za DP8 i 9 proteine.....	11
1.2.5 Inhibitori DP8 i 9 proteaza .....	12
1.2.6 Regulacija enzimske aktivnosti .....	12
1.2.7 Prirodni supstrati .....	13
1.3 STAT transkripcijski čimbenici.....	14
1.3.1 Uloga STAT3 i 6 molekule u razvoju upale .....	14
1.3.2 Uloga i mehanizmi aktivacije STAT3 i STAT6 u stanicama tumora.....	16
1.3.3 Uloga STAT3 u prevenciji raka.....	18
1.4 Sinteza dušikovog-oksida i aktivnost inducibilne dušične sintetaze.....	19
1.5 Polimerazna lančana reakcija – PCR.....	20
1.5.1 Pufer .....	22
1.5.2 Nukleotidi.....	23
1.5.3 Početnice.....	23
1.5.4 Polimeraza .....	23
1.5.5 Ciljna DNA .....	24
1.5.6 Optimizacija PCR-a.....	24
1.5.7 Detekcija produkta PCR-om .....	26
1.5.8 Vrste PCR-a .....	27
1.5.8.1 Inverzni PCR.....	27
1.5.8.2 Multiplex PCR .....	27

1.5.8.3	Nested PCR.....	28
1.5.8.4	„Methylation-specific“ PCR (MSP PCR).....	28
1.5.8.5	„Hot-start“ PCR .....	29
1.5.8.6	Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR) .....	29
1.5.9	Primjena PCR-a .....	32
1.5.10	Kvantifikacija PCR produkta .....	33
2	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	35
3	MATERIJALI I METODE .....	36
3.1	Pokusni model DSS kolitisa i plan pokusa .....	36
3.2	Procjena uspostave i intenziteta kolitisa.....	36
3.3	Hematoksin-eozin bojanje tkivnih preparata.....	37
3.4	Određivanje stupnja oštećenja sluznice debelog crijeva .....	38
3.5	Procjena genskog izražaja ispitivanih molekula.....	38
3.5.1	Izolacija ukupne RNA.....	38
3.5.2	Spektrofotometrijsko ispitivanje čistoće, koncentracije i integriteta RNA.....	39
3.5.3	Sinteza komplementarne DNA.....	40
3.5.4	Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR) .....	41
3.6	Etički aspekt istraživanja na eksperimentalnim životinjama.....	42
3.7	Statistička obrada podataka .....	43
4	REZULTATI.....	44
4.1	Sistemske, kliničke promjene tijekom razvoja kolitisa .....	44
4.2	Lokalne promjene tijekom razvoja kolitisa .....	47
4.3	Makroskopske promjene debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa.....	48
4.4	Mikroskopske promjene debelog crijeva tijekom razvoja DSS kolitisa.....	50
4.5	Promjene genskog izražaja DP8 i 9 u debelom crijevu tijekom razvoja kolitisa.....	52
4.6	Promjene izražaja iNOs gena u debelom crijevu tijekom razvoja kolitisa .....	53
4.7	Promjene izražaja gena transkripcijski čimbenika u debelom crijevu tijekom razvoja kolitisa .....	54
5	RASPRAVA.....	55
6	ZAKLJUČAK.....	58
7	LITERATURA .....	59
8	PRILOZI.....	64
8.1	Prilozi slika .....	64
8.2	Prilozi tablica .....	64

9	ŽIVOTOPIS.....	65
---	----------------	----

## 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA RADA

### 1.1 Upalne bolesti crijeva

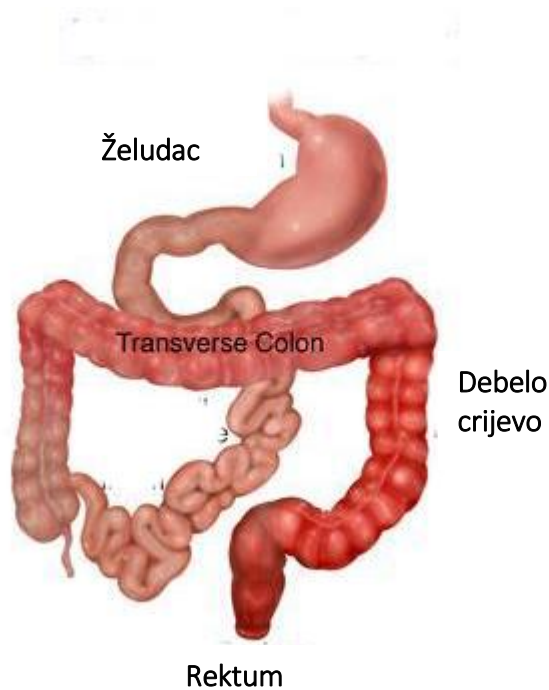
Upalne bolesti crijeva (UBC) svrstavaju se u idiopatske kronične bolesti gastrointestinalnog sustava. Zahvaćaju cijeli probavni sustav počevši od usne šupljine sve do anusa uz mogućnost pojave patoloških promjena (ekstraintestinalne manifestacije) na brojnim organima i organskim sustavima poput kože, oči te zglobova. UBC se mogu podijeliti na: ulcerozni kolitis (UK), Chronovu bolest (CB) i neklasificiranu UBC (1). CB i UK imaju mnogo sličnih karakteristika, no i brojne različitosti. Pokazane su sličnosti u etiopatogenezi, kliničkoj slici te u epidemiologiji. Unatoč velikom broju istraživanja, ni danas etiopatogeneza ovih bolesti nije u potpunosti razjašnjena.

CB je kronična upalna bolest crijeva koja obuhvaća cijeli probavni sustav, a okarakterizirana je transmuralnim i diskontinuiranim upalnim promjenama sluznice. Razlikujemo tri osnovna fenotipa CB: upalni (luminalni), stenozirajući te penetrirajući (fistulirajući) (2)

#### 1.1.1 Ulcerozni kolitis

UK predstavlja idiopatsku bolest koja zahvaća sluznicu debelog crijeva i to najčešće krajnji dio debelog crijeva odnosno rektum (slika 1.). Makroskopski gledano sluznica je crvena i tanka, a u kasnijim fazama mogu se pronaći široki plitki vrijedovi. Vrijedovi su najčešće ograničeni na sluznicu i podsluznicu, no imaju mogućnost prodiranja u dublje slojeve (3). Prema Montrealskoj klasifikaciji odnosno prema stupnju zahvaćenosti debelog crijeva

razlikuju se: ulcerozni proktitis ili proktosigmoiditis, lijevostrani UK (distalni kolitis) te ekstenzivni kolitis. Bolest koja se odnosi na završni dio debelog crijeva (rektum) je ulcerozni proktitis, dok proširenje do sredine stigme obilježje je proktosigmoiditisa. Lijevo-strani UK ima sposobnost zahvaćanja dijela koji se nalazi najbliže slezeni na debelome crijevu (4). Ovu bolest karakteriziraju razdoblja remisije i egzacerbacije.



Slika 1: Prikaz lokalizacije upalnih promjena sluznice gastrointestinalnog trakta u ulceroznom kolitisu

### 1.1.2 Povijest

Nakon otkrića električnog sigmoidoskopa u 19. stoljeću započinje proučavanje unutrašnjosti crijeva što dovodi do napretka u prepoznavanju UBC-a. CB i UK otkriveni su u 20. stoljeću i svrstane su u najčešće posredovane bolesti gastrointestinalnog sustava. Davne 1859. godine Wilks je po prvi puta opisao UK. Do tada se smatralo da UC uzrokuje bacilarna

dizenterija, dok se ta teorija nije opovrgnula 1939. godine endoskopskim pregledom gastrointestinalnog trakta. Detaljan tijek bolesti i pojave mogućih simptoma 1909. istaknuo je u svome radu Hawkins (5).

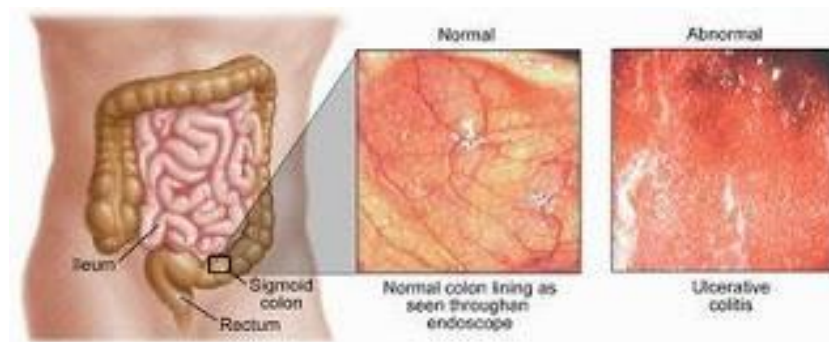
### **1.1.3 Epidemiologija**

Godišnja incidencija UK kreće se od 0,6 do 24,5 na 100 000 stanovnika. UK se najčešće javlja u dobi od 20-40-te godine, no povećana pojavnost javlja se i u 60- do 80-toj godini. Prema dostupnim podacima bolest je češća u muškaraca nego u žena kao i u Europljana, Židova i bijelaca. Poremećaj na razini imunološkog odgovora zbog interakcije genetskih i okolišnih čimbenika dovodi do razvoja UK. Ubraja se u poligenske bolesti što bi značilo da genetski faktor u razvoju UC prema faktorima okoliša iznosi 40% (5).

### **1.1.4 Patogeneza**

Bolest UK započinje u rektumu te se širi kontinuiranim slijedom u proksimalni dio gastrointestinalnog sustava. Upala uglavnom zahvaća sluznicu, a u nešto manjoj mjeri podsluznicu. Sluznica je granulirana, eritematozna te popraćena sa spontanim krvarenjima kod blagog stupnja upale sluznice. U slučajevima kad je sluznica hemoragična, edematozna i prožeta ulkusima tada je riječ o težem obliku bolesti. Za vrijeme aktivnog oblika može doći do razvoja novih tvorbi poput polipa. U fazi remisije bolesti sluznica može imati sasvim normalan izgled, no ponekad je blijeda i atrofična. S obzirom na vrstu proširenosti upalnih promjena na sluznici crijeva mogu se razlikovati: proktitis (lijevostrani kolitis – od rektuma do lijenalne

fleksure), prošireni kolitis (proksimalno do lijenalne fleksure) te proktitis (kompletno zahvaćanje sluznice debelog crijeva) (slika 2.) (6).



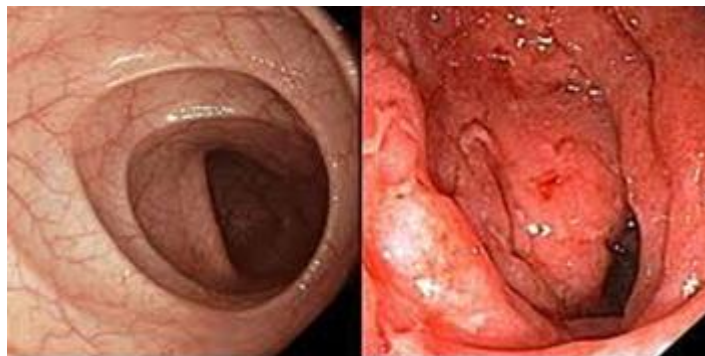
Slika 2. Prikaz promijenjene sluznice u ulceroznim kolitisu

#### 1.1.5 Klinička slika

UK je bolest koja se razvija postupno kroz nekoliko tjedana ili mjeseci kod većine bolesnika, a samo kod malog broja ljudi nastupa naglo. Ovisno o stupnju bolesti i intenzitetu upale razlikuju se i simptomi UK. U prosjeku više od 90% bolesnika ističe da su prvi simptomi UK krvave stolice. Često se može pronaći u stolici gnoj i sluz. Među ostalim simptomima ističu se: proljevi, tenezmi, urgencije te zatvori s teškim grčevima u trbuhu. S napredovanjem bolesti odnosno kada bolest zahvati velik dio debelog crijeva proljevi postaju sve učestaliji (6). Za vrijeme praznog distalnog dijela debelog crijeva javljaju se tenezmi ili urgencije s bolnim nagonima za defekaciju. U proksimalnom dijelu debelog crijeva pojavljuju se bolovi u trbuhu (kolike) ili grčevi koji su popraćeni s mučninom, povraćanjem, gubitkom tjelesne mase i febrilitetom kod agresivnijeg tipa bolesti. U 35-40% bolesnika upalne bolesti crijeva popraćene su ekstraintestinalnim manifestacijama (EIM) kao aksijalna ili periferna atropatija, episkleritis, nodozni eritem te piderma gangrenozum (7).

### 1.1.6 Dijagnoza ulceroznog kolitisa

Dijagnoza UK temelji se na nekoliko dijagnostičkih pretraga. Prije svega to je analiza kliničkih simptoma kojima se postavlja sumnja na jednu od UBC-a. Za konačnu potvrdu dijagnoze potrebno je učiniti proktosigmoidoskopiju kojom će se potvrditi postojanje upale na temelju promjenjene i oštećene sluznice crijeva. Na slici 3. je prikazana usporedba zdrave i upaljene sluznice. Nadalje, potrebno je učiniti osnovne laboratorijske pretrage krvi uključujući C-reaktivni protein, sedimentaciju eritrocita, trombocita i fibrinogena. Kolonoskopija ili irigografija je pretraga kojom se upotpunjuje pregled sluznice, budući da se tijekom pregleda snimi stanje sluznice i uzme uzorak sluznice crijeva za patohistološku analizu. Važnost se pridaje i mikrobiološkom pregledu stolice kako bi se diferencijalno dijagnostički isključila mogućnost infekcije bakterijom ili gljivicama. U nalazu krvne slike često je vidljiva anemija ili poremećaj elektrolita. Radiološkim pretragama abdomena omogućuje se određivanje stupnja bolesti debelog crijeva kao i rano otkrivanje mogućih komplikacija na hepatobilijarnom i uropoetskom traktu (7).



Slika 3. Endoskopski prikaz zdrave i upaljene sluznice debelog crijeva



### 1.1.7 Terapija

UK se može liječiti na dva načina i to farmakološkim ili kiruškim putem. Liječenje se bazira na postizanju remisije te održavanju remisije. Prva linija odnosi se na primjenu mesalazina i čepića u dozi od 4 g na dnevnoj bazi. Osobe koje ne podnose aminosalicilate propisuje se druga linija terapije, a to su glukokortikoidi. Topički kortikosteroidi su djelotvorniji u odnosu na oralne aminosalicilate. Kako bi se održala remisija upotrebljavaju se mesalazin, aminosalicilati te azatiprin. Terapija se najčešće primjenjuje u razdoblju od 4 – 12 tjedana. U početku bolesti daju se klizme ili čepići mesalazina svaku večer, a potom se smanjuje na svaku drugu ili treću večer. Postoji novi lijek vedolizumab koji pokazuje obećavajuće rezultate kod srednje teških kao i kod teških bolesnika UK koji ne reagiraju na imunološku terapiju. Kronični bolesnici liječe se oralnim aminosalicilatima te dijetom s odgovarajućim jelovnikom koji se bazira na unosu adekvatne količine proteina i kalorija. UK također se može izliječiti i kiruškim putem. Proktokolektomija s ileoanalnom anastomozom predstavlja operaciju izbora. Kiruška terapija može se podijeliti na hitnu, urgentnu te elektivnu terapiju. Hitnu operaciju potrebno je provesti za vrijeme nekontroliranog krvarenja te toksičnom megakolonu. Urgentna operacija je potrebna za vrijeme teškog kolitisa. Kada bolest ne reagira na terapiju bolesnik UK podliježe elektivnoj operaciji (6,7).

## 1.2 Peptidaze

Peptidaze ili proteinaze su velika skupina enzima koja specifično sudjeluju u razgradnji odnosno hidrolizi peptidne veze. To su enzimi koji su uključeni u regulaciju više različitih fizioloških sustava i procesa, a posebno su važni u razgradnji proteina i peptida kako u gastrointestinalnom sustavu tako i u stanicama. Pokazano je da imaju vrlo visoku selektivnu ulogu prilikom cijepanja specifičnih supstrata kao i mogućnost djelovanja na brojne biološke procese u obliku posttranslacijske regulacije. Proteolitička aktivnost ima ulogu tijekom embrionalnog razvoja, u cjeljenju rana, remodeliranju, angiogenezi, aktivaciji imunskog odgovora, regulaciji staničnog ciklusa kao i u apoptozi. U prilog njihove važnosti govori i činjenica da čak 553 gena u ljudskom genomu kodira peptidaze, dok u mišjem genom 628 gena. Za sve proteaze glavna je funkcija hidroliza peptidne veze, no različiti su mehanizmi kroz koje one ostvaruju hidrolizu te se stoga i različito klasificiraju. Prema strukturi karakteristikama djelovanja mogu se podijeliti: a) s obzirom na mjesto cijepanja peptidne veze (egzopeptidaze – cijepaju aminokiseline s kraja peptida, endopeptidaze – cijepaju unutar lanca peptida); b) s obzirom na dužinu supstrata (oligopeptidaze – djeluju na male peptide, proteaze – cijepanje velikih proteina); c) s obzirom na vrstu katalitičkog mjesta (cisteinske, tironinske, aspartatne, serinske i metalopeptidaze); d) s obzirom na položaj katalitičkog djelovanja (endoenzimi– unutarstanični, ektoenzimi–izvanstanični) i e) s obzirom na C-terminalni kraj kod membranskih peptidaza ( tip I i tip II) (8). Za ovo istraživanje izrazito su važne peptidaze koji pripadaju genskoj obitelji dipeptidil-peptidaza (DP)4. Svrstavaju se u serinske peptidaze sa sličnim aktivnostima prema supstratima. U njih se ubrajaju: dipeptidil–peptidaza (DP)8, DP9, FAP- $\alpha$ , DP6 te DP10 . DP 8, DP 9 i FAP-  $\alpha$  djeluju kao enzimi, a pokazano je da u primarnoj strukturi imaju 27-60% sličnosti (9).

### 1.2.1 Obitelj dipeptidil-peptidaze 4

Zajednička karakteristika gotovo svih članova obitelji dipeptidil-peptidaza (DP)4 proteaza jest odcjepljivanje N-terminalnih dipeptida s peptida u čijoj se primarnoj strukturi na pretposljednem mjestu nalaze aminokiseline prolin ili alanin. Navedenu ulogu ima mali broj proteaza i upravo zbog toga ove peptidaze imaju važnu, a s druge strane i jedinstvenu ulogu u organizmu.

### 1.2.2 Dipeptidil-peptidaza 8 i 9

Dipeptidil-peptidaze (DP)8 i 9 imaju različitu staničnu lokalizaciju od DP4, a time, pretpostavlja se i nešto različite uloge. Do nedavno, smatralo se da samo DP4 ima ključnu ulogu kako u fiziološkim tako i u patološkim procesima. U skladu s prethodnim istraživanjima inhibitori DP4 su se koristili, i još uvijek se koriste, u liječenju dijabetesa, raznih promjena u imunološkom sustavu i upalnom odgovoru kao i razvoju karcinoma. No, istraživanja u kojima je pokazano da se u limfocitima T koji nemaju izraženu DP4 može se izmjeriti DP4 aktivnost (9) kao i u tkivima štakora s mutiranom inaktivnom DP4 (10) otvorila su mogućnost da postoje još neki enzimi koji imaju sličnu funkciju kao i DP4. Stoga, temeljem novih saznanja danas se razmatra pretpostavka o važnosti aminopeptidaza, DP8 i DP9 u nizu patoloških poremećaja. Posebno je zanimljiva uloga ovih aminopeptidaza u razvoju i napredovanju tumora i razvoju upale. Unutarstanični homolozi DP8 i 9 lokalizirani su u citosolu i jezgri, a povezuju se i s plazma membranom. Istraživanja u kojima su se primjenili inhibitori ovih enzima upućuju na snažnu ulogu DP8 i 9 u imunološkom sustavu i diferencijaciji adipocita. Također, smatra se da je DP9 neophodna za preživljavanje novorođenčadi, sazrijevanju antigena te u staničnoj

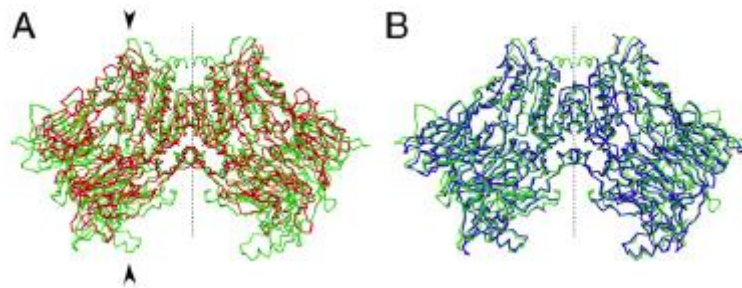
migraciji i adheziji. Nedavno je pokazano da DP9 sudjeluje u regulaciji aktivnosti tirozin-kinaza u slezeni te da DP9 na taj način sudjeluje u regulaciji signalizacije B stanica. Nadalje, promjena aktivnosti DP9 povezana je i s patofiziološkim stanjem, kao što je karcinom pluća budući da je uočeno da enzim potiče metastazu navedenih stanica (11). DP8 i DP9 sudjeluju i u regulaciji aktivacije limfocita B i T. Enzimska aktivnost prisutna je u uzgojenim ljudskim i mišjim leukocitima. Prilikom primjene selektivnog DP8 i 9 inhibitora pokazana je smanjena proliferacije stanica periferne krvi te otpuštanje interleukina (IL). Enzimska aktivnost DP9, no ne i DP8 utječe na brzinu razgradnje antigen-peptida koji sadrže prolin i time ima važnu ulogu u prezentaciji antigena, dok DP8 je važan u upali crijeva (12). U karcinomu, povećan je izražaj DP8 mRNA, a kod kronične limfocitne leukemije i DP9 mRNA u karcinomu testisa. Povećane razine mRNA, proteina i enzima DP8/DP9 zabilježena je u ljudskim meningiomima. *In vitro* DP8 i DP9 cijepaju dobro poznat DP4 supstrat neuropeptida Y, glukagonski peptid-1, glukagonski peptid-2 i peptid YY. *In vitro* uvjetima dokazano je cijepanje kemokina faktora CXCL12- $\alpha/\beta$ , proteina induciranog interferonom- $\gamma$  i interferona induciranog T staničnim  $\alpha$ -kemoatraktantima zbog toga što su DP8 i 9 unutarstanični enzimi i imaju vrlo malu fiziološku ulogu u *in vivo* uvjetima. Blokodom ekspresije DP8 i DP9 dolazi do smrti stanica tumorskih stanica (Ewing sarkom). Jedan od prvih identificiranih supstrata za DP9 je antigen peptidnog bubrežnog ubikvitina-1 (13). DP8 i DP9 imaju sličnu specifičnost prema supstratu, oba enzima preferiraju supstrate s aromatskom ili razgranatom alifatskom aminokiselinom. U *in vivo* uvjetima potvrđeno je da većina supstrata DP8 i 9 sadrže prolin na položaju P1, dok se alanin nalazi u položaju P2. Dokazano je da oba enzima izrazito dobro hidroliziraju sintetičke kromogene Gly-Pro-pNA, Ala-Pro-pNA i Arg-Pro-pNA. Optimalni pH za DP9 iznosi pH 7,5 – 8,0 dok DP8 djeluje pri neutralnom pH 7,4 (14).

Geni za DP8 i DP9 lokalizirani su na humanom kromosomu 15q22 i 19p1303. Na tim lokusima preslikane su različite bolesti poput plućne fibroze, karcinoma jajnika te Bardet-Biedl sindrom tip 4. DP8 i DP9 povezuju se s tim bolestima, no mehanizmi nisu još u potpunosti otkriveni. Ljudski DP4 gen zauzima 81,8 kb te ima 26 ezgona u veličini od 45 do 1,386 bp. Za razliku od ljudskog genoma DP4, ljudski gen DP9 obuhvaća 48,6 kb genomske sekvence i sadrži 22 ezgona u duljini od 53 do 1431 bp. Ljudski gen DP8 posjeduje 71 kb i 20 ezgona (15).

### 1.2.3 Strukturna obilježja DP8 i 9 proteina

DP8 i DP9 su aktivni kao dimeri, iako je zabilježena i aktivnost monomera i tetramernih jedinica. (16). Sekvencija odnosno primarna struktura DP8 razjašnjena je iz cDNA jer prirodni protein do danas nije izoliran. U primarnoj strukturi nalazi se 882 aminokiseline, a 27% strukture je identično i 51% slično aminokiselinskom slijedu primarne strukture DP4, što se povisuje na 35% aminokiselinske identičnosti i 57% sličnosti u hidrolaznoj domeni. Kristalna struktura još nije opisana, no koristeći prethodna znanja o građi DP4 i ostalih molekula iz obitelji, dizajnirani su modeli ovog enzima koji opisuju 2 domene:  $\alpha/\beta$  hidrolaznu domenu koja sadrži katalitički motiv Ser739-Asp817-His849 i  $\beta$ -propelernu domenu s 8 krakova s dvije lutaminske kiseline koje u katalitičkom utoru imaju ključnu ulogu – pretpostavlja se da usidruju N-terminalni kraj peptidnih supstrata (17). N- i O- vezujuća mjesta u strukturi DP8 nisu identificirana, a analizom pokazano je da ovaj protein ne posjeduje potencijalnu transmembransku domenu (18). Do sada su klonirana dva oblika DP9 proteina. Prvi transkript se sastoji od 863 aminokiseline i pokazuje 26% identičnosti i 47% sličnosti s humanim oblikom DP4. Kristalna struktura DP9 također još nije razjašnjena. U katalitičkom mjestu oba enzima

nalazimo specifičnu trijadu aminokiselina, Ser-Asp-His koja je karakteristična ne samo za proteine DP4 obitelji, nego i za mnoge druge proteaze. Unatoč visokom stupnju sličnosti između DP4 postoje i neke strukturne razlike (slika 4.). Utvrđeno je da DP8 ima veći utor na mjestu vezivanja supstrata. Nadalje, za razliku od DP4, 8 i 9 nemaju transmembransku domenu. Iako DP9 posjeduje 2 potencijalna N-glikozilacijska mjesta, nema dokaza o glikozilaciji enzima te utjecaja glikolizacije na aktivnost enzima (19, 20).



Slika 4. Usporedba dimera DP8 i 9 enzima sa strukturom DP4 A) usporedba DP8

(zeleno) i DP4 (crveno) B) usporedba DP9 (zeleno) i DP4 (plavo)

#### 1.2.4 Geni za DP8 i 9 proteine

Geni za DP8 i 9 nalaze se na različitim kromosomima (15q22 i 19p13.3) ali pokazuju visok stupanj homologije, 58% u ukupnoj primarnoj strukturi i čak 72% u području za koji se pretpostavlja da sadrži katalitičku domenu (17).

### 1.2.5 Inhibitori DP8 i 9 proteaza

Danas poznati, najsnažniji inhibitor DP8 i 9 je mala molekula 1G244. 1G244 je vremenski ovisan čvrsto vezujući inhibitor DP8 i reverzibilni kompetitivni inhibitor DP9. 1G244 nosi malu izoindolinsku jedinicu na P1 te 1-(4-4-diflor-benzhidril)-piperazinsku skupinu na položaju P2, stoga DP8 i DP9 ima veću aktivnu šupljinu u odnosu na DP4. Problem generiranja DP8 i 9 enzima ostaje neriješen (21). Inhibitori se i dalje istražuju s ciljem da se pronađe selektivni inhibitor za pojedini enzim.

### 1.2.6 Regulacija enzimske aktivnosti

SUMO1 predstavlja prvi otkriveni alosterički aktivator DP9. DP9 se veže na SUMO1 male proteine koji imaju sposobnost vezanja na ciljni protein pri čemu mijenja svojstva lokalizacije, stabilnosti, aktivacije te interakcije s drugim proteinima. U regiji SUBA koja se nalazi u  $\beta$ -propeler domeni vrši se vezanje SUMO1 na DP9. Takva interakcija je nekovalentna, stoga je moguće da SUMO1 protein posreduje u interakciji između DP9 i sumoiliranog protein-partnera. Istraživanja koja se temelje na enzimskim istraživanjima aktivnosti DP9 potaknula su primjenu malih peptida koji su slični interakcijskoj površini SUMO1 s DP9. Interakcija se može ostvariti pomoću tiolnih spojeva i vodikovim peroksidom. Takvi spojevi mogu uzrokovati oksidaciju i dimerizaciju slobodnih cisteinskih ostataka što dovodi do smanjene fleksibilnosti strukture enzima i potpunog gubitka enzimske aktivnosti. Zbog neutralnog pH u protoniranom stanju većina proteina nema promjene u cisteinu, a ukoliko se dogode onda su ti promjenjeni cisteini u kiselome mediju. DP8 i 9 posjeduju 12 (21) slobodnih cisteinskih ostataka poput DP4 i FAP- $\alpha$ , no položaj tih cisteina nije stalan pa se razlikuje u DP4

prodici. Cistein u DP4 i FAP- $\alpha$  ima potpuno različitu ulogu nego li u DP8 i 9 proteazama zbog toga što nije osjetljiv na oksidaciju te enzimska aktivnost nakon provedenog tretmana tiolnim spojevima ostaje potpuno nepromjenjena. Pretpostavlja se da bi DP9 mogao imati važnu ulogu u oksidacijskom stresu kao i izrazitu osjetljivost na redoks status stanice (22).

### 1.2.7 Prirodni supstrati

Pokazano je da DP8 ili 9 enzimi u *in vitro* sudjeluju u katalitičkom cijepanju pojedinih prirodnih peptida. Pokazano je da u tkivu mozga neuropeptid Y može biti pocjepan uz prisutnost DP4 inhibitora što direktno upućuje na katalitičku aktivnost DP8 i 9. Istraživanja su utvrdila da su kalretikulin i adenilat-kinaza 2 također potencijalni prirodni supstrati ovih enzima. Međutim, vrlo je teško razlikovati i razlučiti između specifičnih supstrata DP8 i 9 obzirom na njihovu vrlo sličnu građu i enzimsku aktivnost. Utišavanje DP9 rezultiralo je povećanjem izražaja RU1 peptida te je time dokazan i prvi prirodni supstrat ovog enzima *in vivo* (13).



### 1.3 STAT transkripcijski čimbenici

Signalni pretvarač i aktivator transkripcije 3 (STAT3) (engl. Signal transducer and activator protein) proteini predstavljaju veliku skupinu citoplazmatskih molekula. U citoplazmi se nalaze u inaktivnom obliku, a nakon podražaja se mogu aktivirati. Fosforilacija je glavni mehanizam koji se koristi za njihovu aktivaciju, a nakon aktivacije slijedi njihova translokacija u jezgru stanice gdje potiču ili inhibiraju transkripciju ciljnih gena uključenih u regulaciju preživljavanje stanice, proliferaciju i metastaziranje. U procesu aktivacije ključnu ulogu imaju citokinski receptori koji imaju dvojaku ulogu. U prvom koraku prenose signal, a zatim potiču fosforilaciju JAK obitelji tirozin-kinaze. Inaktivacija STAT molekula zahtjeva njihovu defosforilaciju, a to se provodi djelovanjem specifičnih citoplazmatskih/nuklearnih fosfataza kao što je tirozinska-fosfataza. Također, STAT molekule se mogu inaktivirati i vezivanjem sa specifičnim proteinom u citoplazmi ili jezgri. Do sada je opisano sedam članova u ovoj obitelji: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B i STAT 6 (23). Sve STAT molekule imaju zajedničku ulogu, a to je prijenos signala iz receptora citokina i faktora rasta u plazmu membrane te potom u jezgri gdje reguliraju transkripciju ciljnih gena.

#### 1.3.1 Uloga STAT3 i 6 u razvoju upale

Uloga STAT proteina u upali odnosno UBC-u je područje koje se još uvijek istražuje. Prema dosadašnjim spoznajama čini se da STAT3 ima ključnu ulogu u UBC-u. Međutim, slično kao STAT1, nije jasno definirana njegova uloga te mu se pripisuje zaštitna i protuupalna uloga. Kao što je prethodno navedeno aktivacija STAT3 molekule uslijedi kao rezultat vezanja citokina, a u slučaju STAT3 molekule to je najčešće IL-6. IL-6 se veže na dobropoznati na

gp130 receptor, nakon čega slijedi fosforilacija JAK 1, 2 i TYK 2 konstitutivno vezane za citoplazmatsku domenu receptora. Osim IL-6 u aktivaciji STAT3 molekule mogu sudjelovati i drugi citokini poput IL-15, IL-21, IL-23, IL-17, IL-18, IL-10, IL-11, IL-22, IFN $\alpha/\beta/\gamma$  i matriks metaloproteinaze 9. Za pojedine, kao što su IL-2, IL-6, IL-15, IL-21, IL-23, IL-17 i IL-18 opisano je da imaju prouupalni učinak dok IFN $\alpha/\beta$ , IL-10, IL-11 i IL-22 imaju protuupalno djelovanje. Kao što je na početku navedeno više studija potvrdilo je povećanu fosforilaciju STAT3 u humanoj UBC, ali terapijski potencijal ciljnog proteina ostaje nejasan. Podaci bolesnika s UBC-a ukazuju da IL-6 posredovana fosforilacija STAT3 dovodi do aktivacije protuapoptičkih gena Bcl-2 i Bcl-xl, a što omogućuje preživljenje i klonsku ekspanziju aktiviranih T limfocita. Potonje je potvrđeno i na animalnom modelu gdje je pokazano da inhibicija STAT3 usporava i smanjuje proliferaciju T limfocita. Rezultat je pojačana sinteza citokina, kao i matriks metaloproteinaza, čime se podupire razvoj kroničnog upalnog procesa i narušavanje tkivne strukture. Također, pokazano je da je STAT3 ključan za diferencijaciju TH17 limfocita. Pokazano je da je IL6/STAT3 signalni put uključen u regulaciju različitih procesa kao što su stanična diferencijacija, proliferacija, apoptoza, angiogeneza, metastaze, a također i u regulaciji imunološkog odgovora (23).

STAT6 molekula ima identičan mehanizam aktivacije, ali u aktivaciji sudjeluju drugi medijatori. Prema dosadašnjim podacima glavnu ulogu imaju citokini IL-4 i 13. Rezultati istraživanja upućuju da IL-4/STAT6 signalni put ima važanu ulogu u kompleksnoj mreži aktivacije i polarizacije makrofaga, ključnih stanica u razvoju upalnog procesa (24).

### 1.3.2 Uloga i mehanizmi aktivacije STAT3 i STAT6 u stanicama tumora

STAT3 molekula poznata je u borbi protiv raka. Kod velikog broja osoba oboljelih od raka pokazana je povišena razina konstitutivnog aktiviranog STAT3 te transkripcijskog profila koji je u skladu sa STAT3 reguliranom ekspresijom gena. Povišena razina aktiviranog STAT3 upućuje na lošu dijagnozu bolesti. Također, rezultati pokazuju da STAT6 ima kritičnu ulogu u ranim fazama razvoja tumora jer sudjeluju u modulaciji upalnog odgovora i kontroli aktivacije upalnih stanica na mjestu razvoja malignog procesa. Geni koji aktiviraju STAT3 ujedno i blokiraju apoptozu te pogoduju proliferaciji, preživljavanju stanica, angiogenezi te inhibiciji antitumorskih reakcija. Stanice tumora koje nose aktivirani STAT3 zahtijevaju kontinuiranu STAT3 aktivaciju kao i fenotip nazvan „onkogeno ovisnost“. Pristup koji ometa STAT3 signalizaciju dovodi do inhibicije rasta i apoptoze u staničnim linijama tumora te imaju cilj smanjiti rast tumora. STAT3 i STAT1 su vrlo slične molekule koje djeluju kao faktori transkripcije te se vežu za slične sekvence DNA. Regulacija njihove aktivacije i inaktivacije ima za cilj postizanje suprotnog učinka. Primjerice kod karcinoma aktivirani STAT3 je onkogen dok se aktivirani STAT1 ponaša kao tumor-supresor. Selektivna inhibicija STAT3 bez signalizacije STAT1 može se prikazati kao osnova za razvoj lijeka u borbi protiv raka, no u eksperimentalnim uvjetima STAT1 i STAT3 mogu biti funkcionalno zamjenjivi u promociji citokina koji su izazvani ekspresijom gena (npr. STAT1 ima sposobnost utjecaja na ekspresiju gena putem IL-6 receptora, dok STAT3 može djelovati preko interferon-gama receptora). Također, aktivirani STAT5 pokazuje malu sličnost u sekvenci sa STAT3 koji je također uključen u onkogenezi (29). Povećane razine fosforiliranog STAT3 otkrivene su kod većine humanih karcinoma te u tumorskim staničnim linijama, no nisu još otkrivene mutacije u prirodi koje proizvode aktivaciju STAT3. Međutim, postoje više ulaznih jedinica koje vode do aktivacije

STAT3 poput: receptora ljudskog faktora rasta (EGFR), člana RTKove ErbB /HER porodice, citokiniskih receptora IL-6 tipa koji čine kompleks s gp130 i JAKSa te nekoliko GPCR-a. Dokazano je da više faktora rasta (npr. EGF, TGF $\alpha$ , PDGF i CSF1) i citokina (npr. IL-6, LIF, CT-1, CNTF, IL-10, IL-11 i OSM) aktiviraju STAT3 izravno ili to čine nakon aktivacije s RTK-om ili GPCR-om. Također, povišene razine liganda koji aktiviraju STAT3 poput TGF- $\alpha$  ili IL-6, otkrivene su u serumu s različitim malignim procesima. Povećane količine TGF- $\alpha$  ili IL-6 održavaju aktivaciju STAT3 (30) .

STAT3 kao i drugi proteini iz STAT porodice sadrži: domenu za dimerizaciju na N-terminalnom kraju, domenu zavojnice za interakciju protein-protein, središnju domenu za vezanje DNA, SH2 domenu za regrutovanje receptora, ostatak tirozina na položaju 705 (Tyr-705) te C-kraj koji kodira aktivacijsku domenu transkripcije. STAT3 aktivira se receptorima: tirozin kinazama EGFR, HER2, receptorima faktora rasta fibroblastnog faktora (FGFR), IGFR, HGFR i receptora faktora rasta koji potiče iz trombocita (PDGFR), kinaze koja je povezana s receptorima (JAK) te ne-receptorske kinaze (Src i Abl) putem procesa fosforilacije (29). STAT3 protein pretežito se nalazi u citoplazmi. Nakon vezanja liganda za izvanstaničnu domenu transmembranskih receptora inducira se unutarstanična aktivacija tirozin kinaza kao Janus kinaza (JAKS). Receptori se fosforiliraju na Tyr ostatke gdje se stvaraju mjesta za priključivanje nefosforiliranog proteina STAT3 kroz SH2 domenu. STAT3 se fosforilira na Tyr-u pri čemu dolazi do disocijacije receptora i stvara se aktivirani STAT3-STAT3 dimer kroz recipročnu interakciju SH2-pTyr705. Nakon translokacije u jezgri, STAT3 kompleks se veže na mjesta u DNA gdje se odvija transkripcija gena (32). Fosforilacija Tyr-405 kritična je za funkciju STAT3 jer se istovremeno može dogoditi i fosforilacija serina 727 koja ima ujedno i stimulativne i inhibicijske učinke za transkripciju gena. Fosforilacija Ser-727 može inhibirati fosforilaciju Tyr-

705. Tirozin fosfataza u citoplazmi defosforilira STAT3 na Tyr-705 kako bi se deaktivirala njegova funkcija. STAT3 signalizacija se također može negativno gledat kroz dvije dodatne faze. Supresor citokinske signalizacije (SOCS) inhibira STAT3 na transkripcijskoj razini, no suprotno tome inhibitor aktiviranog STAT1 (PIAS1) inhibira STAT3 izravnom interakcijom (30).

### 1.3.3 Uloga STAT3 u prevenciji raka

Pokazano je da je STAT3 aktivan u mnogim vrstama raka uključujući: rak dojke, rak kože, rak jajnika, rak prostate, multipli mijelom, limfom i leukemiju, tumor mozga, Ewingov sarkom, rak želuca, rak jednjaka, rak debelog crijeva i rak gušterače. STAT3 se može zadržati u konstitutivnom aktivnom stanju kroz deregulaciju signalnih molekula proteina koji imaju negativan utjecaj na STAT3. SOCS proteini inhibiraju STAT3 na razini transkripcije dok PIAS1 inhibira STAT3 izravnom interakcijom. STAT faktori moduliraju vlastitu ekspresiju proteina te se međusobno uklapaju. STAT3 može regulirati ekspresiju STAT1, STAT2, STAT3, STAT5a, STAT5b, STAT6 te uzvodne kinaze JAK2 i JAK3 pomoću jednog ili više cis elementa u svojim promotorima. STAT3 je glavni regulator za STAT/JAK signalne puteve te je konvergentna točka transformirane signalizacije tijekom karcinogeneze (31).

#### 1.4 Sinteza dušikovog-oksida i aktivnost inducibilne dušične sintetaze

U organizmu čovjeka dušikov-oxid se neprestano stvara, a nastaje iz aminokiseline L-arginin uz katalitičko djelovanje dušične sintetaze. Enzimi pripadaju hemoproteinima i za svoju aktivnost trebaju NADPH, tetrahidrobiopterin, FAD i FMN kao kofaktore. Dušične sintetaze se dijele u dvije osnovne skupine, konstitutivna i inducibilne, do sada su poznata tri izoenzima. U mozgu, perifernim živcima i stanicama vaskularnog endotela nalazi se konstitutivni enzim koji je ovisan o kalciju i kalmodulinu, iz čega proizlazi da će svako stanje koje dovodi do povećanja kalcija imati utjecaj na sintezu NO. Jedan izoenzim je prisutan u mozgu, a drugi u endotelnim stanicama. U makrofagima i neutrofilima nalazi se treći izoenzim, inducibilna NO-sintaza ili iNOS, koja suprotno od konstitutivne, nije ovisna o kalciju, a koju induciraju citokini i endotoksini, a inhibiraju glukokortikoidi. No u organizmu ima višestruku ulogu. Stvoren u stanicama vaskularnog endotela djeluje vazodilatatorski održavajući tonus krvnih žila i time sudjeluje u regulaciji krvnog tlaka, u živčanom sustavu djeluje kao neurotransmiter, a na periferiji putem živaca regulira gastrointestinalne, respiratorne i genitouretralne funkcije. Nadalje, NO-u se pripisuje i citotoksično djelovanje jer stvoren u makrofagima ima toksični učinak na gljivice, bakterije i tumorske stanice. Ono što je nama važno je i dokaz da NO sudjeluje u razvoju upalnog procesa. Promjene u stvaranju NO uzrok su raznih patoloških stanja. Rezultati istraživanja ukazuju da povećana produkcija NO dovodi do oštećenja tkiva. Temeljem dosadašnjih spoznaja možemo zaključiti da su znanstveni dokazi o njegovoj ulozi u patološkim procesima oprečna, a i nije u potpunosti razjašnjeno kojim mehanizmom uzrokuje staničnu smrt.

iNOS je solubilni enzim aktivan u obliku homodimera. Različiti citokini i bakterije sudjeluju u aktivaciji ovog enzima, a rezultat je povećanja produkcija NO, a u kaskadnoj aktivaciji ključnu

ulogu ima i NF $\kappa$ B molekula. Aktivnost ovog enzima regulirana je, uglavnom na transkripcijskoj razini, a vrlo malo kroz posttranslacijske mehanizme, fosforilaciju ili glikolizaciju. Gen za iNOS nalazi se na kromosomu 17 i pokazuje 53% sličnosti s izoenzimom u mozgu te 51% sličnosti s izoenzimom u epitelnim stanicama. Citokini koji imaju ključnu ulogu u aktivaciji enzima su TNF- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  i interferon- $\gamma$ . U signalnom putu aktivacije najvažniju ulogu ima NF $\kappa$ B, a alternativno u aktivaciji iNOS mogu biti uključeni JNK i STAT molekula te MAPK. Ovi podaci upućuju da je za potpunu aktivaciju iNOS potrebna aktivacij više signalnih puteva (33).

## 1.5 Polimerazna lančana reakcija – PCR

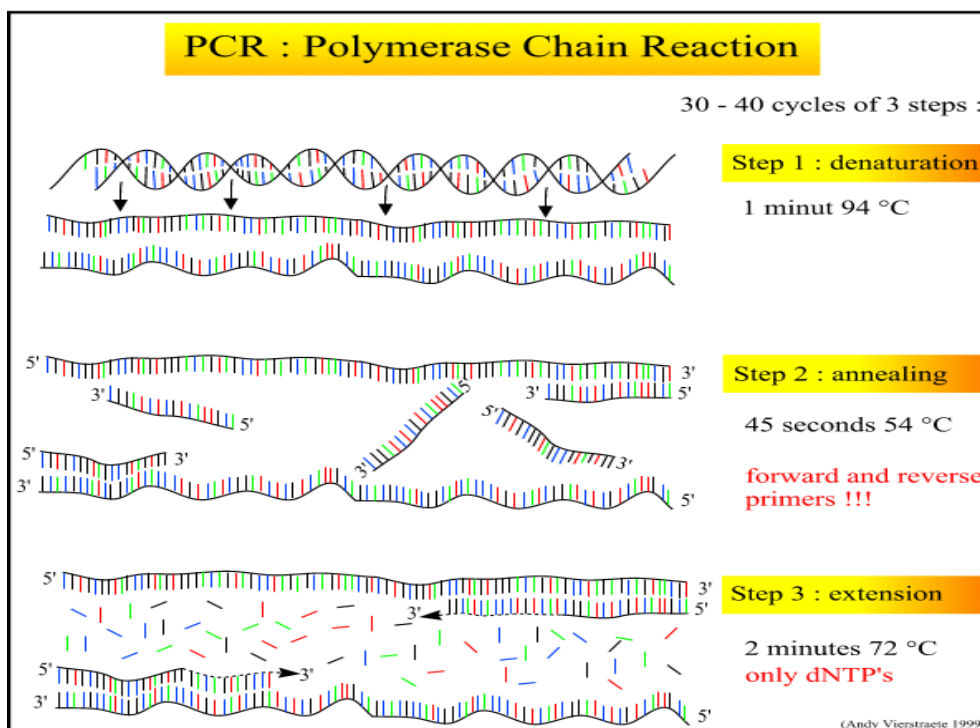
Američki znanstvenik Kary Mullis 1984. godine otkrio je i opisao polimeraznu lančanu reakciju u *in vitro* uvjetima za što je dobio i Nobelovu nagradu 1993. godine. Lančana reakcija polimeraze (PCR) konstruirana je na replikaciji DNA u stanicama, a koristi se za umnažanje kratkog dijela DNA u veliki broj identičnih kopija. Uz pomoć PCR metode otkrivene su genomske strukture kao i amplifikacija nekih složenijih genoma. Zbog svoje preciznosti, brzine i relativne niske cijene ova tehnika česta je u: rutinskim laboratorijima, biološkim istraživanjima, kliničkoj dijagnostici, testiranju očinstva, forenzici i arheologiji. PCR u molekularnoj biologiji predstavlja jednu od najvažnijih tehnika. PCR odvija se u instrumentu „thermal cycleru“ koji na automatski i vrlo precizan način kontrolira temperaturu u određenim vremenskim intervalima. Ciklus PCR-a sastoji se od tri koraka: denaturacija, vezanje početnice te produljivanje (slika 5.) (25,26).

Prvi korak čini denaturacija koja se odvija pri temperaturi od 95°C gdje dolazi do razdvajanja dvolančane DNA na dva jednolanačana lanca. Pri visokim temperaturama slabe vodikove veze između komplementarnih baza pucaju, dok kovalentne veze između deoksiriboze i fosfata ostaju nepromjenjene.

U drugom koraku temperatura se postepeno smanjuje na „melting temperature“ koja se izračunava prema formuli ( $T_m = 4 * (\text{broj G} + \text{broj C}) + 2 * (\text{broj A} + \text{broj T})$ ), a odnosi se na parove baza GC i AT unutar sekvence početnica (25). Na temelju izračunate temperature slijedi hibridizacija, odnosno vezivanje početnica na sekvencu DNA lanca koja je komplementarna s početnicama. Nakon vezivanja, početnice se suprotno orijentiraju u odnosu na ciljanu sekvencu DNA kako bi se omogućila normalna sinteza. Uobičajno trajanje ovog koraka je od 15 do 60 sekundi. Snižavanje temperature odvija se vrlo brzo zbog sprječavanja renaturacije dvaju lanca DNA.

Produljivanje je treći korak koji se odvija na temperaturi od 72°C. Pri tom koraku odvija se sinteza komplementarnog lanca DNA. Trajanje ovisi o duljini fragmenta (duljina sintetiziranog fragmenta od 1kb odgovara jednoj minuti). DNA polimeraza prepoznaje mjesta na DNA lancu gdje se nalaze početnice te se potom veže na njih. Na 3' kraju početnica započinje produljivanje na način da se stvori dvostruki lanac iz jednostrukog. U smjeru 5' → 3' sintetizira se termostabilna DNA polimeraza, pri čemu se na 3' kraj početnice dodaju slobodni nukleotidi. Na kraju prvog PCR ciklusa dobiju se dvije dvolančane DNA. Takav PCR produkt naziva se ampikon. Teoretski se može reći da nakon svakog novog ciklusa se udvostruči ciljna DNA (26).





Slika 5. Prikaz PCR metode (26)

PCR metoda koristi reagense točno određene koncentracije. PCR smjesa sastoji se od pufera za DNA polimerazu, smjese za 4dNTP-a, DNA polimeraze, početnice i ciljne DNA koja predstavlja kalup za sintezu.

### 1.5.1 Pufer

Prilikom provođenja reakcije poželjno je da pufer sadrži određenu koncentraciju  $Mg^{2+}$  iona što ovisi o tipu DNA polimeraze koja se upotrebljava. Preporučuje se korištenje pufera i polimeraze od istog proizvođača. Neki proizvođači proizvode pufer bez magnezija, a tada je potrebno eksperimentalnim putem odrediti optimalnu koncentraciju. Najpoznatiji pufer Tris-HCL pri visokim temperaturama smanjuje pH u reakcijskoj smjesi kako bi se što bolje aktivirala polimeraza. Puferi koji imaju pKa 6 do 7 su optimalni.

### 1.5.2 Nukleotidi

Kako bi se mogla provesti sinteza novog DNA lanca prema kalupu, polimerazi su potrebna sva 4 dNTP-a u ekvimolarnoj koncentraciji. Preporučuje se upotreba koncentracije 200  $\mu$ M. Ukoliko su veće koncentracije dNTP-a, može doći do pogrešaka prilikom sinteze novog lanca. Manje koncentracije nisu preporučljive zbog povećane 3'  $\rightarrow$  5' egzonukleazne aktivnosti DNA polimeraze koja može uzrokovati degradaciju jednolančane DNA (npr. početnice).

### 1.5.3 Početnice

Početnice su sastavljene od 16 do 30 oligonukleotida koje su komplementarne određenoj sekvenci. Na taj način početnica kopira točno određenu sekvencu koja je originalna DNA. Specifičnost vezanja i efikasnost amplifikacije su dva najvažnija parametra prilikom konstruiranja početnica. U drugom koraku PCR-a „annealing“ specifičnost se kontrolira duljinom fragmenta i temperaturom. Početnica pokazuje i do četiri puta veću specifičnost sa svakim novim dodanim nukleotidom, stoga je potrebno odrediti duljinu donje granice početnice. Najbolja specifičnost prikazana je oligonukleotidima od 18 do 24 baze.

### 1.5.4 Polimeraza

DNA polimeraza okarakterizirana je s nekoliko funkcija, no među najvažnije ubrajaju se popravljanje i replikacija DNA. Za PCR metodu upotrebljavaju se DNA-ovisne ili RNA-ovisne polimeraze. Za odabir adekvatne polimeraze u PCR metodi potrebno je imati informacije o

vjernosti kopiranja kalupa te stupanj efikasnosti za pojedine polimeraze u sintezi. Snažan utjecaj na efikasnost ima procesivnost enzima koja raste zajedno s afinitetom enzima prema kalupu. Uz pomoć polimeraze započinje replikacija koja se disocira sa supstrata kada se umetne dovoljan broj baza. Sintezu nastavlja druga molekula enzima, iako još sinteza nije završena. Taq polimeraza je najčešće korištena polimeraza koja je izolirana 1969.godine iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*. Ona je homolog DNA polimerazi te bakteriji *E.coli*. Pri temperaturi od 72 °C do 75 °C je optimalana aktivnost enzima, dok na 95 °C je poluživot od 40 min koji je upotrebljiv za 50 ciklusa PCR-a. Različite rekombinantne vezije Taq polimeraze koriste se za PCR.

### 1.5.5 Ciljna DNA

U primjeni PCR metode može se pronaći DNA različitog podrijetla (DNA biljnog tkiva, genomska DNA čovjeka, bakterijska DNA). Važno je da uzorak DNA bude dovoljno čist kako ne bi došlo do ometanja aktivnosti polimeraze te da koncentracija početne DNA ne bude velika. Kako bi se postupak odvijao neometano i s potpunom efikasnošću potrebno je da u smjesi bude oko  $10^4$  do  $10^6$  molekula DNA.

### 1.5.6 Optimizacija PCR-a

Za PCR metodu potrebno je da temperatura, koncentracija reagensa i vrijeme u sva tri koraka budu optimalni. Prilikom uporabe novih početnica potrebno je da se reakcija odvija u standardnim uvjetima te da ovisi o duljini početnica i omjeru AT i CG parova baza. Ukoliko se

pri takvim uvjetima ne stvori odgovarajući produkt potrebno je promijeniti temperaturu, broj i vrijeme ciklusa. Za optimizaciju također je važna i koncentracija  $Mg^{2+}$  iona koja zajedno s dNTP-om tvori kompleks koji ima snažan utjecaj na aktivnost polimeraze. Uz postepeno povećanje koncentracije  $Mg^{2+}$  iona prati se aktivnost polimeraze što dovodi do optimalne koncentracije u PCR smjesi. Denaturacija polimeraze pri visokim temperaturama ili nedovoljna koncentracija polimeraze može biti uzrok u nastajanju male količine produkta. Što se tiče temperature, u prvom koraku mora bit vrlo visoka kako bi došlo do razdvajanja DNA lanca. U drugom koraku poželjno je da temperatura bude što viša kako bi se početnice bolje vezale na lanac DNA u suprotnom pri niskoj temperaturi dolazi do pogrešnog vezanja. Ponekad se nepostojanje produkta pripisuje visokoj temperaturi u „annealing“ fazi, stoga je potrebno ipak provodit taj korak na nešto nižoj temperaturi. Poteškoće u dobivanju produkta mogu biti i zbog pre dugog stajanja PCR smjese na sobnoj temepraturi ili na temperaturi ispod 70 °C što dovodi do nespecifičnog međusobnog vezanja početnica ili početnica s kalupom. Zbog nastajanja takvih kompleksa koji su supstarat za DNA polimerazu nastaju neželjeni produkti na kraju PCR metode. Za izbjegavanje ovog problema preporuča se da nakon dodatka svih reagensa, smjesa se lagano zagrije na temepraturu iznad 70 °C i doda DNA polimeraza. Oprema koja se koristi u PCR metodi mora bit sterilna te reagensi visoke čistoće kako bi se spriječila kontaminacija smjese (26).

### 1.5.7 Detekcija produkta PCR-om

Produkti PCR-a najčešće se detektiraju elektroforezom na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu. Ovakav način detekcije predstavlja kvalitativnu analizu. Produkti se boje etidijevim bromidom ili srebrovim nitratom radi lakše vizualizacije. Za određivanje veličine fragmenta koriste se standardni markeri. Southern blot metodom detektiraju se točno određeni produkti pri čemu se detektirani produkti nanose na nitroceluloznu membranu koja sadrži oligonukleotidne probe točno određene ciljne sekvence. Radi lakše vizualizacije produkti se su obilježeni fluorescentno ili radioaktivno (25). Kod primjene direktne hibridizacije koristi se kombinacija PCR-a i reverzne hibridizacije. Reverznom hibridizacijom ciljni fragmenti se hibridiziraju oligonukleotidnim probama koje se nalaze na nitroceluloznoj membrani. Konjugirana alkalna fosfataza streptavidinom dodaje se nakon hibridizacije i ispiranja kako bi se vezala za svaki pojedini biotinizirani hibrid. Obojenim talogom očitavaju se rezultati koji su nastali nakon inkubacije s kromogenom. Kvantifikacija PCR produkta postiže se hibridizacijom umnoženih produkata na oligonukleotidnim detekcijskim probama te kolorimetrijskom detekcijom. Biotinom obilježen PCR amplikon može se hibridizirati uz pomoć detekcije oligonukleotidne probe koja je vezana magnetskim česticama. Amplikon koji je označen biotinom veže se na konjugat avidin peroksidaza iz hrena. Otopina vodikovog peroksida i 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) dodaje se u isprani nevezni konjugat. Obojeni kompleks nastaje prilikom vezanja hren peroksidaza uz vodikov peroksid na magnetsku česticu koja ima sposobnost kataliziranja oksidacije TMB-a. Pri 660 nm mjeri se apsorbancija (26).

## 1.5.8 Vrste PCR-a

### 1.5.8.1 Inverzni PCR

Inverzni PCR upotrebljava se za amplifikaciju nepoznatih DNA regija koje su smještene uz poznate sekvence. Ova metoda temelji se na zasjecanju lanca u poznatim sekvencama pomoću DNA restrikcijskih enzima. Novonastali fragmenti se ligiraju i stvaraju kružne DNA koje se koriste za PCR metodu. Amplifikacija nepoznate sekvence odvija se pomoću dviju početnica koje se vežu i orijentiraju u suprotnim smjerovima pomoću poznate sekvece (25).

### 1.5.8.2 Multiplex PCR

Multiplex PCR metoda koristi više parova početnica kako bi se istovremeno mogla analizirati veća količina segmenata na istom uzorku DNA. 1988. godine Chamberlain dokazuje da se Multiplex PCR metodom može na istom uzorku provesti više amplifikacija te da se u reakciji koriste veći parovi početnica. On je u svom radu koristio šest početnica. Manji broj fragmenta analizira duljinu na agaroznom gelu elektroforezom, dok kod većeg broja fragmenta početnice se označavaju fluorescentnim bojama, a PCR produkti odvajaju se kapilarnom elektroforezom. Metodom hibridizacije na pločicama ili na specijalno pripremljenim hibridizacijskim membranama dokazuju se amplificirani fragmenti. Najveći problem ove metode je optimizacija PCR reakcije. Vrlo je važno da početnice imaju optimalne temperature tijekom vezanja. Ova metoda koristi se u forenzici, dokazivanju očinstva, identifikaciji humanih ostataka te tipizaciji HLA (27).

### 1.5.8.3 Nested PCR

Ponekad efikasnost umnažanja nije velika zbog male količine DNA te se PCR produkt ne može detektirati na agaroznom gelu. Poveća li se broj ciklusa, broj kopija ostaje isti te se nakon 40-tog ciklusa broj krivo sparenih fragmenata poveća i na kraju se dobije nejasna mrlja koja nije pogodna za očitavanje. Nested PCR odvija se pomoću dvostrukog PCR-a. U početku se provede PCR s malom količinom DNA, a potom se produkti iz prvog PCR-a upotrebljavaju kao kalupi za novi PCR. Reakcijska smjesa je ista kao i u prvom PCR-u, no početnice nisu iste. Oni se smještaju u produkt prve reakcije PCR-a. Nested PCR metodom mogu se dokazati male količine DNA kao i analiza cDNA u tkivu (27).

### 1.5.8.4 „Methylation-specific“ PCR (MSP PCR)

MSP PCR detektira metilirane baze u CpG regiji genomske DNA. Natrijevim bisulfitom tretira se ciljna DNA pri čemu se nemetilirani citozin pretvara u uracil nakon čega slijede dvije amplifikacije. Prvi set početnica veže se na DNA koja ima uracil, dok drugi set početnica na metilirani citozin. MSP PCR prikazuje metilaciju promotorskih CpG otoka koji su važni za regulaciju ekspresije gena (26).

#### 1.5.8.5 „Hot-start“ PCR

„Hot-start“ PCR koristi se kod smanjenja vjerojatnosti nespecifične amplifikacije. Provodi se na način da se PCR smjesa zagrije pri temperaturi od 94<sup>o</sup> C te da se u nju doda DNA polimeraza kako bi se se spriječila pogrešna aktivnost na sobnoj temperaturi ili tijekom zagrijavanja. Također, može se provoditi i s Taq polimerazom koja je inaktivna na temperaturi nižoj od temperature denaturacije. Ovaj PCR koristi se kod nespecifičnog međusobnog sparivanja početnica ili DNA kalupa s početnicom pri niskim temperaturama. Takvi kompleksi predstavljaju supstrat za DNA polimerazu koji se nakon amplifikacije prikazuju kao neželjeni produkti (26).

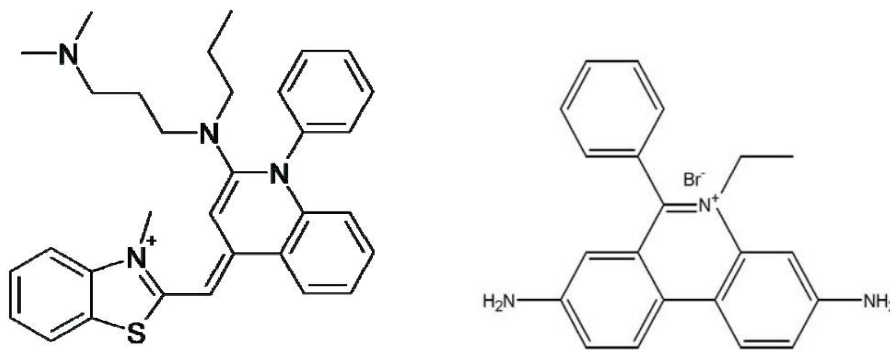
#### 1.5.8.6 Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR)

Polazni genetski materijal za ovu metodu je RNA molekula. Direktna amplifikacija s DNA polimerazom nije moguća zbog svoje strukture, stoga se RNA prvo prepisuje u komplementarnu DNA (cDNA) uz reverznu transkriptazu. cDNA je kalup za amplifikaciju jednog segmenta RNA. RT-PCR metoda prikazuje transkripciju jednog gena u tkivu ili stanici. Nakon reverzne transkripcije slijedi eksponencijalna amplifikacija. To je metoda vrlo visoke osjetljivosti koja pruža detekciju malog broja RNA molekula. RT-PCR metoda pronašla je primjenu u: analizi ekspresije gena, dijagnostici raznih genetskih i neoplastičnih bolesti, kloniranju gena eukariota u prokariote te u molekularnoj dijagnostici za dokazivanje RNA virusa (virus influence A, HIV te virus hepatitisa C) (26,27).



Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR) (engl. Real time PCR, rtPCR) je postupak koji se temelji na detekciji i kvantifikaciji florescentnog reporter signala prilikom PCR umnažanja. Za uspješno provođenje RT-PCR neophodni su uvjeti poput: dobro izolirane DNA, optimalnih primera koji sudjeluju u reakciji te optimizirani svi stupnjevi PCR reakcije (27). Proporcionalnom vrijednošću emitirane florecencije i količine PCR produkta prati se PCR umnažanje. Nakon svakog ciklusa umnažanja mjeri se florescencija. Pomoću „thermal cycling“, florescentne detekcije i kompjuterske analize detektira se akumulirani PCR produkt. Tijekom RT-PCR-a reakcijske komponente nisu ograničene čime se prati linearna faza umnažanja. Dinamičan raspon kvantifikacije, visoka analitička osjetljivost te preciznost samo su neke od odlika PCR-a u realnom vremenu. Neposredno nakon PCR umnažanja dostupni su kvantitativni rezultati bez purifikacije ili analize. Ukrižena onečišćenja PCR produkta su smanjena jer nisu potrebni dodatni koraci nakon PCR-a. PCR u realnom vremenu pronašao je široku primjenu u dijagnostici, određivanju virusa ili bakterija u uzorku, alelnom razlikovanju te analizi genske ekspresije. Reagensi koji imaju florescentni signal su: TaqMan probe, FRET probe, DNK vezujuće boje, „molecular beacon“ i njihovi derivati (Sunrise, Amplifluor, Amplisensor te „scorpion primers“), Fret probe, dvolančane probe te „universal template probe“. Umetanje ili vezanje boje na dvolančanu DNA predstavlja jednu od najjednostavnijih i finacijski prihvatljivih metoda PCR-a u realnom vremenu. Ovakvom testu nije potrebno florescentno označavanje nukleotida te se može koristiti standarni PCR test. S obzirom da se detektiraju specifični i nespecifični PCR produkti potrebno je provoditi optimizaciju PCR uvjeta uz pomoć analize krivulje topljivosti. Zbog dodatnih koraka i nižih vrijednosti specifičnosti ovaj test nije prikladan za upotrebu u dijagnostici te se koristi test proba specifičnih sekvenci. Florescentna boja etidij-bromid (EtBr) ili florescentne dvolančane DNA (dIDNA) vezujuće boje

(SYBER Green i BEBO) fluoresciraju nakon vezanja na DNA, stoga se koriste za praćenje umnažanja. Nastankom dvolančanog produkta raste i florescencija boja. Unutar baznih parova dvolančane DNA ubaci se EtBr. EtBr fluorescira eksitacijom ultraljubičastog svjetla u vidljivom dijelu spektra. Najčešće se koriste asimetrične cijan boje SYBER Green i BEBO koje se umeću u dIDNA. Na manji utor veže se dvolačana DNA fluorescentna boja SYBR Green. Ova boja fluorescira i onda kada nije vezana za DNA, no fluorescencija se povećava vezanjem (25). Strukture EtBr i SYBER Greena prikazane su na slici 6.



Slika 6. Strukturne formule SYBR Greena i etidij-bromida

Probe poput Amplisensora, TaqMana, molekularne oznake te UT probe rade prema principu FRET tehnologije na način da molekula apsorbira eksitacijsku energiju donora fluorofora te ju potom predaje preko dipol-dipol interakcije akceptoru fluoreofora. Nakon što se donor i akceptor razdvoje cjepanjem, promjeni se sekundarna struktura ili položaj na lancu što dovodi do povećanja florescencije. Oligonukleotidi koji imaju „reporter“ boju vezanu na 5' kraju te

„quencher“ na 3' kraju su TaqMan probe. One hibridiziraju s unutarnjom energijom PCR produkta. Fluorescencijski signal u nehibridiziranom stanju je izostavljen zbog relativne blizine „reporter“ i „quencher“ boje. „Reporter“ boja je supresirana FRET-om. Za vrijeme PCR reakcije kada se replicira predložak na koji je vezana TaqMan proba cijepa se proba pomoću 5' egzonukleazne aktivnosti polimeraze. Razdvoje se „quencher“ i „reporter“ boje te se izostavlja FRET. Svakim ciklusom fluorescencija se povećava proporcionalno broju cjepanja proba. TaqMan probi potrebna je mala optimizacija koja se koristi u multipleksnim testovima (25,26).

### 1.5.9 Primjena PCR-a

PCR svoju primjenu pronašao je u: medicini, forenzici, genetičkom inženjerstvu, molekularnoj biologiji te u drugim znanstvenim područjima (25). PCR metodom se može uvesti mutacija (delecija određenog dijela sekvence gena, insercija sekvence ili točkasta mutacija) u ciljnu molekulu DNA. Tim postupkom utvrđuje se: molekulska interakcija, međusoban odnos strukture i funkcije proteina te *in vivo* regulacija ekspresije gena. PCR metoda koristi se u kliničkoj mikrobiologiji i u mikrobiologiji hrane. Ona detektira i kvantificira mrtve i žive patogene za razliku od standardnih metoda koje isključivo detektiraju žive patogene. PCR je relativno brza metoda kojoj nisu potrebne velike količine uzorka za analizu. Prehrambena industrija koristi PCR metodu za dokazivanje alergena u hrani kao i prisutnost GMO-a. Iz gena alergena u lješnjaku napravljena je PCR-om amplifikacija fragmenta te je određena količina alergena (0.001%) u komercijalnom prehrambenom proizvodu. PCR upotrebljava se i kod određivanja krvnog srodstva, točnije za amplifikaciju mikrosatelita

(ponavljajuće regije unutar DNA sekvence) koje se nasljeđuju generacijama. Forenzika je znatno napredovala u 20.st. zahvaljujući PCR-u. Medicina koristi PCR za otkirvanje tumora kao i za razne infekcijske bolesti. Prilikom dijagnosticiranja HIV-a koristi se RT-PCR koji je osjetljiv na male količine virusne RNA u stanici. S obzirom na poznavanje sekvenci HIV virusa, napravljene su početnice s kojima se amplificira DNA nastala reverznom transkripcijom iz RNA virusa. Negativan PCR test pokazuje da se virus ne nalazi unutar stanice tj. da nema PCR produkta. PCR-om omogućuje se otkrivanje kromosomskih aberacija te somatske mutacije koje su karakteristične za određene vrste tumora. Projekt „ Human Genome Project“ važan je kod mapiranja i sekvencioniranja humanog genoma (26).

#### **1.5.10 Kvantifikacija PCR produkta**

PCR testovi se mogu podijeliti na kvantitativne i kvalitativne. Kvalitativni testovi imaju graničnu vrijednost iznad kojih su rezultati pozitivni, a ispod negativni. Za razliku od kvalitativnih, kvantitativni testovi posjeduju donju i gornju granicu unutar koje se detektira količina produkta u linearnom području. Poznata koncentracija smjese nukleotidnih sekvencija čine kvantitativni standard koji omogućuje kvantifikaciju PCR produkta. On se može direktno dodati u: PCR smjesu za umnažanje, uzorak koji prolazi svim fazama ili se umnaža u specijalnim reakcijskim tubama. Količina produkta u kvantifikacijskom standardu određena je količinom PCR produkta. Za vrijeme PCR umnažanja važno je da kvantifikacijski standard i sekvenca koriste iste početnice, a različite sekvence kako bi se omogućila odvojena detekcija (25).



## 2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Ulcerozni kolitis (UK) je kronična bolest crijeva koja se se razvija kao rezultat neadekvatnog imunosnog odgovora na neki od okolišnih čimbenika u genski osjetljivoj osobi. S druge strane, poznato je da proteaze DP8 i 9 katalitičkim djelovanjem na specifične supstrate mogu regulirati mnoge procese uključujući imunološki posredovane. Nadalje, pokazano je da STAT3 i STAT6 te iNOS reguliraju ekspresiju gena koji posreduju u preživljavanju, proliferaciji i apoptozi stanica.

Cilj ovog istraživanja je ispitati promjene transkripcijske aktivnosti DP8 i 9 tijekom razvoja i progresije kolitisa izazvanog primjenom natrijevog dekstran slulfata (DSS) u miševa te time utvrditi ulogu ovih proteaza. Također, cilj je ispitati i promjene izražaja gena transkripcijskih čimbenika STAT3 i 6 te iNOS u tkivu debelog crijeva.

### 3 MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Pokusni model DSS kolitisa i plan pokusa

U istraživanjima su korišteni C57BL/6 miševi uzgojeni u uzgojnom centru Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Pokusni model kolitisa izazvan je primjenom 3% otopine DSS koja se otopila u vodi za piće i primijenila kroz sedam dana. Svježa otopina DSS-a pripremala se svakog drugog dana. Kontrolne skupine životinja su tijekom pokusnog perioda konzumirale tekuću vodu *ad libitum*. Životinje su žrtvovane u tri vremenska perioda trećeg, petog i sedmog dana od početka primjene DSS otopine. Prilikom žrtvovanja izolirano je debelo crijevo, izmjerena mi je dužina te masa. Nakon makroskopskog pregleda debelo crijevo je isjeckano na manje komadiće za patohistološku analizu i za određivanje izražaja gena. Uzorci za analizu gena pohranjeni su na  $-80^{\circ}\text{C}$ , a za patohistološku analizu uklopljeni u parafin.

#### 3.2 Procjena uspostave i intenziteta kolitisa

Tijekom pokusnog perioda opće stanje životinja pratilo se svakoga dana tijekom pokusnog perioda. Procjena općeg stanja učinila se temeljem nekoliko parametara: tjelesna masa, konzistencija stolice i pojava krvi u stolici (okultno krvarenje) te prisustva rektalnog krvarenja. Okultno krvarenje dokazano je primjenom Hemocult II SENSE testa (Beckman Coulter, USA). Svaki od navedenih parametara je bodovan prema prethodno opisanim kriterijima (26) te je ukupni zbroj bodova podijeljen s tri ( $\text{DAI}=(\text{konzistencija}$

stolice+krvarenje+gubitak tjelesne mase)/3). Na taj način dobiven je makroskopski indeks oštećenja odnosno indeks aktivnosti bolesti (*engl.* disease activity index, DAI).

### 3.3 Hematoksilin-eozin bojanje tkivnih preparata

Za hematoksilin-eozin (HE) bojanje parafinskih rezova koristio se standardni protokol. Hematoksilin kao boja služi za bojanje kiselih struktura u stanici odnosno kromatina i jezgre pri čemu ih boji u ljubičasto-plavo. Eozin kao druga komponenta ovog bojanja boji bazične strukture, citoplazmu u crveno. Neposredno prije samog bojanja tkivni preparati su deparafinirani te su u tu svrhu stakla uronjeni u otopine ksilola 3 puta po 8 minuta. Nakon deparafinizacije uslijedila je rehidracija, na način da se stakla uranjaju u otopine etanola s opadajućim koncentracijama (100 % (2x), 90 %, 70 % te 50 %) kroz 5 minuta. Nakon rehidracije slijedi ispiranje preparata u destiliranoj vodi kroz 1 min., a zatim bojanje s otopinom hematoksilina kroz 4 minute. Nakon prvog bojanja preparati se ispiru pod mlazom tekuće vode kroz 15 minuta te se diferenciraju u otopini HCl-etanola (100 ml 70 %-nog etanola i 0,5 ml HCl) kroz 2 sekunde i zatim opet slijedi ispiranje pod mlazom tekuće vode kroz 10 minuta te uranjanje u destiliranu vodu kroz 3 minute. Potom slijedi bojanje s eozinom u trajanju od 3 minute, a nakon toga uranjanje u destiliranu vodu 3 puta po 5 minuta. Nakon bojanja provodi se proces suprotan rehidraciji odnosno tkivni preparati se uranjaju u otopine etanola s rastućim koncentracijama (70 %, dva puta 96 % te dva puta 100 %) kroz 30 sekundi. Poslije dehidracije slijedi uranjanje u ksilol 3 puta po 5 minuta. Na kraju slijedi sušenje na sobnoj temperaturi.



### 3.4 Određivanje stupnja oštećenja sluznice debeloga crijeva

Na razini crijeva procjena uspostave i intenziteta kolitisa učinjena je temeljem patohistološke analize sluznice debelog crijeva i izračuna mikroskopskog indeksa oštećenja prema prethodno definiranim kriterijima (26). Potonji se izračunao bodovanjem: a) intenziteta upale (nema upale: 0, blaga: 1, srednja: 2, jaka: 3), b) stupnja infiltracije upalnih stanica (nema: 0, mukoza: 1, mukoza i submukoza: 2, transmularna infiltracija: 3, c) oštećenje epitela (nema: 0, oštećenje kriпти: 1, erozija: 2, ulceracija: 3), d) proširenost oštećenja (nema: 0, fokalno: 1, multi –fokalno: 2, difuzno: 3, e) pojave edema: nema: 0, blagi u mukozi: 1, mukoza i submukoza: 2, kroz cijelu stijenku: 3.

### 3.5 Procjena genskog izražaja ispitivanih molekula

#### 3.5.1 Izolacija ukupne RNA

Ukupna RNA izolirana je iz uzoraka debeloga crijeva upotrebom TRI Reagent® otopine prema uputama proizvođača. Prosječno 100-120 mg tkiva homogenizirano je u 10 puta većem volumenu TRI Reagent-a. Nakon inkubacije (5 minuta, sobna temperatura) provedena je homogenizacija, a nakon toga uslijedilo je centrifugiranje u trajanju od 30 minuta pri na 5000 x g i pri temperaturi od +4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant se premjesti u novu epruvetu i doda 200 µL kloroforma po mL TRI Reagent-a te ostavi inkubirati na sobnoj temperaturi kroz 5 minuta. Kao u prvom postupku uzorak se centrifugira, a nakon centrifugiranja razdvoje se 3 faze od kojih gornja bezbojna vodena faza sadržava RNA i ona se odvajala u novu epruvetu. Potom je slijedilo dodavanje 500 µL izopropanola po mL TRI

Reagent-a u svrhu taloženja RNA. Dobiveni bijeli talog ostaje u epruveti u na njega se dodaje 1 mL 75% etanola po 1 mL otopine TRI Reagent-a kako bi se uklonili ostaci soli i izopropanola. U tu svrhu uzorak se mora centrifugirati tijekom 5 minuta na 7500 x g. Postupak ispiranja taloga etanolom i susljedno centrifugiranje ponavlja se 2 puta te se nakon posljednjeg centrifugiranja talog odvaja i suši na zraku pri sobnoj temperaturi do nestanka bijele boje i pojave prozirnosti. Talog RNA potom je otapan u 100  $\mu$ L vode oslobođenoj nukleaza te je dio odmah upotrijebljen za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije i čistoće.

### 3.5.2 Spektrofotometrijsko ispitivanje čistoće, koncentracije i integriteta RNA

U svrhu određivanja zagađenja izolirane RNA proteinima i solima potrebno je izmjeriti ekstinkciju pripremljenog uzorka na 260 i 280 nm, te izračunati njihov omjer. U slučaju kada je omjer veći od 1,8 onda možemo zaključiti da imamo zadovoljavajuću čistoću izolirane RNA. U uzorcima kod kojih omjer nije bio zadovoljavajući provedeno je pročišćavanje s litijevim kloridom. Nadalje, omjer apsorbancija mjerenih pri 260 i 230 nm ( $A_{260/230}$ ) korišten je za procjenu onečišćenja solima i uzorci u kojima je iznosio  $<2,0$  također su isključeni iz daljnje analize. Omjer ( $260/280$ ) i koncentracija (ng/ $\mu$ l) izolirane RNA u uzorku izmjerena je na spektrofotometru BioSpec-nano (Shimadzu Biotech) nanošenjem 2  $\mu$ l uzorka izolirane ukupne RNA.

Nadalje, neophodno je i provjeriti cjelovitost RNA postupkom elektroforeze. U tu svrhu koristi se 0,9%-agarozni gel koji se dobije na način da se 0,9 g agaroze otopi u 100 mL 1x TBE pufera. Kako bi se agarozna u potpunosti otopila suspenzija agaroze zagrijala se u mikrovalnoj pećnici do vrenja, a potom hladila pod mlazom hladne vode uz lagano miješanje. Ohlađena otopina

agaroze se ulila u pripremljenu kadicu za polimeriziranje gela, umetnut je češljic kako bi se u gelu formirale jažice, proces stvaranja gela trajao je oko 40 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorak RNA za elektroforezu pripremljen je tako da se 3 µg RNA pomiješa s 20 µl pufera za uzorke u kojem se nalazi etidij-bromid, zagrije u vodenoj kupelji na 68°C kroz 15 min., a zatim se uzorak mora naglo ohladiti držanjem u ledu tijekom 5 minuta. Nakon što gel pređe u kruti oblik izvade se češljici, a gel se premjesti u kadicu za elektroforezu. Gel se prekrije 1 x TBE puferom, a mora biti u potpunosti prekriven. Neposredno prije nanošenja uzoraka u jažicu, prethodno pripremljenom uzorku RNA dodaje se pufer za nanošenje uzoraka na gel. Elektroforeza se provela pri konstantnom naponu od 80V tijekom 60 minuta. Elektroforezom se RNA razdvojila na 28S i 16S ribosomsku RNA u omjeru 2:1, a dobiveni rezultat se vizualizirao uz pomoć UV transiluminatora i sve dokumentira fotografiranjem (Image Master, Amersham Pharmacia Biotech).

### 3.5.3 Sinteza komplementarne DNA

Komercijalno dostupni set za reverznu transkripciju (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems) koristio se za sintezu komplementarne DNA (cDNA), Reakcijska smjesa je pripremljena prema uputama proizvođača, a sadržavala je 0,4 µg ukupne RNA u volumenu od 10 µl te dodanu mješavinu od: 2 µl pufera za reverznu transkripciju, 0,8 µl mješavine dNTP (100 mM), 2 µl smjese nasumičnih početnica, 1 µl Multi Scribe RT (reverzna transkriptaza; 50 U/µl), 1 µl inhibitora RNAza te 3,2 µl H<sub>2</sub>O bez nukleaza. Sama reakcija sinteze cDNA provedena je prema uputama proizvođača u uređaju 7300 RT-PCR System /Applied Biosystems. Uvjeti reverzne transkripcije navedeni su u tablici 1.

Tablica 1. Uvjeti reakcije reverzne transkripcije

	Sparivanje početnica	Produljenje lanca	Inaktivacija enzima RT	Hlađenje
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Vrijeme (min)	10	120	5	∞

#### 3.5.4 Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR)

U uzorcima debelog crijeva miševa uključenih u ispitivanje izražaj odabranih gena u transkriptima mRNA određena je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR, prema *engl. real-time polymerase chain reaction*). Referentni slijed ciljnih gena preuzeti su iz NCBI (*engl. National Center for Biotechnology Information*) baze podataka. Primer-BLAST online softver korišten je za dizajn početnica. Za normalizaciju uzorka kao referentni gen koristio se kućepaziteljski gen,  $\beta$ -aktin te RPLP. Prije uporabe početnice su otopljene u deioniziranoj vodi, na način da ishodna otopina ima koncentraciju 100  $\mu$ M. Dobivena ishodna otopina se čuva na -20°C. Kao radna otopina iskoristila se smjesa obje početnice (10xPM), u kojoj je koncentracija pojedine početnice 2  $\mu$ M.

Reakcijska smjesa je sadržavala 5  $\mu$ l pripremljene cDNA koncentracije 20 ng/ $\mu$ L, 12.5 $\mu$ l reagensa Power SYBR® Green PCR MasterMixa i 2  $\mu$ l odgovarajućih početnica (uzvodne i nizvodne) i 3.5  $\mu$ L vode oslobođene od nukleaza što je ukupno 25  $\mu$ l. Svaka reakcija učinjena je

u duplikatu, aparatu Real-Time PCR System 7300 (Applied Biosystems). Analiza dobivenih rezultata provedena je u programu 7300 System Software (Applied Biosystems). Komparativna Ct metoda, gdje Ct (engl. threshold cycle) označava ciklus pri kojemu količina umnoženog PCR produkta dosegne određeni prag koristila se za određivanje relativne ekspresije mRNA. Izražaj ciljnih gena na transkripcijskoj razini izražena je kao razlika ciljnog i referentnog gena ( $\Delta^{Ct}$  vrijednost). Transkripcijska aktivnost izražena je kao relativna ekspresija (engl. fold change) u odnosu na kontrolni uzorak prema formuli  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  gdje je  $\Delta\Delta Ct$  razlika između  $\Delta^{Ct}$  vrijednosti promatranog i kontrolnog uzorka.

### **3.6 Etički aspekt istraživanja na eksperimentalnim životinjama**

Istraživanja provedena na pokusnim životinjama provedena su uz poštivanje važećih Zakonskih propisa (NN19/99), te Pravilnika (NN176/04), uz poštivanje temeljnih etičkih i znanstvenih principa o provođenju pokusa na životinjama, a sve u skladu s načelima 3R (1. nadomještanje životinja – engl. Replacement, 2. smanjenje broja životinja – engl. Reduction i 3. oplemenjivanje postupaka prema životinjama – engl. Refinement). Predloženo istraživanje dio je istraživanja koje se provodi u sklopu znanstvenoistraživačkog projekta te je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

### 3.7 Statistička obrada podataka

Koristeći program Microsoft Excell brojčani rezultati su pohranjeni u bazu podataka. Statistička obrada podataka učinjena je korištenjem programskog paketa STATISTICA 10 (Stat Soft Inc.; Tulsa, OK 74104, SAD). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD) za pojedinu grupu. Postojanje statistički značajne razlike između ispitivanih grupa testirane su Student t testom ili neparametrijskim Mann-Whitney U testom. Razina od  $p < 0,05$  smatrala se statistički značajnom. Rezultati su prikazani grafički i tabelarno.

## 4 REZULTATI

### 4.1 Sistemske, kliničke promjene tijekom razvoja kolitisa

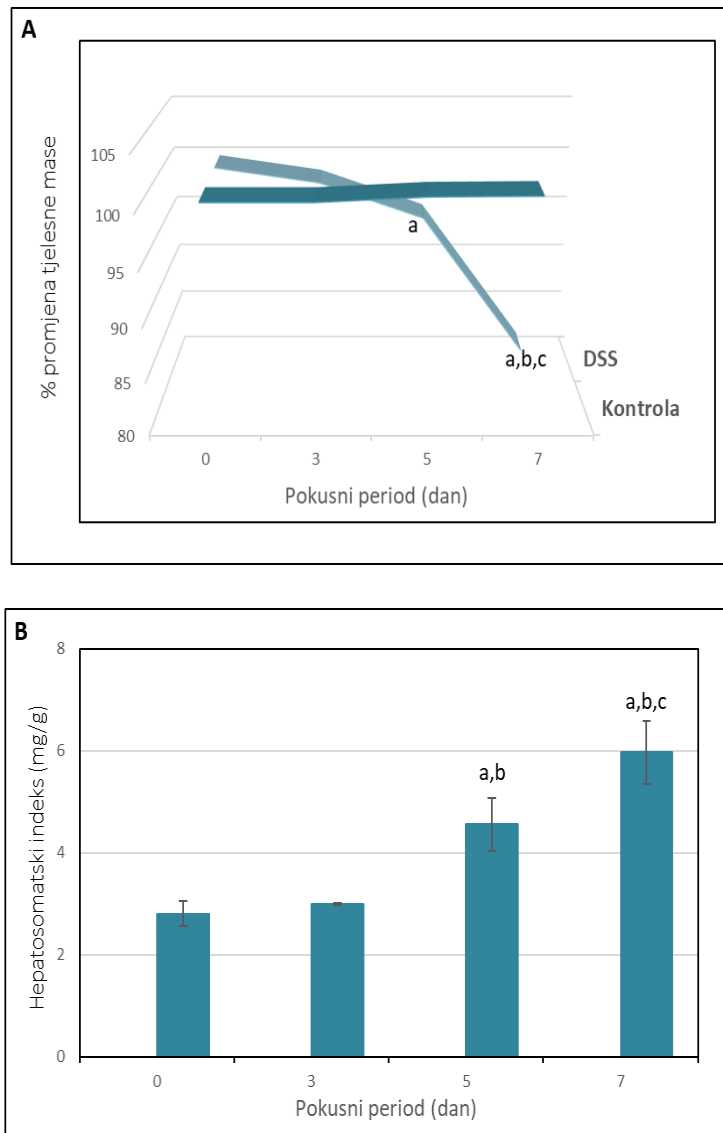
Tijekom eksperimentalnog perioda procjena općeg stanja životinja uključenih u ispitivanje provodio se svakog dana. Iako su se životinje pratile svakog dana za prikaz rezultata kliničkih promjena izdvojene su ključne točke odnosno treći, peti i sedmi dan pokusnog perioda. Oralna primjena 3% DSS otopine tijekom 7 dana rezultirala je pojavom kliničkih simptoma, makroskopskih i mikroskopskih promjena kao rezultat razvoja i progresije upale odnosno bolesti. Napredovanjem bolesti zabilježen je gubitak tjelesne mase. Iz rezultata je vidljivo da gubitak tjelesne mase započinje trećeg dana, nastavlja se petog dana, a najizraženiji je sedmog dana pokusnog perioda. U odnosu na kontrolnu skupinu gubitak tjelesne mase sedmog dana je statistički značajan ( $p < 0,05$ ).

Hepatosomatski indeks odnosno omjer mase slezene i tjelesne mase miša na dan žrtvovanja izračunat je za sve pokusne periode i izražen kao mg/g (slika 7B). Tijekom kolitisa utvrđene su značajne promjene indeksa. Razvojem kolitisa hepatosomatski indeks se postepeno povećava budući da s jedne strane dolazi do povećanja mase slezene, a s druge strane do pada tjelesne mase miševa.

Uz gubitak tjelesne mase tijekom razvoja kolitisa uočena je i promjena konzistencije stolice. U razdoblju do trećeg dana pokusnog perioda promjene u konzistenciji stolice nisu zabilježene. Mekana stolica pojavljuje se četvrtog i /ili petog dana pokusnog perioda, a proljev nakon tog perioda. Također, zabilježena je i pojava krvi u stolici koja započinje kao okultno krvarenje, a završava s rektalnim, jako izraženim krvarenjem. U određenog broja miševa zamjećen je i prolaps rektuma kao posljedice krvarenje. Kako je u poglavlju materijali i

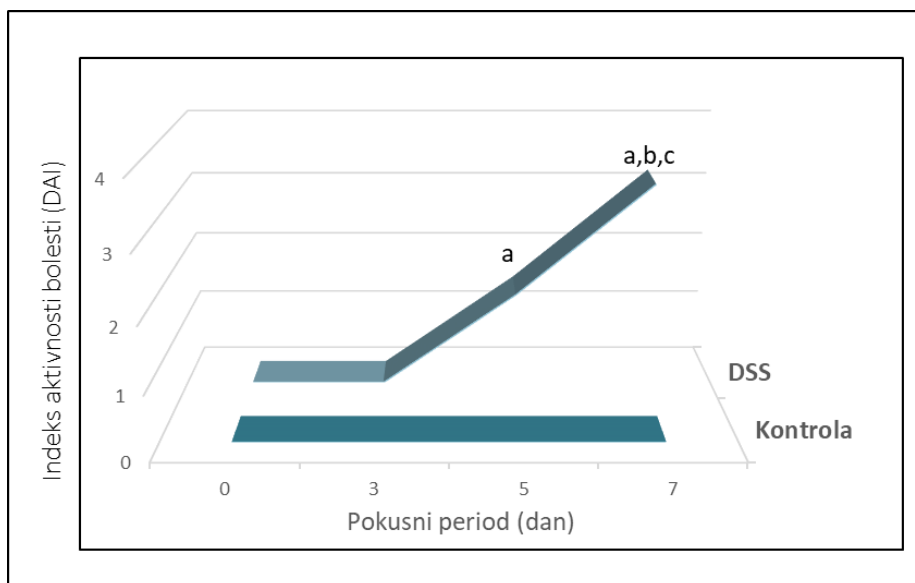
metode opisano, klinički parametri odnosno tjelesna masa, promjene konzistencija stolice i pojava krvarenja koristili su se za procjenu intenziteta bolesti odnosno za izračun makroskopskog indeksa bolesti poznatijeg kao indeks aktivnosti bolesti (*engl.* disease activity index, DAI). Promjene na kliničkoj razini odražavaju makroskopski indeks. Razvidno je da se indeks aktivnosti bolesti povećava pogoršanjem upalnog procesa odnosno intenzitetom kliničkih simptoma. Iz slike 7 može se iščitati da je DAI statistički značajno veći sedmog dana pokusnog perioda kako u odnosu na kontrolnu skupinu tako i u odnosu na treći i peti dan pokusnog perioda.





**Slika 7. Sistemske promjene tijekom razvoja kolitisa**

A) Promjena tjelesne mase izražena kao prosječni postotak početne tjelesne mase  $\pm$  standardno odstupanje (SD). B) Indeks aktivnosti bolesti izračunat prema opisu navedenim u materijalima i metodama. B) Hepatosomatski indeks predstavlja omjer mase slezene i tjelesne mase miševa izražen u mg/g. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  u usporedbi u odnosu na kontrolnu skupinu; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  u odnosu na DSS skupinu miševa trćeg dana pokusnog perioda; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  u odnosu na DSS skupinu miševa petog dana pokusnog perioda. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD izuzev promjene tjelesne mase.  $n = 6$  miševa/skupina. Kratice: DSS, natrijev dekstran sulfat;



**Slika 8. Indeks aktivnosti bolesti**

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  u usporedbi u odnosu na kontrolnu skupinu; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  u odnosu na DSS skupinu miševa trćeg dana pokusnog perioda; <sup>c</sup>  $p < 0,05$  u odnosu na DSS skupinu miševa petog dana pokusnog perioda. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD izuzev promjene tjelesne mase.  $n = 6$  miševa/skupina.

#### 4.2 Lokalne promjene tijekom razvoja kolitisa

Nakon žrtvovanja pokusnim životinjama pregledano je debelo crijevo te su se zabilježile lokalne, makroskopske i mikroskopske promjene.

#### 4.3 Makroskopske promjene debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa

Prilikom žrtvovanja, svakoj se pokusnoj životinji izdvojio dio debeloga crijeva od cekuma do anusa te mu je pritom izmjerena i dužina, a rezultati su prikazani u tablici 2 te na slici 9. Iz tablice 2 mogu se iščitati promjene dužine debelog crijeva tijekom pokusnog perioda. U kontrolnoj skupini promjene u dužini debelog crijeva nisu uočene dok tijekom razvoja DSS kolitisa crijevo se skraćuje proporcionalno s dužinom pokusnog perioda. U skladu s navedenim skraćenje debelog crijeva sedmog dana pokusnog perioda značajno je u odnosu na kontrolnu skupinu, petog i trećeg dana tijekom razvoja kolitisa. U skladu s tablicom 2 na slici 9 također što možemo vidjeti promjene dužine crijeva. Osim toga kroz stijenku crijeva možemo vidjeti sadržaj crijeva (fekalni peleti) koji je u slučaju kontrolne slupine, te trećeg dana pokusnog perioda zeleno-smeđe boje što je i fiziološka boja fecesa. U slučaju petog i sedmog dana pokusnog perioda vidljivo je da je feces koji se nalazi u debelom crijevu tamno-crvene boje što upućuje odnosno potvrđuje prisutno krvarenje. U određenog broja životinja zabilježeno je oticanje i zadebljanje stijenke debelog crijeva kao rezultat razvoja upale.

Tablica 2. Promjene dužine debelog crijeva tijekom razvoja DSS kolitisa

Pokusni period (dan)	0	3	5	7
Kontrola	8,28 ± 0,22	8,28 ± 0,22	8,28 ± 0,22	8,30 ± 0,15
DSS	8,28 ± 0,22	8,10 ± 0,56	6,70 ± 0,16 <sup>a,b</sup>	5.40 ± 0,17 <sup>a,b,c</sup>

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. <sup>a</sup> p < 0,05 u usporedbi u odnosu na kontrolnu skupinu; <sup>b</sup> p < 0,05 u odnosu na DSS skupinu miševa trećeg dana pokusnog perioda; <sup>c</sup> p < 0,05 u odnosu na DSS skupinu miševa petog dana pokusnog perioda. n = 6 miševa/skupina. Kratice: DSS, natrijev dekstran sulfat.



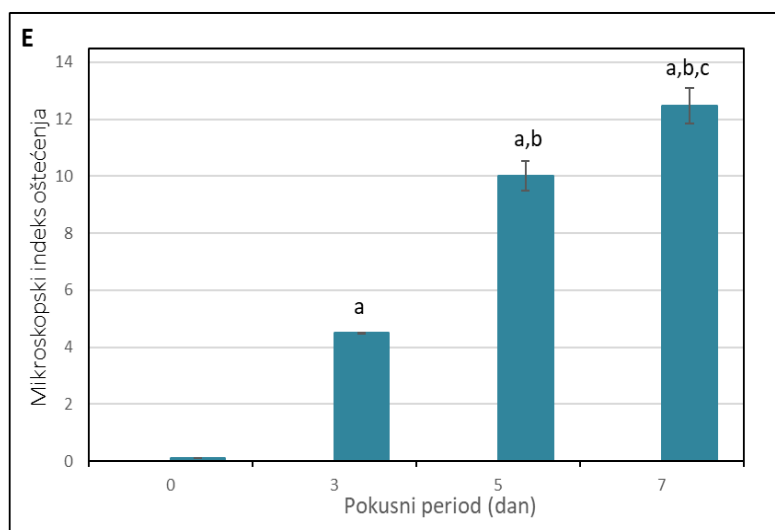
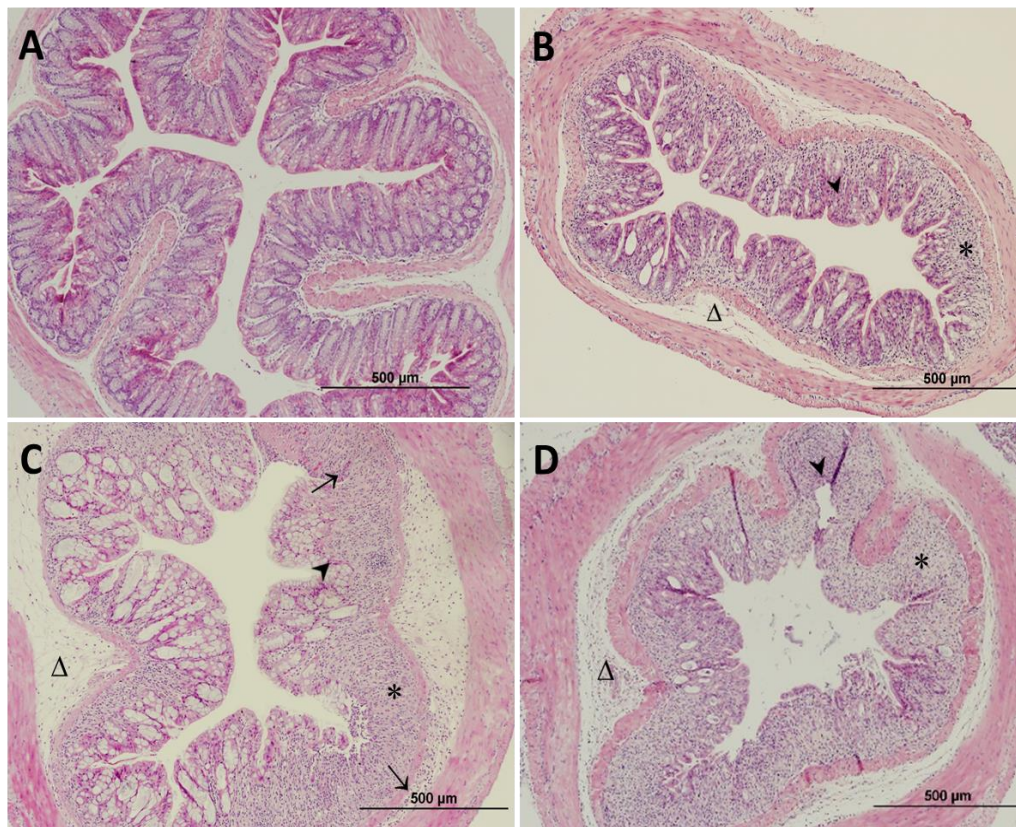
Slika 9. Makroskopske promjene i duljina debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa

n = 6 miševa /skupina. Kratice: DSS, natrijev dekstran sulfat.

#### 4.4 Mikroskopske promjene debelog crijeva tijekom razvoja DSS kolitisa

Na slici 10. prikazani su HE preparati ispitivanih skupina miševa. U skupinama kod kojih je primjenjena otopina DSS može se uočiti smanjenje širine kripta s fokalnim područjima u kojima je prisutan edema i infiltracija upalnih stanica, pretežito polimorfonuklearnih i mononuklearnih, u vezivnom tkivu lamine proprie i submukozi. Isto tako, proboj stanica u mukozu lamine muscularis uglavnom se može vidjeti kao i žarišna područja transmuralne raspodjele stanica.

U skladu s makroskopskim i kliničkim promjenama zabilježene su i promjene na mikroskopskoj razini. Na temelju histopatološke analize vidljivo je mikroskopsko oštećenje sluznice već trećag dana pokusnog perioda. Nekrotična sluznica obilno prožeta upalnim stanicama, posebice neutrofilnim granulocitima, kao i raspadnutim leukocitima, uz žarišna krvarenja i nastanak nekrotičnog detritusa.

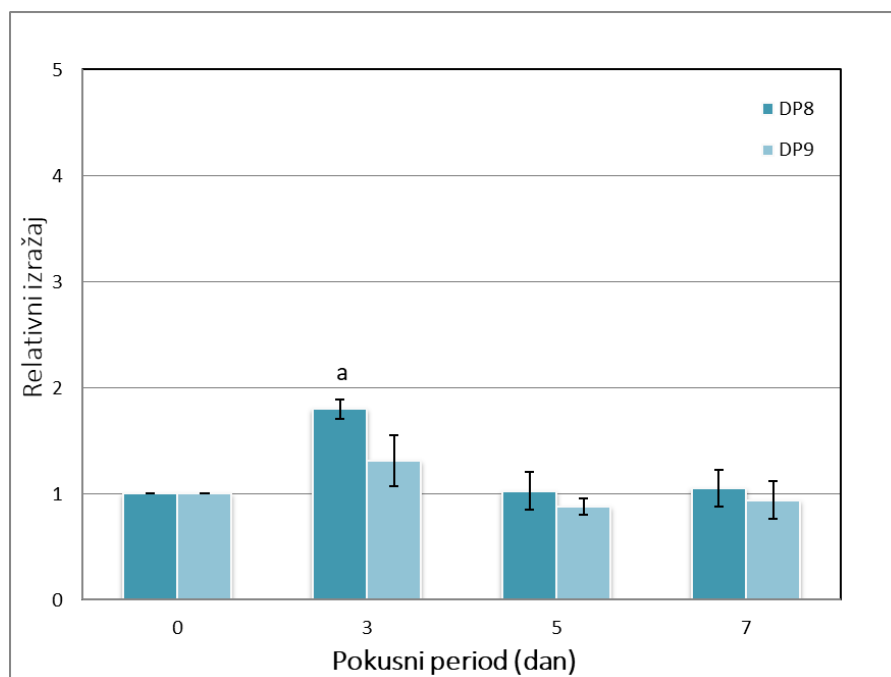


Slika 10. Mikroskopske promjene sluznice debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  u usporedbi u odnosu na kontrolnu skupinu; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  u odnosu na DSS skupinu miševa trćeg dana pokusnog perioda; <sup>c</sup>  $p < 0,05$  u odnosu na DSS skupinu miševa petog dana pokusnog perioda.  $n = 6$  miševa /skupina. Kratice: DSS, natrijev dekstran sulfat.

#### 4.5 Promjene genskog izražaja DP8 i 9 u debelom crijevu tijekom razvoja kolitisa

Relativan izražaj gena određen je metodom qPCR u homogenatima debeloga crijeva svih pokusnih skupina u odabranim vremenskim točkama. Temeljem slike 11. vidljivo je da aplikacija DSS otopine uzrokuje značajan porast transkripcijske aktivnosti DP8 gena trećeg dana pokusnog perioda. Nadalje, razvojem upale aktivnost se približava vrijednostima koje nalazimo u kontrolnoj skupini. Vrlo sličan obrazac ponašanja pokazan je i kod DP9 gena, ali za razliku od DP8 porast u trećem danu kolitisa nije statistički značajan. Relativan izražaj DP9 neznatno je smanjen u odnosu na kontrolnu skupinu petog dana pokusnog perioda.

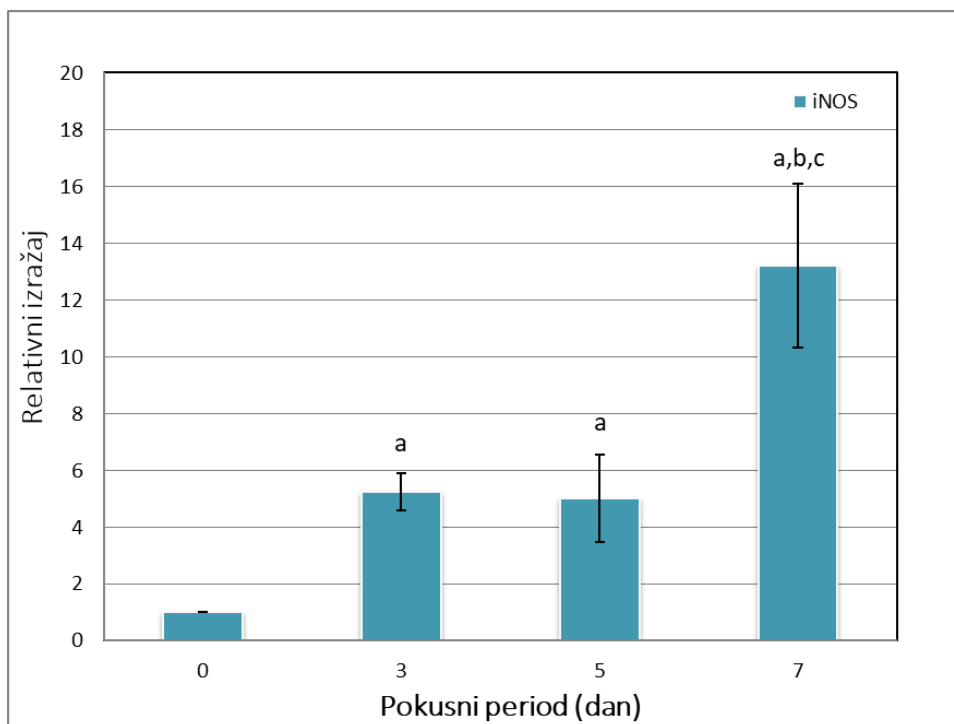


Slika 11. Usporedba genskog izražaja DP8 i 9 u debelom crijevu tijekom razvoja kolitisa

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  u usporedbi u odnosu na kontrolnu skupinu; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  u odnosu na DSS skupinu miševa trećeg dana pokusnog perioda; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  u odnosu na DSS skupinu miševa petog dana pokusnog perioda.  $n = 6$  miševa /skupina.

#### 4.6 Promjene izražaja iNOs gena u debelom crijevu tijekom razvoja kolitisa

Promjene izražaja iNOS gena određen je uzorcima debeloga crijeva miševa uz prethodno navedenu metodu, a prikazana je na slici 12. Razvidno je da transkripcijska aktivnost gena raste razvojem upalnog procesa. Promjene u vremenskim intervalima su značajne, a porast transkripcijske aktivnosti najveći je sedmog dana pokusnog perioda kada je i upalni proces najintenzivniji. Potrebno je istaknuti da je izražaj sedmog dana gotovo dva i pol puta veći od izražaja utvrđenog trećeg odnosno petog dana pokusnog perioda.



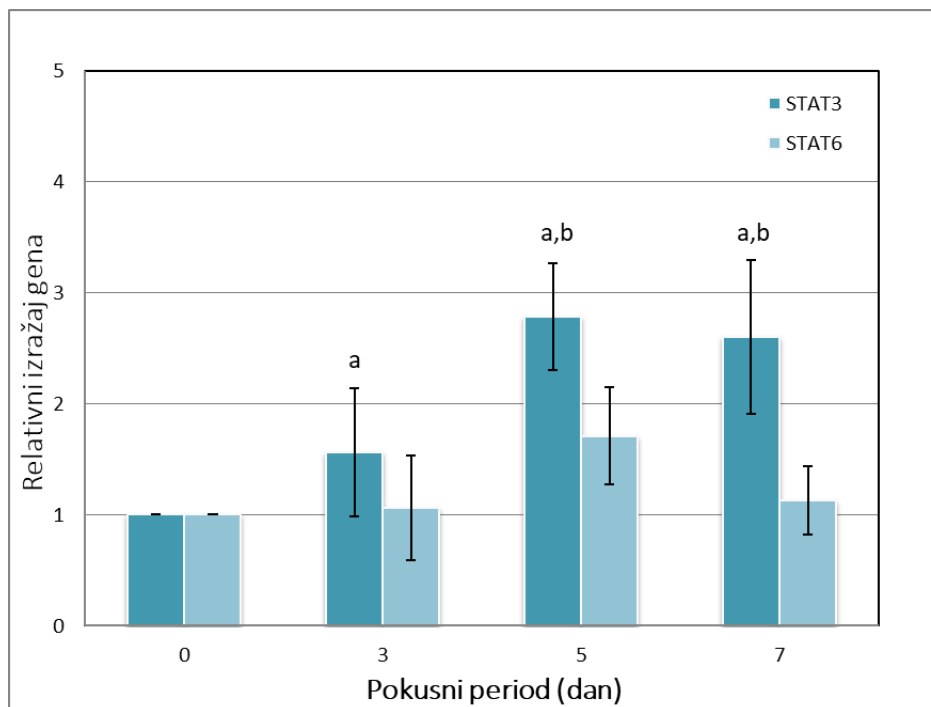
Slika 12. Promjena izražaja iNOS gena na uzorcima debelog crijeva

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  u usporedbi u odnosu na kontrolnu skupinu; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  u odnosu na DSS skupinu miševa trćeg dana pokusnog perioda; <sup>c</sup>  $p < 0,05$  u odnosu na DSS skupinu miševa petog dana pokusnog perioda.  $n = 6$  miševa/skupina.



#### 4.7 Promjene izražaja gena transkripcijski čimbenika u debelom crijevu tijekom razvoja kolitisa

Promjena transkripcijske aktivnosti STAT3 i 6 gena prikazana je na slici 13. Trećeg dana pokusnog perioda zabilježen je značajan porast transkripcijske aktivnosti STAT3 gena dok je aktivnost STAT6 gena na razini kontrolne skupine. Daljnjim napredovanjem upale raste transkripcijska aktivnost STAT3, a vrijednosti prisutne petog dana pokusnog perioda su gotovo identične vrijednostima sedmog dana. Značajan porast transkripcijske aktivnosti STAT6 gena prisutan je petog dana pokusnog perioda, a sedmog dana se vrijednosti vraćaju na razinu vrijednosti prisutnih kod kontrolne skupine.



Slika 13. Usporedba izražaja STAT3 i 6 gena u debelom crijevu tijekom razvoja kolitisa

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  u usporedbi u odnosu na kontrolnu skupinu; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  u odnosu na DSS skupinu miševa trćeg dana pokusnog perioda.

## 5 RASPRAVA

UBC predstavljaju važan javnozdravstveni problem. Kao što je prethodno naglašeno etiopatogeneza UBC pa tako i UK vrlo je kompleksna i nedovoljno razjašnjena, a s obzirom da je incidencija ovih bolesti u porastu istraživanja su intenzivna i uvijek zanimljiva znanstvenoj zajednici. Istraživanja na animalnim modelima bolesti dala su značajan doprinos u razumijevanju mehanizama koji sudjeluju u razvoju ovih bolesti.

Cilj istraživanja bio je ispitati promjenu transkripcijske aktivnosti proteaza i transkripcijskih čimbenika tijekom razvoja DSS kolitisa. U pokusnom periodu od sedam dana utvrđenu su promjene kako na sistemskoj tako i na lokalnoj razini koje su sukladne simptomima humanog oblika UBC odnosno UK. Temeljem pojavnosti simptoma bolesti može se potvrditi da se DSS model kolitisa u potpunosti razvio. DSS je potaknuo oštećenje sluznice crijeva što je dovelo da razvoja upalnog procesa koja se očitovala kroz kliničke, histološke, imunološke promjene. Nadalje, rezultati potvrđuju prethodno pokazanu dinamiku razvoja eksperimentalnog modela DSS kolitisa koja se sastoji od triju razdoblja. Prva odnosno prvih šest dana pokusnog perioda ulaze u razdoblje razvoja kolitis. Drugo razdoblje čini akutnu fazu koja prema literaturnim podacima, a i našim rezultatima započinje sedmog dana pokusnog perioda i nastavlja se još 2-3 dana tijekom pokusnog razdoblja. U akutnoj fazi sistemski (gubitak tjelesne mase, proljev, krvarenje) i lokalni (dužina crijeva, mikroskopski indeks oštećenja) simptomi su najizraženiji. Treće razdoblje, koje u našem slučaju nije proučavano, započinje oko 10-tog dana pokusnog perioda, a završava između 15. i 20. dana ovisno o stupnju oštećenja sluznice debelog crijeva. Tijekom posljednjeg razdoblja uspostavljaju se fiziološki uvjeti (34).

Do unazad desetak godina uloga proteaza se isključivo povezivala s razgradnjom proteina u gastrointestinalnom sustavu. Međutim, novija istraživanja pripisuju ovim enzimima nove uloge poput antimikrobne i imunomodulacijske te se sve više istražuje njihova povezanost s bolestima. Proteaze mijenjaju upalni proces kroz više različitih mehanizama koji uključuju smanjenje oticanja mukozne membrane i kapilarne permeabilnosti te razaranje zaliha fibrina u krvnim ugrušcima i mikrotrombima. Također, na mjestu ozljede sudjeluju u razgradnji proteina plazme i staničnog otpada na manje dijelove što olakšava njihov prolaz kroz limfatični sustav rezultirajući bržim uklanjanjem otekline i nestankom boli. Budući da je u ranoj fazi razvoja kolitisa pokazan porast transkripcijske aktivnosti kako DP8 tako i DP9. Temeljem navedenog možemo zaključiti da ove proteaze mogu imati ulogu u razvoju kolitisa, posebice u ranoj fazi. U akutnoj fazi, kada su i simptomi bolesti najjače izraženi transkripcijska aktivnost ovih enzima se približava vrijednostima koje su određene u zdravih životinja što upućuje da ovi enzimi nemaju ključnu ulogu u akutnom upalnom procesu. Pokazana veća razina mRNA DP8 u odnosu na DP9 u debelome crijevu u skladu je s rezultatima prethodnog istraživanja gdje je isti trend pokazan u sluznici distalnog kolona Balb/c miševa (35). Promjena izražaja DP8 i 9 ključna je za preživljavanje i proliferaciju različitih tipova stanica uključujući imunološke stanice koje sudjeluju u razvoju upalnog procesa.

Tijekom razvoja kolitisa transkripcijska aktivnost STAT3 i 6 molekule značajno raste uz naglasak da je porast STAT3 značajniji. Ovi rezultati su u skladu s prethodno objavljenim istraživanjima. Pretpostavljamo da je pokazana promjene izražaja STAT3 mRNA rezultat IL-6 posredovane aktivacije STAT3 kojom se potiče proliferacija i preživljavanje T i B stanica te diferencijacija naivnih CD4+ stanica u Th17 stanice i ograničavanje stvaranja Treg stanica (36). Međutim, osim pokazanog proupalnog djelovanja smatra se i da aktivacija STAT3

transkripcijskog čimbenikaima važnu ulogu i u regeneraciji oštećenog tkiva. Na taj način se može objasniti značajan porast STAT3 u akutnoj fazi kolitisa. Nadalje, pokazan je porast transkripcijske aktivnosti iNOS tijekom razvoja kolitisa. Dobiveni rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima na animalnim modelima, staničnim kulturama i humanim oblicima UBC. Nadalje, prethodno je pokazano da inhibicija iNOS aktivnosti značajno smanjuje intenzitet kolitisa te bi se moglo zaključiti da iNOS ima proupalnu ulogu te potiče aktivaciju citokina i nakupljanje neutrofila na mjestu upale. Također, pokazano je da u razdoblju regeneracije oštećene sluznice debelog crijeva proizvodnja NO odnosno aktivacija iNOS enzima ima protetktivni učinak (37). Pretpostavlja se da glavnu ulogu u aktivaciji iNOS proteina ima interferon  $\gamma$ , a da se aktivacija iNOS-a povećava uz dodatno djelovanje IL-6. S druge strane, pokazano je da inhibicija IL-6 također pogoršava kolitis. Obzirom na prethodnu pokazano povećanje transkripcijske aktivnost STAT3 i navedena saznanja možemo zaključiti da u razvoju kolitisa važnu ulogu ima spona IL6/STAT3/iNOS. Također, pretpostavlja se da uloga iNOS ovisi o uvjetima mikrookoliša u kojima je on aktiviran te o koncentraciji koju nalazimo na mjestu upalnog procesa te su stoga daljna istraživanja neophodna.

## 6 ZAKLJUČAK

1. Primjenom DSS otopine dolazi do razvoja kliničke manifestacije bolesti, smanjenja tjelesne mase, promjene u masi slezene te duljini debeloga crijeva. Promjene su najizraženije 7. dana pokusnog perioda.
2. Obzirom da je zabilježen porast transkripcijske aktivnosti proteaza DP8 i 9 trećeg dana pokusnog perioda može se pretpostaviti da imaju ulogu u razvoju kolitisa
3. Promjena transkripcijske aktivnosti iNOS gena je u korelaciji s intenzitetom upalnog procesa što upućuje na njezinu ulogu kako u razvoju i napredovanju kolitisa.
4. Razvoj upale utječe na izražaj STAT3, ali ne i na STAT6 gena u debelom crijevu.

## 7 LITERATURA

1. Vucelić B., Čuković Čavka S. Upalne bolesti crijeva. *Medicus*. 2006;15: 53-62.
2. Vucelić B., Čuković Čavka S., Banić M., Bilić A. i sur. Hrvatski konsenzus o liječenju upalnih bolesti crijeva biološkom terapijom. *Acta Med Croatica* 2013; 67: 75-87.
3. Vuković D. Zdrastvena njega bolesnika oboljelih od ulceroznog kolitisa. Završni rad, 2016.
4. Dignass A., Eliakim R., Magro F. et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis Part1: Definitions and diagnosis. *J Crohn s Colitis* 2012; 965-990.
5. Vragović J. Upalne bolesti crijeva. Završni rad, 2015.
6. Franović B. Utjecaj klorogenične kiseline na izražaj NF-Kb u akutnom kolitisu. Završni rad, 2018.
7. Mrsić F., Anić B. Enteropatihic Spondyloarthritis, 2018
8. Gorell MD. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clin SCI ( Lond.)*. 2005; 108(4): 277-92.
9. Olsen C., Wagtmann N. Identification and characterization of human DP9, a novel homologue of dipeptidyl peptidase IV. *An international journal on genes and genomes* 2002; 299: 185-193.
10. Smith R. The evolution od proteinase substrates with special reference to dipeptidyl peptidase IV. *The Histrochemical Journal* 1992; 24: 637-47.

11. Zapletal E. Dipeptidyl peptidase 9 u mišjim stanicama makrofagnog limfocita i limfocitnog porijekla. Doktorska disertacija, 2014.
12. Ross B., Krapp S., Augustin M. et al. Structures and mechanism of dipeptidyl peptidase 8 and 9, important players in cellular homeostasis and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(7): 1437-45.
13. Zhang H., Chen Y., Keane FM., Gorrell MD. Advance in understanding the expression and function of dipeptidyl peptidase 8 and 9. *Molecular Cancer Research* 2013;11(12): 1487-96.
14. Wilson CH., Indarto D., Dancet A., D.Pogson L. et al. Identifying natural substrates for dipeptidyl peptidases 8 and 9 using terminal amine isotopic labeling of substrates (TAILS) reveals in vivo rules in cellular homeostasis and energy metabolism. *Journal of Biological Chemistry*; 2013;288(20): 13936-49.
15. Waumans Y., Vliegen G., Maes L., et al. Dipeptidyl peptidase 4, 8 and 9 in mouse monocytes and macrophages DP8/9 inhibition attenuates M1 macrophage activation in mice. *Inflammation*. 2016;39(1): 413-24.
16. Lee HJ. Substituted pyrrolidine 2 i 4 - dicarboxylic acid amides as potent dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Bioorganic and medicinal chemistry letters* 2006;16(12): 3268-72.
17. Ajami K. Dipeptidyl peptidase 9 has two forms a broad tissue distribution, cytoplasmic localization, and DPIV-like peptidase activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene structure and Expression*. 2004;1679(1): 18-28.

18. Abbott CA., Yu DM., Woollatt E., Sutherland GR., McCaughan GW., Gorrell MD. Cloning expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DP) IV homolog DP8. *Eur. J. Biochem*; 2000;267(20): 6140-50.
19. Tang HK. Biochemical properties and expression profile of human prolyl dipeptidase DP9. *Archives of biochemistry and biophysics* 2009
20. Dubois V., Lambeir AM., Vandamme S. Et al. Dipeptidyl peptidase (DP9) from bovine testes: Identification and characterization as the short form by mass spectrometry. *Biochimica et biophysica acta*; 2010;1804(4):781-88.
21. R.Bjelke J., Christensen J., F.Nielsen et al. Dipeptidyl peptidase 8 and 9 specificity and molecular characterization compared with dipeptidyl peptidase IV. *Biochemical Journal* 2006;396(2): 391-99.
22. Pilla E., Moller M., Saver G. et al. A novel SUMO1-specific interaction motif in dipeptidyl peptidase 9 (DP9) that is important for enzyme regulation. *Biochemical Journal*. 2012; 287: 44320-9.
23. M. Kasembeli M., Bharadwaj U., Robinson P., J. Tweardy D. Contribution of STAT3 to inflammatory and fibrotic diseases and prospects for its targeting for treatment. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(8): 2299.
24. Czimmerer Z., Daniel B., Horvath A. et al. The transcription factor STAT6 mediates direct repression of inflammatory enhancers and limits activation of alternatively polarized macrophages. *Immunity*. 2018;48(1): 75-90.



25. Kobak L. Molekularna dijagnostika infekcije virusom humane imunodeficijencije tipa I. Diplomski rad, 2009.
26. Vučenović I. Uvođenje mutacije u gen SCW4 iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pomoću PCR metode. Završni rad, 2016.
27. Grahovac B. Molekularno-biološke metode u patologiji, 2009
28. Debanth B., Xu S iNemati N. Small molecule inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein. Journal od Medicinal Chemistry. 2012;55:6645-68.
29. Smith. The evolution od proteinase substrates with special reference to dipeptidyl peptidase IV. The Histrochemical Journal. 1992; 24: 637-47.
30. Jonstor A., Grandis R. J. STAT3 signaling anticancer strategies and challengen. Mole. Interv. 2011;11 (1): 18-26
31. Xiong A., Yang Z., Shen Y., Zhau J. Transcription factor STAT3 as a novel molecular target for cancer. Cancers. 2014; 6: 926-57
32. Haftchenary S., Avadisan M., T. Guuning P. Inhibiting aberrant STAT3 function with molecular therepatutics a progress report. Anticancer Drugs. 2011;22(2):115-127.
33. Lirk, P., Hoffmann, G. i Rieder, J. Inducible Nitric Oxide Synthase - Time for reappraisal. Current drug target -inflammation & allergy. 2002; 1(1), 89–108.
34. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. The New England journal of medicine. 2009;361(21):2066-78.

35. Fujiwara, K. i sur. Combined treatment with dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) inhibitor sitagliptin and elemental diets reduced indomethacin-induced intestinal injury in rats via the increase of mucosal glucagon-like peptide-2 concentration. *J Clin Biochem Nutr.* 2015;56(2):155-62.
36. Roca Suarez AA, Van Renne N, Baumert TF, Lupberger J. Viral manipulation of STAT3: Evade, exploit, and injure. *PLoS Pathog.* 2018;14(3):e1006839
37. Cross RK, Wilson KT. Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2003;9(3):179-89.

## 8 PRILOZI

### 8.1 Prilozi slike

**Slika 1.** Prikaz lokalizacije upalnih promjena sluznice gastrointestinalnog trakta u ulceroznom kolitisu

**Slika 2.** Prikaz promjenjene sluznice u ulceroznom kolitisu

**Slika 3.** Endoskopski prikaz zdrave i upaljene sluznice debelog crijeva

**Slika 4.** Usporedba dimera DP8 i 9 enzima sa strukturom DP4

**Slika 5.** Prikaz PCR metode

**Slika 6.** Strukturne formule SYBER Greena i etidi-bromida

**Slika 7.** Sistemske promjene tijekom razvoja kolitisa

**Slika 8.** Indeks aktivnosti bolesti

**Slika 9.** Makroskopske promjene i duljina debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa

**Slika 10.** Mikroskopske promjene sluznice debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa

**Slika 11.** Usporedba genskog izražaja DP8 i 9 u debelom crijevu tijekom razvoja kolitisa

**Slika 12.** Promjena izražaja iNOS gena na uzorcima debelog crijeva

**Slika 13.** Usporedba izražaja STAT3 i 6 gena u debelom crijevu tijekom razvoja kolitisa

### 8.2 Pilozi tablica

**Tablica 1.** Uvjeti reakcije reverzne transkripcije

**Tablica 2.** Promjene dužine debelog crijeva tijekom razvoja DSS kolitisa

## 9 ŽIVOTOPIS

### OSOBNJE INFORMACIJE

Franović Barbara

📍 Ferenci 11b, 51216 Viškovo (Hrvatska)

📞 0981384497

✉ franovic.barbara@gmail.com

### OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

- 01/10/2018–danas    Diplomski sveučilišni studij Sanitarnog inženjerstva  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)
- 06/10/2014–17/07/2018    Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarnog inženjerstva  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)
- 06/09/2010–16/05/2014    SSS - Opća gimnazija  
Prva sušačka hrvatska gimnazija u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)
- 01/09/2004–03/07/2008    Osnovna glazbena škola  
Glazbena škola Ivan Matetić Ronjgov, Rijeka, Rijeka (Hrvatska)  
Svladano znanje i vještina sviranja glasovira.
- 10/09/2001–18/06/2010    Osnovna škola  
Osnovna škola Čavle, Rijeka (Hrvatska)

### OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik    Hrvatski

Strani jezici

RAZUMIJEVANJE

GOVOR

PISANJE

	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski	B2	B2	B2	B2	B2
Njemački	B2	B2	B2	B2	B2

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik  
[Zajednički europski referentni okvir za jezike - Ljestvica za samoprocjenu](#)

**Komunikacijske vještine** Sklonost timskom radu, kominikativna te ljubazna osoba

- Poslovne vještine**
- odgovorna i ambiciozna osoba
  - poštena
  - želja za uspjehom i napretku u učenju
  - motivirana za kvalitetno izvršavanje zadataka

**Digitalne vještine**

	SAMOPROCJENA				
	Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
	Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Iskusni korisnik

[Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu](#)

**Vozačka dozvola** B

**DODATNE INFORMACIJE**

- Priznanja i nagrade**
1. Dječiji festival "Volim glasovir" - 2.3.2005 - osvojena I. nagrada A kategorije
  5. Školsko natjecanje "Volim glasovir" - 8.10.2006 - osvojena II. nagrada A kategorija
  6. Školsko natjecanje "Volim glasovir" - 27.2.2008 - osvojena II. nagrada C kategorije
- Sudjelovanje u projektu "Čiste ručice" 2019  
 Pasivno sudjelovanje na 2. Studenskom kongresu zaštite zdravlja - Sanitas 2019