

# Utjecaj nedostatka dipeptidil-peptidaze IV na ekspresiju kemokina u debelom crijevu miševa s eksperimentalnim kolitisom

---

Gačić, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:184:851378>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivona Gačić

Utjecaj nedostatka dipeptidil-peptidaze IV na ekspresiju kemokina u debelom crijevu

miševa s eksperimentalnim kolitisom

Diplomski rad

Rijeka, 2015.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivona Gačić

Utjecaj nedostatka dipeptidil-peptidaze IV na ekspresiju kemokina u debelom crijevu

miševa s eksperimentalnim kolitisom

Diplomski rad

Rijeka, 2015

Mentor rada: Doc. dr. sc. DIJANA DETEL

Diplomski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na

Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Red. prof.dr.sc. Jadranka Varljen (predsjednica Povjerenstva)
2. Doc. dr.sc. Ivana Gobin, dipl.san.ing.
3. Doc. dr.sc. Dijana Detel, dr.med.

Rad ima 80 stranica, 11 slika, 5 tablica, 48 literaturnih navoda.

Diplomski rad izrađen je na Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci u sklopu znanstvenog projekta Ministarstva znanosti obrazovanja i sporta RH „Uloga dipeptidil-petidaze IV (CD26/DPP IV) u kroničnim bolestima“ (br. 062-0061245-0213; voditelj red.prof.dr.sc. Jadranka Varljen) te Potpore Sveučilišta u Rijeci „Uloga proteina obitelji DPP IV u kroničnim bolestima (br. 13.06.1.2.26; voditelj, red.prof.dr.sc. Jadranka Varljen).

Veliku zahvalnost dugujem mentorici doc. dr. sc. Dijani Detel na savjetima, pomoći i poticaju tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala članovima povjerenstva na vrijednim sugestijama.

Zahvaljujem se na suradnji svim djelatnicima Zavoda za kemiju i biokemiju.

## SAŽETAK

Dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV/CD26), transmembranski je glikoprotein koji kroz proteolitičku, kostimulacijsku i signalnu ulogu sudjeluje u modulaciji imunološkog odgovoru. Dosadašnjim istraživanjima pokazane su izmijenjene vrijednosti DPP IV/CD26 kod oboljelih od upalne bolesti crijeva (UBC).

UBC su imunološki posredovani kronični poremećaji kompleksne etiologije, a u ovisnosti o lokalizaciji i stupnju zahvaćenosti probavne cijevi razlikuju se dva klinička, patomorfološka oblika, ulcerozni kolitis (UK) i Crohnova bolest.

Istraživanja ukazuju da tijekom razvoja UK, priroda i intenzitet upalnog odgovora, ovisi o profilu upalnih stanica i medijatora. Kako bi proširili saznanja o ulozi DPP IV/CD26 u modulaciji imunološkog odgovora cilj istraživanja bio je na *in vivo* modelu kolitisa ispitati utjecaj nedostatka DPP IV/CD26 na aktivaciju makrofaga i ekspresiju kemokina, kemotaksijskog proteina monocita (MCP)-1 i upalnog protein makrofaga (MIP)-1.

Pokusni model kolitisa izazvan je primjenom natrijevog dekstran-sulfata u divljem tipu (C57BL/6) i DPP IV/CD26 deficijentnim miševima (CD26<sup>-/-</sup>). Uspostava, razvoj i rezolucija kolitisa pratila se temeljem kliničkih i patohistoloških parametara. Karakterizacija stanica u sluznici crijeva određena je imunohistokemijski, a ekspresija gena metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.

Razvoj kolitisa u obje ispitivane skupine miševa praćen je značajnim padom tjelesne mase, promjenom duljine debelog crijeva te porastom mase slezene i indeksa aktivnosti bolesti. Značajniji gubitak tjelesne mase i porast indeksa aktivnost bolesti zabilježeni su u CD26<sup>-/-</sup> miševa unatoč sličnim histopatološkim promjenama. Tijekom oporavka, CD26<sup>-/-</sup> miševi brže nadoknađuju izgublenu tjelesnu masu nego C57BL/6 miševi. U akutnoj fazi

zabilježen je dvostruko veći porast broja makrofaga u CD26<sup>-/-</sup> miševa u usporedbi s C57BL/6 miševima. Razvoj kolitisa popraćen je značajnim povećanjem ekspresije MCP-1 i MIP-1 u obje ispitivane skupine ali je porast u akutnoj fazi kolitisa bio značajno veći u CD26<sup>-/-</sup> miševa.

Istraživanje daje novi korak u razumijevanju uloge DPP IV/CD26 u aktivaciji makrofaga, a time i modulaciji imunskog odgovora tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

Ključne riječi: upalne bolesti crijeva, ulcerozni kolitis, animalni model, dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV/CD26), makrofagi, kemotaksijski protein monocita (MCP)-1 i upalni protein makrofaga (MIP)-1.



## SUMMARY

Dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV/ CD26) is a transmembrane glycoprotein involved in the modulation of immune response through its proteolytic, costimulatory and signaling function. Previous studies have shown decreased DPP IV/CD26 activity in patients with inflammatory bowel disease (IBD).

IBD are immune-mediated chronic disorders of complex etiology. Depending on the localization and symptoms two clinical, pathomorphological forms are present, ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease.

Recent data suggest that the course of development of UC, nature and intensity of the inflammatory response, depends on the profile of inflammatory cells and mediators. In order to expand knowledge about the role of DPP IV/CD26 in modulation of the immune response, the aim of this study was to examine the impact of DPP IV/CD26 deficiency on the activation of macrophages and the expression of chemokines, monocyte chemoattractant protein (MCP) -1 and macrophage inflammatory protein (MIP) -1 *in vivo* model of colitis.

The experimental model of colitis was induced in wild type (C57BL/6) and DPP IV/CD26 deficient mice (CD26<sup>-/-</sup>) using sodium dextran sulfate solution. The establishment, development and resolution of colitis were monitored on the basis of clinical and histopathological parameters. Characterization of cells in intestinal mucosa was determined by immunohistochemistry and the expression of genes by polymerase chain reaction. Development of colitis was followed by a significant decline in body weight, change of the length of the colon and increase in spleen weight and disease activity index in both groups of mice. Significant loss of body mass and disease activity index were observed in CD26<sup>-/-</sup> mice. Significant loss of body mass and disease activity index were observed in CD26<sup>-/-</sup> mice, more intensive than in C57BL/6 mice, in spite of similar histopathological changes at the local level. During recovery, CD26<sup>-/-</sup> mice restore body mass faster than C57BL/6 mice. In the

acute phase increase in the number of macrophage was present in both mouse strains. In CD26<sup>-/-</sup> the increase was twice than in C57BL/6 animals. The development of colitis was accompanied with a significant increase in the expression of MCP-1 and MIP-1 in both mouse strains but the increase in the acute phase of colitis was significantly higher in CD26<sup>-/-</sup> mice.

This research offers a new insight into the role of DPP IV/ CD26 in activation of macrophages and thereby modulating the immune response during the development of colitis.

Keywords: inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, animal model, dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV/ CD26), macrophages, monocyte chemotactic protein (MCP) -1 and macrophage inflammatory protein (MIP) -1.

# SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA .....	1
1.1. Obitelj dipeptidil-peptidaze DPP IV proteina .....	2
1.2. Dipeptidil-peptidaza IV/CD26 (DPP IV/CD26).....	2
1.2.1. DPP IV/CD26– multifunkcionalni protein .....	3
1.2.2. Adenozin-deaminaza (ADA)- ligand molekule DPP IV/CD26 .....	5
1.3. Imunost probavnog sustava .....	6
1.3.1. Stanična imunost .....	7
1.3.2. Humoralna imunost.....	9
1.4. Makrofagi i njihova uloga u organizmu .....	9
1.5. Kemokini.....	13
1.5.1. Kemotaksijski protein monocita (MCP) - 1 .....	14
1.5.2. Upalni protein makrofaga (MIP) - 1.....	14
1.6. Upalne bolesti crijeva .....	16
1.7. Ulcerozni kolitis .....	17
1.7.1. Epidemiologija .....	17
1.7.2. Etiologija .....	18
1.7.2. Morfološke promjene.....	18
1.7.3. Klinički tijek bolesti .....	18
1.7.4. Imunosni odgovor.....	19
1.7.5. Dijagnoza i terapija .....	20
1.7.6. Pokusni modeli UBC .....	20

2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	23
3. MATERIJAL I METODE.....	25
3.1. Kemikalije i reagensi.....	26
3.2. Laboratorijske životinje .....	27
3.3. Pokusni model .....	28
3.4. Priprema tkivnih rezova debelog crijeva za histološke analize .....	29
3.4.1. Hematoksilin-eozin bojanje .....	30
3.5. Izolacija ukupne RNA.....	30
3.6. Određivanje koncentracije, čistoće i integriteta izdvojene RNA.....	31
3.7. Sinteza komplementarne DNA .....	33
3.8. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR) .....	34
3.9. Etički aspekt istraživanja na eksperimentalnim životinjama.....	35
3.10. Statistička obrada podataka .....	36
4. REZULTATI.....	37
4.1. Klinički pokazatelji razvoja kolitisa .....	38
4.1.1 Indeks aktivnosti bolesti.....	41
4.1.2. Promjene mase slezene tijekom razvoja kolitisa i cijeljenja upalno promijenjene sluznice crijeva .....	42
4.2. Makroskopske promjene debelog crijeva .....	43
4.3. Patohistološke promjene sluznice debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa i cijeljenja upalnih promjena .....	44
4.4. Imunohistokemijska analiza sluznice debelog crijeva u akutnoj fazi upale .....	47

4.5. Analiza genske ekspresija kemokina tijekom razvoja DSS kolitisa i cijeljnja upalnih promjena u debelom crijevu.....	48
5. RASPRAVA.....	50
6. ZAKLJUČAK.....	56
7. LITERATURA.....	58
8. PRILOZI.....	64
8.1. Popis tablica.....	65
8.2. Popis slika .....	65

## **1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA**

## 1.1. Obitelj dipeptidil-peptidaze DPP IV proteina

Dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV), također poznata i kao molekula CD26, pripada velikoj obitelji prolil-oligopeptidaza, koja uz proteine iz obitelji DPP IV proteina, sadrži PEP (prolil-endopeptidaza) i ACPH (acil-aminoacil-peptidna hidrolaza). Prema Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProtKB; <http://www.uniprot.org/>) bazi DPP IV uz DPP IV pripadaju DPP8, DPP9 i DPP10, FAP (protein aktivacije fibroblasta) te DPL1 i DPL2, koji nemaju enzimatsku ulogu. Budući da među članovima DPP IV obitelji proteina postoje enzimске i/ili strukture podudarnosti odnosno razlike uveden je i naziv „DPP IV homolozi po aktivnosti i/ili strukturi“ poznatiji kao DASH (engl. *DPPIV activity and/or structure homologues*) proteini (1, 2).

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

Dosadašnje spoznaje opisuju DPP IV/CD 26 (EC 3.4.14.5; CD26; adenosine deaminase (ADA)-binding protein) kao transmembranski protein tipa II, veličine 110 kDa odnosno 120 kDa ako je glikoliziran (3). Njezina primarna struktura utvrđena je 1989. godine, a tri godina kasnije objavljena je cjelokupna cDNA humane DPP IV/CD26 (4). Sastoji od 766 aminokiselina, a u stanicama je prisutno mnogo izoformi upravo zahvaljujući različitom stupnju glikozilacije proteina (3).

U strukturi možemo razlikovati kratki unutarstanični hidrofilni, transmembranski hidrofobni te veliki vanstanični dio, u kojemu se razlikuju dvije domene: katalitička i  $\beta$ -propelerna. Upravo u katalitičkoj domeni nalazi se aktivno mjesto enzima s aminokiselinama serin-aspartat-histidin. Redosljed aminokiselina u katalitičkom centru obrnut je od onoga u klasičnim serinskim peptidazama kao što su tripsin i kimotripsin (His, Asp, Ser) pa se stoga

svrstava u skupinu nekласičnih serinskih peptidaza.  $\beta$ -propelerna domena prikriva aktivno središte te je tako djelomično ograničen pristup supstratima. Do aktivnog središta se može doći na dva načina: kroz tunel u središtu  $\beta$ -propelerne domene te kroz bočni otvor širine 14-15 Å. Transmembranska domena proteina ima dvojaku ulogu, sidra pomoću kojeg se protein drži za membranu stanice te predstavlja signalni peptid (5).

DPP IV/CD26 osim u membranski vezanom, postoji i u topljivom obliku u serumu i drugim tjelesnim tekućinama (sjemena tekućina, slina i žuč) (6), oba oblika pokazuju, enzimsku aktivnost (7). Serumski DPP IV/CD26 ima sličnu molekularnu masu kao membranski vezana, ali joj nedostaju intracelularni i transmembranski dio. Njezina se topljivost pripisuje upravo nedostatku transmembranske domene (4). Zbog široke rasprostranjenosti ekspresije u različitim tipovima stanica DPP IV/CD26 može imati širok spektar funkcionalnih uloga u različitim procesima (8).

### **1.2.1. DPP IV/CD26– multifunkcionalni protein**

DPP IV/CD26 je multifunkcionalni protein, koji svoje brojne funkcije ostvaruje različitim mehanizmima: enzimskom aktivnošću, receptorskom funkcijom (vezanjem adenozin deaminaze (ADA), kolagena i fibronektina) te interferiranjem sa signalnim putevima (kao kostimulatorna molekula limfocita T (9)). Funkcije DPP IV/CD26 ovise o tipu stanica na kojima je izražena.

Enzimska uloga očituje se katalitičkom razgradnjom, odnosno odcjepljivanjem dipeptida s peptida ili proteina N-terminalnog dijela lanca koji na pretposljednem mjestu sadrži aminokiselinu prolin ili alanin (9). Mnogi biološki aktivni peptidi na N-terminalnom kraju imaju aminokiselinu prolin te su time potencijalni supstrati za DPP IV/CD26. Među najvažnijim supstratima nalaze se neuropeptidi Y i YY, TNF- $\alpha$ , RANTES, interleukini (IL)-1, IL-2,



IL-6 no i mnogi drugi. Manji peptidi vrlo su efektivni supstrati, dok s porastom broja aminokiselina smanjuje se mogućnost njihove razgradnje. Široki spektar supstrata ukazuje na njegovu potencijalnu ulogu u raznim biološkim procesima (3, 6).

DDP IV/CD26, široko je prepoznata po svojoj ulozi u enzimskoj razgradnji inkretina, uključujući glukagonu sličan peptid (GLP)-1, GLP-2 i glukoza ovisnog inzulotropnog peptida (10). Trenutni farmakološki pristupi za inhibiciju DPP IV/CD26 oslanjaju se isključivo na inhibiciju njezine katalitičke funkcije. DPP IV/CD26-inhibitori utječu na enzimsku razgradnju inkretina peptida i predstavljaju značajan napredak u liječenju dijabetesa tipa 2. DPP IV/CD26 ima i niz neenzimatskih funkcija koje uključuju interakciju s deaminazom s ADA i drugim izvanstaničnim proteinima matriksa (5).

Izražena na stanicama imunskog sustava DPPIV/CD26 ostvaruje regulatornu ulogu u aktivaciji limfocita T te aktivaciji/inaktivaciji nekih citokina i kemokina. *In vitro* inhibicija DPP IV/CD26 enzimске aktivnosti limfocita T uzrokuje pojačano lučenje protuupalnog transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ ; engl. transforming growth factor  $\beta$ ). Na ulogu u modulaciji humoralnog odgovora ukazuje smanjenje proizvodnje imunoglobulina, te inhibicija imunskog odgovora na aloantigene kod miševa i štakora tretiranih DPP IV/CD26 inhibitorima (11).

Unatoč dobro dokumentirane uloge DPP IV/CD26 u modulaciji funkcije inkretina, njegova neenzimatska uloga u procesima, kao što su upala, dijabetes i pretilosti, ostaje slabo opisana (12). Kada govorimo o upalnim procesima najveći broj istraživanja bavi se problematikom uloge DPP IV/CD26 u aktivaciji T stanica, dok njezina uloga u razvoju i aktivaciji dendritičkih stanica i makrofaga nije dobila mnogo pozornosti (13).

Zbog katalitičke aktivnosti te uključenosti u imunomodulacijske procese DPP IV/CD26 je od velikog značaja u kliničkom smislu. Dosadašnja istraživanja pokazala su izmjenjene

vrijednosti aktivnosti i izražaj DPP IV/ CD26 u različitim oboljenjima: upalna bolest crijeva (UBC), reumatoidna oboljenja, neurološke bolesti, metabolički poremećaji te mnogih drugih (3, 14).

### **1.2.2. Adenozin-deaminaza (ADA)- ligand molekule DPP IV/CD26**

Adenozin-deaminaza (ADA) enzim je uključen u metabolizam purina. Dugi niz godina, ADA je smatran citosolikom, ali je otkriven na staničnoj površini mnogih stanica te se stoga može smatrati egzogenim enzimom. Važno je napomenuti da je egzo-ADA izražena na površini T i dendritičkih stanica. Zato što egzo-ADA nije membranski protein, potrebna joj je povezanost s površinom stanice pomoću protein nosača. Do sada su opisana tri takva proteina: DPP IV/CD26 te adenoreceptori A1 i A2B. Pokazano je da interakcija DPP IV/CD26 i ADA-e rezultira aktivacijom kostimulacijskog signala kod limfocita T (15).

Fiziološka aktivacija T stanica zahtjeva najmanje dva signala. Prvi daje stimulacija T stanični receptor/CD3 kompleks posebnim peptidom/ MHC kompleks. Drugi signal može biti isporučen aktiviranjem kostimulacijskih molekula s površine koje, slično adhezijskim molekulama, pripadaju skupini «pomoćnih molekula», koje su uključene u niz antigen nespecifičnih interakcija između antigen prezentirajuće stanice i T-stanice u imuno-sinapsi. Uključivanje kostimulacijskih molekula može pozitivno utjecati na funkciju T stanica, u smislu da potiče povećanu aktivaciju, proliferaciju, preživljavanje i izlučivanje citokina. Kritična uloga kostimulacije u aktivaciji T stanice očituje se u činjenici da se u nedostatku bilo kojeg kostimulirajućeg signala, antigenski prikaz inducira T stanice da postanu anergične i tolerantne (16).

Otkriveno je da kostimulacijski učinak kroz DPP IV/CD26 na površini T stanica je promoviran od egzo-ADA kolokalizirajući s A2B adenozin receptorom izraženim na površini antigen prezentirajuće stanice (17). DPP IV/CD26 slabo je izražena na T stanicama koje miruju, ali je

jako regulirana reagensima koji sudjeluju i u TCR/CD3 (18). Za razliku od članova TNFR/TNF obitelji, za CD26-posredovane kostimulacije smatra se da se odvijaju između interakcije CD26, ADA i A2B adenzin receptora. Dakle, CD26 tipa II transmembranski protein na T stanicama-, A2B adenzin receptorima -G proteinvezanim receptorima na DC- i ADA vezanih istodobno na oba mogu predstavljati primjer novog modula vodeći do napredovale prezentacije antigena. Pokazalo se da je tijekom imunoinapse između superantigen-pulsne DC i i CD4<sup>+</sup> T stanice, kostimulirajući učinak promoviran od strane CD26-ADA interakcije, potiče proizvodnju IL-6 i poboljšano INF- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  izlučivanje (17).

Pokazano je da se ADA za molekulu DPP IV/CD 26 veže samo kod ljudi i viših sisavaca, dok to svojstvo nije pronađeno kod štakora i miševa (19).

### **1.3. Imunost probavnog sustava**

Ljudsko crijevo stanište je brojnih vrsta bakterija, a svaka od njih nosioc je određene skupine antigena. Gastrointestinalni trakt pokriven je slojem sluzi koja štiti epitel od luminalnih antigena. Dobro razvijena mukozna barijera prva je linija obrane protiv raznih crijevnih patogena. Leukociti migriraju u mukozni sloj i tamo patroliraju, izvršavajući funkciju nadzora bez kolateralne štete. Vanjska ljepljiva površina pruža priliku za rast probiotičkih sojeva te izgradnju zaštitnih slojeva, sprečavanje bakterijskog nakupljanja i stvaranje mikrokolonija na površini debelog crijeva. Prije nego što bakterije mogu invadirati sluznicu, oni najprije moraju proći mukoznu barijeru. Upala će se razviti tek nakon što je mukozna barijera slomljena i obrana razbijena te time patogeni imaju mogućnost ulaska u dublje slojeve sluznica.

U obrani organizma razlikujemo prirođeni (nespecifični) i stečeni imunoški odgovor. Prirođeni odgovor usmjeren je protiv svih antigena podjednako te se odvija bez prethodnih dodira s istim. On uključuje anatomske zapreke sluznica, kemijsku zaštitu (pH želuca, enzim pepsin) te staničnu zapreku, koju čine enterociti i fagocitne stanice.

Stečeni imunološki odgovor usmjeren je na pojedini antigen i rezultat je podražaja imunološkog sustava. Najvećim dijelom je posredovan T-limfocitima koji se nalaze u limfnom sustavu crijeva poznatim kao GALT (engl. *gut associated lymphoid tissue*). Djelovanje mukoznog imunog sustava, pa tako i crijevnog imunološkog sustava temelji se na dva funkcijski i građevno različita dijela: lokalizirani i difuzni. Lokalizirani dio čine nakupine stanica koje su odgovorne za inicijaciju imunološke reakcije, dok difuzni dio predstavljaju različite efektorske stanice poput limfocita B i T, makrofaga i drugih stanica.

Lokalizirane nakupine stanica u probavnom sustavu predstavljaju tonzile, Peyerove ploče, izolirani limfatični folikuli i mezenterični limfni čvorovi. Peyerove ploče nalaze se u sluznici tankog crijeva, a građene su od kupole, temeljnih folikula i parafolikularnih regija. Temeljni folikuli predstavljaju nakupine B limfocita s germinativnim centrima, a parafolikularne regije su regije bogate T limfocitima. Na površini Peyerovih ploča epitelne stanice imaju blago razvijene mikroresice, malo vrećastih stanica i M stanice.

### **1.3.1. Stanična imunost**

Epitelni sloj crijeva sadrži M stanice koje su u bliskom kontaktu sa subepitelijalnim stanicama među kojima su limfociti te makrofazi i dendritičke stanice, a kojima je osnovna zadaća prijenos antigena iz lumena crijeva u subepitelijalni dio u nativnom obliku te predočavanje antigena. Iz lumena crijeva, M stanice endocitozom prenose antigene do ostalih epitelnih, odnosno subepitelijalnih stanica. Iako se dugo godina smatralo kako su epitelne stanice najvažnije u apsorpciji hranjivih sastojaka, novija istraživanja govore u prilog intraepitelijalnih

stanica koje su odgovorne za imunološke procese, organogenezu i obranu crijeva od tumorskih stanica (26).

Kod upalnih stanja epitelne stanice dodatno povećavaju izražaj MHC II molekula, što utječe na izražaj kostimulacijskih CD80 i CD86 molekula koje reagiraju s molekulom DPP IV/CD26 na limfocitima T i daju kostimulacijski signal te aktiviraju limfocite T. Također, izražavaju adhezijske molekule i luče proupalne citokine i kemokine koje dodano aktiviraju limfocite T.

Osim prijenosa stranog antigena, vrlo je važno prepoznavanje antigena normalne crijevnne flore, čiji se antigeni pomoću selektivnih mehanizama ne prenose.

Uz M stanice, važnu ulogu vrše limfociti u sluznicama, a s obzirom na fenotipske razlike dijelimo ih na limfocite lamine proprije i intraepitelne limfocite. Limfociti lamine proprije nalaze se ispod epitela u stormi, gdje imaju izvršnu funkciju. Više od 95% limfocita T lamine proprije izražavaju  $\alpha\beta$ -T stanični receptor, te ih je oko 80%  $CD4^+$ . Intraepitelni limfociti se nalaze između enterocita, a može biti čak do 40% limfocita T koji izražavaju  $\gamma\delta$ -T stanični receptor te ih većinu (oko 80%) čine  $CD8^+$ . Iako se u ljudi sazrijevanje limfocita T odvija u timusu, u miševa samo 40% intraepitelnih limfocita sazrijeva u timusu, i to limfocita koji izražavaju  $\alpha\beta$ -TCR. Ostalih 60% ne ovisi o timusu, što je pokazano istraživanjem u kojem su miševima odstranjeni timus, svi limfni čvorovi i Peyerove ploče, a limfociti koji izražavaju  $\delta\gamma$ -TCR su prisutni u sluznici (26).

U lamini propriji, osim limfocita T, nalaze se i zrele plazma stanice, makrofagi, dendritične stanice, mastociti i eozinofili. Većinu limfocita T čine  $CD4^+$ , koji reguliraju Th2 odgovor i diferencijaciju limfocita B. Oni odlaze u obližnje limfne čvorove kako bi se diferencirali u plazma stanice. U lamini propriji prevladavaju plazma stanice koje luče imunoglobulin (Ig)A protutijela, ali se u nekim upalnim stanjima (npr. UK) odnos plazma stanica mijenja u korist onih koje luče protutijela tipa IgG.

### **1.3.2. Humoralna imunost**

Humoralna imunost odvija se u izvanstaničnom prostoru te je posredovana humoralnim tvarima, u prvom redu protutijelima. IgA najvažnije je protutijelo sluznice crijeva, a osim u crijevima, možemo ga naći i u krvi. IgA u sluznicama najčešće je u obliku dva monomera te da bi kao takav došao u sluznicu mora proći kroz epitelnu stanicu koje na površini izražavaju receptor za topljivi IgA, te endocitozom prelazi do luminalne strane. Relativno je otporan na proteolizu, pa mu to omogućuje opstanak u lumenu gdje ima ulogu inhibicije adhezije bakterija, apsorpcije makromolekula i upalnih efekta drugih imunoglobulina, te aktivacija komplementa i neutralizacija nekih virusa i toksina. IgM i IgG protutijela ima vrlo malo.

Komplementski sustav čine tridesetak membranskih i serumskih bjelančevina, koje kaskadnom reakcijom mogu lizirati stanicu. Predstavlja važan mehanizam urođene imunosti, a može se aktivirati na tri načina: klasičnim, lektinskim i alternativnim putem.

Interferon (IFN) je skup peptida sa antivirusnim, antiproliferacijskim i imunoregulacijskim djelovanjem. Pripada citokinima, a izlučuju ga limfociti, makrofagi i druge stanice. Po funkciji razlikujemo dvije skupine interferona: interferoni sa antivirusnim i antiproliferacijskim djelovanjem, IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$  te interferon sa imunoregulacijskim djelovanjem, IFN- $\gamma$ . Antivirusno djelovanje temelji se na razgradnji RNA i stopiranju proizvodnje proteina te ono nije specifično za virus, ali je specifično za vrstu. IFN- $\gamma$  djeluje na limfocite B, T, NK stanice i makrofage na različite načine. Pospješuje djelovanje makrofaga, povećava i smanjuje odgovor limfocita T, smanjuje humoralne reakcije limfocita B i potiče citotoksičnost NK stanica.

### **1.4. Makrofagi i njihova uloga u organizmu**

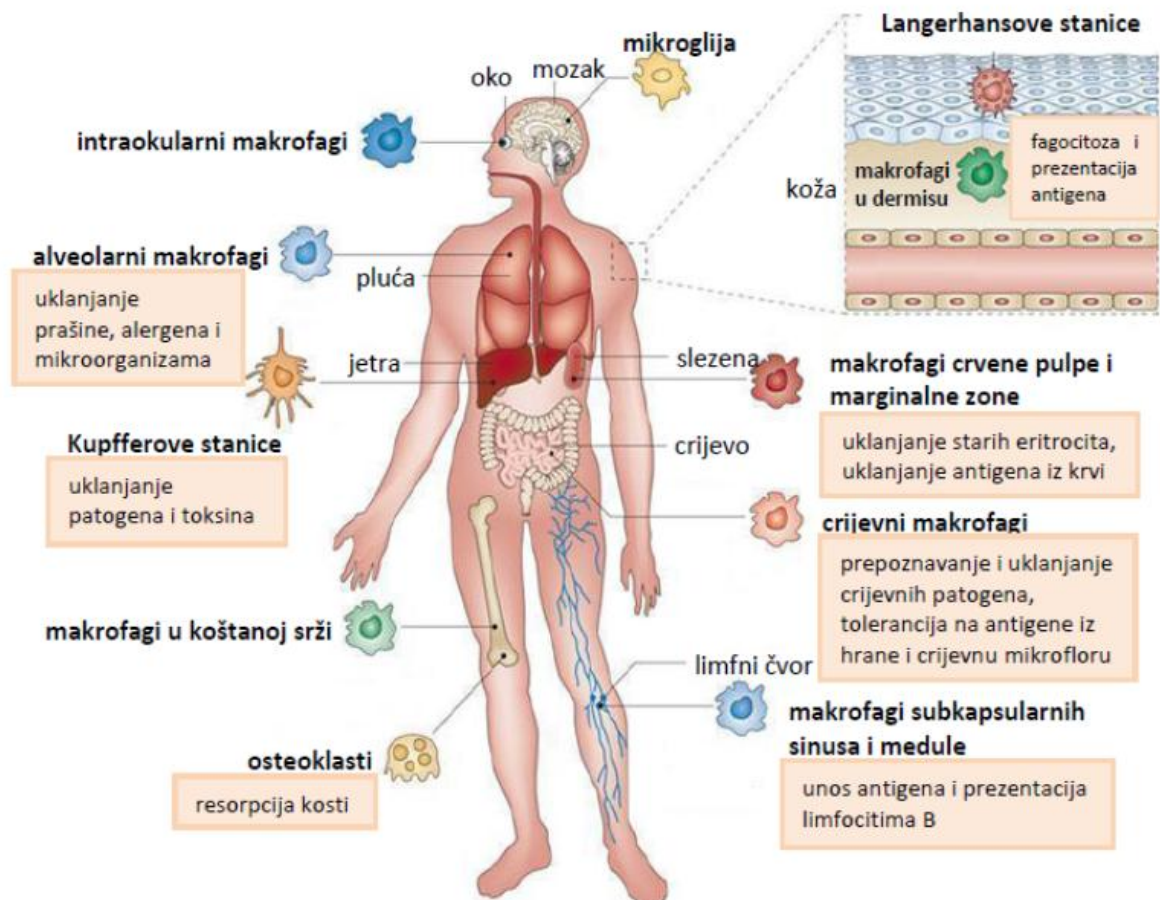
Monociti pripadaju bijelim krvnim stanicama (leukocitima) koje u koštanoj srži nastaju iz hematopoetske matične stanice, odnosno preteča mijeloidne loze. Monociti žive u krvi, a

važni su jer su prekursori koji opskrbljuju ekstravaskularni prostor s novim makrofagima. U krvi borave jedan do četiri dana i potom odlaze u tkiva, gdje postaju tkivni makrofagi i preuzimaju ulogu ovisno o vrsti tkiva (Slika 1). Makrofagi su stanice koje se nalaze u različitim tkivima i seroznim šupljinama i to kao slobodne i fiksne stanice. Slobodni makrofagi najviše se nalaze u peritonealnoj i pleuralnoj šupljini, plućima, koštanoj srži te nešto manje u slezeni i limfnim čvorovima. Fiksni makrofagi nalaze se u različitim tkivima i poznati su pod raznim imenima: histiociti u vezivu i oko mišića, Kupfferove stanice jetre, mikroglija stanice mozga, mezangijalne stanice u bubregu te alveolarni makrofagi u plućima. Makrofagi ne izražavaju antigen-specifične receptore nego nekoliko skupina receptora im pomažu da osjete uljeze i na njih reagiraju aktivacijom. Toll-like receptori (TLR) najvažniji su receptori urođene imunosti jer njihova rana aktivacija dovodi do cijelog niza događaja koji završavaju proizvodnjom antimikrobnih peptida i proteina te lučenjem prouupalnih citokina (20).

Makrofag radi jednu od dvije stvari. Može aktivirati odluku za borbu (ubijanje patogena) ili popravak (npr. zarastanje rana). Ako je materijal "strani", ljudski makrofagi (također i kod drugih sisavaca i ptica) razvili su drugi, sofisticiraniji sustav za komunikaciju s T stanicama koji ide od prepoznavanja tuđih do prepoznavanja varijacija sebe. Kako bi se to postiglo, makrofagi (također dendritičke stanice i B stanice) posjeduju klasu II histokompatibilne antigene tako da su strani antigeni predstavljeni T stanicama kao oni sami. Ovaj sustav omogućuje T-stanicama razbiti specifične reakcije, ne samo na egzogene patogene nego „self“ stanice koje izražavaju preinake sebe zbog virusne infekcije ili onkogene transformacije. Jedan od takvih odgovora T-stanica utječe na B stanice da produciraju antitijela. Drugi odgovor uzrokuje daljnju amplifikaciju aktivacije makrofaga koji je neophodan za ubiti mnoge unutarstanične patogene. Tijekom evolucije, makrofagi su

zaduženi za kritične funkcije koje su izravno (urođen odgovor) ili neizravno (adaptivni odgovor) potrebne za opstanak (21).

Upravo zbog mogućnost dvojakog djelovanja, ubijanje patogena i slanje signala drugim imunološkim stanicama makrofagi imaju centralnu ulogu kako u obrani domaćina tako i u patogenezi upale i degenerativnih bolesti.



**Slika 1. Uloga tkivnih makrofaga (21).**

Ovisno o okruženju u kojem se nađu, odnosno, ovisno o tome jesu li monociti migrirali u zdravo ili upalno promijenjeno područje nastali tkivni makrofagi mogu imati



različite fenotipove (27). Klasični put aktivacije makrofaga, poznat kao M1, dobro je opisan, a pokreće ga aktivacija putem IFN- $\gamma$  u kombinaciji sa sastavnicom bakterijske stjenke gram negativnih bakterija – bakterijskim lipopolisaharidom (LPS). Osim navedenog postoji i nekoliko alternativnih puteva aktivacije makrofaga koji su nešto slabije definirani i jednim imenom se nazivaju M2 putevi. Oni mogu biti potaknuti različitim kombinacijama citokina (IL-4 i IL-13 kod M2a, IL-10 kod M2b i M2c), imunokompleksima i LPS-om (M2b) te glukokortikoidima (M2c). Lučenjem različitih posrednika M1/M2 makrofagi obavljaju dijametralno suprotne funkcije (20, 22). Tako M1 makrofagi inhibiraju proliferaciju stanica i uzrokuje oštećenja tkiva, dok M2 potiču staničnu proliferaciju i popravak tkiva. Uloga M1 makrofaga primarno je u obrani organizma u slučaju ozlijede i/ili infekcije, unutarstaničnih patogena i tumorskih stanica, a osim toga M1 makrofagi su i snažne antigen prezentirajuće stanice (27). Borba je posredovana makrofagima koji proizvode NO koji inhibira proliferaciju stanice, dok je popravak posredovan makrofagima koji proizvode ornitin koji promovira proliferaciju i popravak (preko poliamina i kolagena). NO (i citrulin) i ornitin (i urea) rezultat su enzimskog cijepanja terminalne dušikove veze arginina, samo na nešto drugačiji način

Arginin:  $O_2CCHNH_3 - C_3H_6 - NH - C - (NH)_2$

iNOS:  $O_2CCHNH_3 - C_3H_6 - NH - C - NH$  (Citrulin) + NO

Arginaza:  $O_2CCHNH_3 - C_3H_6 - NH$  (Ornitin) +  $C - (NH)_2$

Imena M1 i M2 izabrana su jer su M1 i M2 makrofagi zaslužni za promicanje Th1 i Th2 odgovora, a produkti Th1 i Th2 odgovora smanjuju M2 i M1 aktivnost. Postojanje M1/ M2 makrofaga ukazuju na važnost urođene imunosti i kako je ona povezano sa stečenom imunosti u protutežnom sustavu (22, 23).

## 1.5. Kemokini

Kemokini su mali peptidi koji u prvom redu djeluju kemotaktički na upalne stanice i uzrokuju njihovu migraciju u upalna područja. Kemokine luče upalne i imunosne stanice, a prema građi molekule i prema ciljnim stanicama na koje djeluju, mogu se podijeliti u četiri skupine: CXC, CC, C i CXXXC (X označuje da se između dvaju cisteina nalazi bilo koja aminokiselina). Najpoznatiji predstavnici CC skupine su makrofagni kemotaktični i makrofagni upalni proteini- MCP i MIP. Oni privlače monocite-makrofage, limfocite te u različitom stupnju i druge fagocitne stanice, NK stanice i bazofile. Kemokini svoj učinak ostvaruju pomoću kemokinskih receptora. Glavnina kemokinskih receptora smještena je na membrani te kroz nju prolazi u obliku petlje sedam puta (engl. *serpentine receptors*) (24-26).

Osim u posredovanju u imunološkim i upalnim procesima organizma, kemokini djeluju i na mnoge druge ne-imunološke stanice: fibroblaste, glatke mišićne stanice, keratinocite i stanice melanoma.

Tablica 1. Podjela kemokina (26)

Kemokini	Skupina	Stanice koje ih proizvode
IL-8	CXC	monociti, makrofagi, fibroblasti, keratinociti
PBP/ $\beta$ -TG/NAP-2	CXC	trombociti
MIP-1 $\alpha$ , $\beta$	CC	monociti, makrofagi, neutrofili, endotelne stanice
MCP-1	CC	monociti, makrofagi, fibroblasti, keratinociti
RANTES	CC	T-stanice
Limfotaktin	C	stroma timusa
Eotaksin	C	T <sub>H</sub> 2 stanice

### **1.5.1. Kemotaksijski protein monocita (MCP) - 1**

Kemotaksijski proteini monocita (MCP) porodica su  $\beta$ -kemokina s brojnim funkcijama. Osim MCP-1 u čovjeka su otkrivena još tri proteina kemotaksije monocita MCP (1-4). Vežu se na izomere CCR2 receptora (CCR2a i b) i CCR9, a ostvaruju svoju ulogu privlačenjem različitih upalnih stanica uključujući monocite, NK stanice, T-limfocite i dendritičke stanice. MCP-1 je purificiran kao čimbenik kemotaksije monocita iz supernatanta kulture različitih tipova stanica. Dosadašnja istraživanja pokazala su brojne funkcije MCP-1. MCP-1 potiče ulazak kalcija u stanicu, ekspresiju adhezijskih molekula i oslobađanje lizosomalnih enzima u monocitima. MCP-1 utječe na produkciju proupalnih citokina, kao što su IL-1 i IL-6 te pojačava aktivnost monocita protiv različitih tipova malignih stanica (27). Pored toga, rezultat produkcije MCP-1 je kemotaksija, sinteza histamina i leukotriena te ulazak kalcija u bazofile. Nadalje, ulazak kalcija u stanicu mehanizam je kojim MCP-1 pojačava kemotaksiju i  $CD4^+$  i  $CD8^+$  limfocita te inducira *in vitro* kemotaksiju NK stanica. Manje je poznata i prepoznata uloga ovog kemokina u procesima regeneracije tkiva, iako je pokazan smanjen stupanj regeneracije tkiva kod MCP-1<sup>-/-</sup> miševa (28). Na temelju dostupnih znanstvenih spoznaja možemo zaključiti da MCP-1 ima važnu ulogu u razvoju upalnog procesa, fibrozi i neovaskularizaciji.

### **1.5.2. Upalni protein makrofaga (MIP) - 1**

MIP-1 kemokin je otkriven davne 1988. godine, a do sada su prepoznata četiri člana MIP porodice: MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, CCL9/MIP-1 $\delta$ /CCL9 i MIP-1 $\gamma$ /CCL15. Porodica MIP-1 kemokina čine mali, 8-10 kDa strukturno slični, inducibilni i proinflamatorni kemokini. Vežu se za, a time i aktiviraju  $\beta$  kemokinske receptore, CCR1, CCR3 i CCR5. Bez obzira što MIP-1 receptori vežu nekoliko različitih kemokina, MIP-1 $\alpha$  pokazuje visoku specifičnost za

receptore. MIP-gen se nalaze na 11. i 17. kromosomu, a sastoje od tri eksona i dva introna. Stanice koje se smatraju odgovornima za pokretanje imunološkog odgovora, kao što su stanice makrofagne linije, limfociti, neutrofilni, dendritičke stanice i NK stanice mogu otpustiti veliku količinu MIP-1 (29). S druge strane, stanice kao što su trombociti, osteoblasti, astrociti i mikroglija, epitelne stanice i fibroblasti će nakon stimulacije otpustiti manju količinu MIP-1 $\alpha$ . Za sintezu i oslobađanje MIP-1 porodice kemokina u najvećem broju slučajeva potrebna stanična aktivacija, iako u manjoj količini ekspresija MIP-1 kemokina je prisutna i u nestimuliranim stanicama. Produkciju MIP-1 $\alpha$  potiču različiti proinflammatorni čimbenici, kao što su lipopolisaharid, virusna infekcija, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 i drugi. Protu-upalni medijatori kao što su IL-4, IL-10 ili protu-upalni lijekovi (deksametazon) imaju negativan učinak na ekspresiju. Vezanje za receptor pokreću se kaskade intracelularnih zbivanja koji vrlo potiču funkcije ciljnih stanica kao što su, kemotaksija, degranulacija, fagocitoza i sinteza medijatora. Mehanizmom privlačenjem različitih upalnih stanica MIP-1 porodica sudjeluje u regulaciji kako akutnog tako i kroničnog upalnog odgovorom domaćina na mjestu ozljede ili infekcije. MIP-1 kemokini su posebice važni u kemotaksiji T limfocita iz cirkulacije na mjesto upale, kao i za regulaciju transendotelne migracije upalnih stanica. MIP-1 $\alpha$  potiče kemotaksiju B limfocita i CD8<sup>+</sup> stanica dok MIP-1 $\beta$  privlači CD4<sup>+</sup> stanice. Za razliku od velikog učinka na T stanice pokazan je manji kemotaksijski učinak na neutrofile i eozinofile.

Nakon što MIP-1 aktivira CCR1, CCR3 i CCR5 receptore dolazi do oslobađanja kalcija, aktivacije i oslobađanja proupalnih medijatora, kao što su leukotrien-4, arahidonska kiselina i histamin. Pored toga, MIP-1 porodica kroz modulaciju Th diferencijacije može regulirati imunološki odgovor. Obzirom da je pokazano da MIP-1 potiče ekspresiju Th2 staničnog odgovora za pretpostaviti je da ima važnu ulogu u patogenezi brojnih upalnih bolesti, kao što

su astma, formiranje granuloma, cijeljenje rana, artritis, multipla skleroza, pneumonija i psorijaza (25, 29).

## **1.6. Upalne bolesti crijeva**

Probavni sustav ima važnu ulogu u imunološkom sustavu, zbog učinkovitih obrambenih mehanizama protiv patogena, održavajući homeostazu u crijevima. Međutim, bolest kao što su Crohnova bolest (CB) ili ulcerozni kolitis (UK), glavni oblici UBC odnose se na prekomjerni i nekontrolirani imunološki odgovor na do sada još uvijek nepoznati antigen (30).

Obje bolesti manifestiraju se povremenim upalama dijelova crijeva s različitom simptomatologijom, uz kronični te nepredvidivi tijek bolesti. Bolesti se razlikuju prema lokalizaciji, prirodi upalnih promjena, imunopatološkoj osnovi te patogenezi (15). UK zahvaća isključivo debelo crijevo i rektum, za razliku od CB koja se može pojaviti u bilo kojem dijelu probavnog trakta. Osim toga, UK zahvaća samo gornji mukozni sloj debelog crijeva, dok CB zahvaća cijelu crijevnu stijenku (31).

Unutrag nekoliko godina smatralo se da su UBC u prvom redu posredovane Th1 u CB odnosno Th2 stanicnim imunskim odgovorom u UK, ali sada je poznato da su Th17 stanice i njihovi citokini ključni posrednici u oba stanja. Th17 stanice masivno infiltriraju upaljena crijeva pacijenata UBC, gdje proizvode IL-17A i druge citokine, što izaziva i pojačava upalni proces. Međutim, te stanice pokazuju funkcionalnu plastičnost pa se mogu pretvoriti u bilo IFN- $\gamma$  proizvodnju Th1 stanice ili regulacijskih T-stanica (31, 32).

UBC imunološki su posredovana oštećenja za koja postoji genetska predispozicija. Međutim, dodatni faktori okoline također mogu potaknuti razvoj bolesti. Bolesti se najčešće

manifestiraju abdominalnom boli, povišenom temperaturom, kroničnim proljevom, rektalnim krvarenjem nastalim zbog ulceracija unutrašnjosti kolona ili rektuma koje mogu biti popraćene komplikacijama poput fistula, stenoza i apcesa u CB te megakolona kod UK. Bolesnici s UBC često imaju različite ekstraintestinalne komplikacije poput artritisa, psorijaza, uveitisa, problema s jetrom i druge (33). Oko 10% oboljelih od UBC ne mogu se sa sigurnošću svrstati niti u UK ni u CB. Za takvo stanje koristi se naziv nedeterminirani kolitis.

## **1.7. Ulcerozni kolitis**

Ulcerozni kolitis pripada skupini kroničnih autoimunih upalnih bolesti crijeva, čija je etiologija i dalje nepoznata. Međutim, zadovoljavajuće rješenje ne može biti daleko.

### **1.7.1. Epidemiologija**

Epidemiološka promatranja mogu biti korisna u identificiranju pravih uzročnika ovih neodređenih bolesti. Zemljopisno, prevalencija bolesti ima nagib od sjevera prema jugu i u manjoj mjeri, od zapada prema istoku. Nerazmjer zapada i istoka može se pripisati razlici u zapadnim stilovima života. Učestalost bolesti je u porastu u cijelom svijetu u posljednje vrijeme, ali njezino širenje je usporeno u visoko pogođenim zemljama. Prema dobi, početak bolesti češće se javlja u drugom ili trećem desetljeću života, ali postoji i još jedan vrhunac u 60-tim godinama života. Što se tiče spolne distribucije, postoji mala nadmoć UK kod muškaraca i CB kod žena. Također se istražuju okolišni čimbenici i utjecaji ponašanja. Dijeta, uloga rane dobi, pušenja i utjecaj hormonalnog statusa i droga razmatraju se kao korisni čimbenici u manifestaciji bolesti. Genetske studije pokazuju da jedna četvrtina pacijenata koji boluju od UBC imaju člana obitelji koji boluje od istih (32).

### **1.7.2. Etiologija**

Unatoč opsežnim istraživanjima, etiologija te sami mehanizmi razvoja upale nisu u potpunosti razjašnjeni. Dokazano je da u razvoju UK ima ulogu genska predispozicija, utjecaj okolišnih čimbenika i abnormalan imunološki odgovor na vlastiti ili strani antigen.

Mukozni sloj u kolonu sadrži unutrašnji sloj koji je čvrsto vezan na sluznicu crijeva i vanjski sloj koji se može isprati s minimalnim ispiranjem. Neke bakterije mogu otopiti unutarnji zaštitni sloj sluzi. Nedostaci u obnovljanju i formiranju unutarnjeg mukoznog sloja dopuštaju bakterijama dolazak do epitela i na ta način mogu uzrokovati kolitis. UK uzrokovan je slabljenjem barijere crijeva, uglavnom zbog povećane infiltracije bakterija crijeva i nastalog zapošljavanje neutrofila i formiranja apscesa kriptе. Razumijevanje uloge sluzi i bakterija te njihovih interakcija pomoći će da se jasnije utvrdi etiologija UK (31).

### **1.7.2. Morfološke promjene**

Oboljenje kod UK primarno se javlja u rektumu te se širi ascendentno. U 10-20% slučajeva bolest može zahvatiti i ileum, ali zadržava obilježja ulceroznih promjena u debelom crijevu. Sluznica zahvaćenog dijela crijeva patološki je crvena, granulirana te lako može doći do kontaktnog ili spontanog krvarenja. Oštećenja crijevne stjenke očituju se kao mjestimične erozije, ulceracije i krvarenja duž debelog crijeva. Ulceracije su različitih veličina, a ukoliko su dijelovi sluznice očuvani, granice zdrave i oštećene sluznice su oštre. Klinički, razlikuju se proktitis, proktosigmoiditis, subtotalni kolitis ili pankolitis. U pankolitisu, upalne promjene zahvaćaju i terminalni ileum (32).

### **1.7.3. Klinički tijek bolesti**

Kod većine bolesnika početak bolesti je postepen s nespecifičnim simptomima poput malaksalosti, mučnine, povraćanja, osjećaja nelagode u trbuhu. Ti simptomi mogu trajati

dugo prije pojave specifičnih simptoma. Glavni simptomi aktivnog oblika bolesti su krvavoslužavi proljevi, grčevi i abdominalna bol. Također, česta je temperatura i gubitak na tjelesnoj težini. Učestalim i jakim proljevima dolazi do poremećaja elektrolita i acidobazne ravnoteže, hipoproteinemije, a krvarenje dovodi do nastanka sideropenične anemije. Kako je ulcerozni kolitis imunosno posredovana upala, mogu se javiti i brojne ekstraintestinalne promjene poput artritisa, uveitisa, promjena na jetri, kožni poremećaji (33). Većina bolesnika s ulceroznim kolitisom imaju razdoblja neaktivnosti bolesti koji se izmjenjuju s „bljeskovima“ bolesti (34, 35).

U slučaju kada dođe do širenja upalnog procesa iz sluznice debelog crijeva u mišićni sloj smanjuje se motilitet crijeva, ono se postepeno širi, a pokreti crijeva su sve rjeđi te može doći do razvoja toksičnog megakolona. Ako se proces proširi na vanjski vezivni sloj debelog crijeva, prijete njegovo pucanje i smrt. Značajno je povećan rizik od raka debelog crijeva kod bolesnika s UK nakon deset godina, ako je zahvaćeno područje slezene. Bolesnici s proktitisom ili proktosigmoiditisom obično nemaju povećani rizik (34).

#### **1.7.4. Imunosni odgovor**

Karakteristika humanih oblika UBC i eksperimentalno izazvanih kolitisa je neobuzdana aktivacija imunološkog odgovora, uključujući aktivaciju makrofaga i dendritičkih stanica, produkcija proinflamatornih citokina i kemokina te povećana ekspresija adhezijskih i kostimulacijskih molekula. Istraživanja su pokazala da tijekom razvoja UBC dolazi do aktivacije Th1 (indukcija staničnog imunosnog odgovora), Th2 (indukcija humoralnog imunosnog odgovora) ili Th17 limfocitnog odgovora (31, 33).



### **1.7.5. Dijagnoza i terapija**

Utvrđivanje dijagnoze nije jednostavno, a uobičajeni dijagnostički postupak temelji se na analizi kliničkih simptoma te na nalazu upaljene sluznice proktosigmoidoskopijom. Obrada se mora upotpuniti pregledom cijelog kolona kolonoskopijom ili irigografijom, detaljnim mikrobiološkim pregledom stolice te histološkim pregledom materijala dobivenog endoskopskom biopsijom. Fizikalni pregled je potreban za detekciju ekstraintestinalnih komplikacija bolesti i sistemskih posljedica teškog kolitisa kao što su povišena temperatura, tahikardija, dehidracija i hipotenzija.

UK je neizlječiva bolest. Liječenje se sastoji ponajprije u liječenju akutnih simptoma, a potom u održavanju razdoblja remisije. U pojedinim slučajevima vrlo je teško postići i/ili održati remisiju bolesti. U održavanju razdoblja remisije osim medikamentozne terapije vrlo važnu ulogu imaju i životne navike uključujući vrstu i način prehrane (uzimanje malih obroka u manjim vremenskim razmacima), smanjenje stresa, umjerenom tjelesna aktivnost i tjelovježba. Ako se drži pod odgovarajućim nadzorom, UK ne mora znakovito ograničiti svakodnevne životne aktivnosti (35).

### **1.7.6. Pokusni modeli UBC**

Primjena eksperimentalnih modela upale crijeva u proučavanju patogeneze UBC seže unatrag gotovo pola stoljeća. Važnost animalnih modela bolesti je prepoznata te je stoga zabilježen ubrzani razvoj pokusnih modela. Obzirom na način razvoja upalnog procesa razlikuje se nekoliko modela, spontani, potaknuti nakon aplikacije kemijskog agensa (npr. intrarektalna aplikacija octene kiseline), izazvan genetskom manipulacijom (npr. delecije određenih gena) i prijenosom imunskih stanica iz jednog soja u drugi. Dosadašnja iskustva govore nam da ne postoji model na kojem se mogu proučavati svi aspekti etiopatogeneze UBC te da odabir modela za istraživanje ovisi o vrsti istraživanja. Upoznavanje animalnih

modela i kompleksa upalnih medijatora služi kao putokaz za razvoj novih fundamentalnih terapijskih strategija (36, 37).

#### **1.7.6.1. Pokusni model DSS kolitisa**

Natrijev dekstran sulfat (DSS) sulfatirani je polisaharid s vrlo promjenjivom molekularnom masom, u rasponu od 5 kDa do 1400 kDa. Široko je prihvaćeno da je DSS toksičan za epitelne stanice debelog crijeva i uzrokuje oštećenja epitelne barijere, pri čemu se povećava propusnost sluznice kolona te dopušta propuštanje velikih molekula, kao što su DSS.

Brojne studije danas koriste DSS pokusni model kolitisa za otkrivanje njegove patogeneze i drugih faktora koje utječu na kolitis. Kolitis je induciran dodatkom DSS-a u vodu za piće. Ovisno o njegovoj koncentraciji, vremenu i učestalosti primjene, životinje mogu razviti akutni ili kronični kolitis, čak i kolitisom inducirane displastične lezije. Miševi pokazuju različitu osjetljivost i reagiranje na DSS inducirani kolitis. Međutim, to ne ovisi samo o DSS-u, odnosno, njegovoj koncentraciji, molekularnoj masi, dužini primjene, proizvođaču i seriji, već ovisi i o genetičkim i mikrobiološkim faktorima miševa (36). Nastup i težina kolitisa može varirati ovisno o navedenim faktorima, čak i stres može biti jedan od njih (38).

Kliničke i patohistološke karakteristike DSS-kolitisa sukladne su onima viđenih kod ljudskog UK. Kliničke manifestacije DSS kolitisa u akutnoj fazi mogu uključivati gubitak težine, proljev, krv u stolici, anemiju i eventualno smrt. Međutim, kliničke manifestacije u kroničnoj fazi kolitisa obično nisu sukladne težini upale niti histološkim obilježjima debelog crijeva (36). Kao i kod ljudskog UK, DDS inducirani kolitis povezan je s regulacijom različitih citokina, kemokina, dušikovog oksida. Već u prvom danu DSS pokusnog modela, dolazi do povećane ekspresije različitih upalnih medijatora (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, and IL-12) (Y. Yan). Njihova proizvodnja postupno se povećava s vremenom. Citokini u DSS modelu kolitisa koreliraju s kliničkim i histološkim parametrima, kao i sa svojstvima crijevne barijere. Različita ekspresija,

ovisno o soju i o fazi kolitisa, pokazuje da ovaj model može biti koristan alat za analiziranje uloge citokina u indukciji upale i oporavak od nje (36).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Ciljevi istraživanja su:

1. Pratiti i usporediti razvoj i intenzitet kolitisa u različitim vremenskim intervalima temeljem lokalnih i sistemski kliničkih, makroskopskih i histoloških parametara u C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševima.
2. Ispitati promjene broja makrofaga na lokalnoj razini, u sluznici debelog crijeva, u akutnoj fazi upale.
3. Ispitati ekspresiju kemokina, MCP-1 i MIP-1 u debelom crijevu tijekom razvoja kolitisa i cijeljenja upalom oštećenog debelog crijeva.

### **3. MATERIЈAL I METODE**

### 3.1. Kemikalije i reagensi

Aceton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ); Kemika

Agaroz - Invitrogen, Life Technologies

Albumin govedeg seruma (BSA); Sigma

Amonij klorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ); Kemika

3-amino-9-etil-karbazol, (AEC kit); BD Pharmigen

Coomasie Brilliant Blue G-250; Acros Organics

Etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA); Kemika

Eozin; Shandon Inc.

Etanol (70%, 90%, 96%, 100%), ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ); Kemika

Etidij-bromid; Sigma

Fosforna kiselina ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 85%, Merck

Hematoksilin; Shandon Inc.

Izopropilni alkohol; Kemika

Kloroform; Kemika

Klorovodična kiselina (HCl) 37%; Kemika

Ksilol ( $\text{C}_8\text{H}_{10}$ ); Kemika

Litijev-klorid; Kemika

Medij za montiranje: Entellan; Merck

Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ); Kemika

Natrij azid ( $\text{NaN}_3$ ); Kemika

Natrijev dekstran-sulfat (DSS); MP Biomedicals

Natrijev hidroksid ( $\text{NaOH}$ ); Kemika

Paraformaldehid (4%); Sigma

Parafin; Shandon Inc.

PBS (fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom); Sigma

SYBER; Applied Biosystems

Tripansko modriilo; Serva

Trypsin; Gibco

TRI<sup>®</sup> Reagent; Invitrogen, Life Technologies

Tris (hidroksimetil)-aminometan ( $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ); Amersham Biosciences

Tris-borat-EDTA (TBE) pufer; Invitrogen, Life Technologies

Tween 20 (polyoxyethylene-sorbitan monolaureat); Amersham Biosciences

Vodikov peroksid (30%),  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Kemika

Voda bez nukleaza; Ambion, Life Technologies

Vodeni medij za montiranje, Aquatex<sup>®</sup>; Merck

### **3.2. Laboratorijske životinje**

U istraživanju su korištene dvije vrste miševa: divlji tip miša soja C57BL/6, te miševi kojima je inaktiviran gen za molekulu CD26 (C57BL/6 Jbom-ob,  $\text{CD26}^{-/-}$ , istog spola i dobi, starosti od 8 do 12 tjedana.  $\text{CD26}^{-/-}$  miševi dobivene su ljubaznošću Dr. Didier Marguet Centre d'Immunologie de Marseille Luminy, Parc Scientifique de Luminy, Marseille Cedex, France. Životinje se uzgajaju u središnjem uzgojnom centru Medicinskog fakulteta u Rijeci.

U prehrani životinja koristi se standardna laboratorijska hrana i voda *ad libitum*, osim 24 sata prije izazivanja kolitisa i žrtvovanja, kada im je hrana uskraćena. Svaka je ispitivana skupina obuhvatila 5-7 miševa.



### 3.3. Pokusni model

Model induciranog kolitisa izazvan je u C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa natrijevim dekstran-sulfatom (DSS, MW 50 kDa) otopljenim u vodi za piće (3%, w/v), koju su miševi uzimali *ad libitum* sedam dana. Kontrolna skupina miševa tijekom sedam dana konzumirala je pitku vodu (39).

Uspostava, razvoj i cijeljenje kolitisa u DSS tretiranih miševa pratio se na lokalnoj i sistemskoj razini uz pomoć više različitih parametara kao direktnih i/ili indirektnih markera upale: dnevno mjerenje tjelesne mase, pregled konzistencije stolice i pojave rektalnog krvarenja, opće stanje životinja te mjerenje mase slezene uzete nakon žrtvovanja. Procjena intenziteta kolitisa u ispitivanim skupinama miševa učinjena je i uz pomoć indeksa aktivnosti bolesti koji je dobiven zbrajanjem bodova prema kriterijima navedenim u Tablici 2. (37, 40). Ukupan zbroj bodova podijeljen je s tri te je dobivena skala od 0 (zdrav) do 4 (maksimalna aktivnost bolesti).

Kako bi se opisale i usporedile promjene nastale tijekom razvoja kolitisa životinje u kojima je izazvan kolitis te kontrolne skupine žrtvovane su u različitim vremenskim razmacima (trećeg, sedmog i petnaestog dana) od početka primjene DSS, poštujući sve etičke principe rada s eksperimentalnim životinjama.

Nakon žrtvovanja izolirano je debelo crijevo kojem je izmjerena dužina (od ileocekalnog spoja do anusa) te je uzorak izvagan i korišten za histološke i imunohistokemijske analize. Dio debelog crijeva zamrznut je u tekućem dušiku i spremljen na -80°C za daljnje analize odnosno određivanje ekspresije kemokina. Također, izolirani su i uzorci slezene koji su izvagani.

Tablica 2. Kriteriji za izračun indeksa aktivnosti bolesti (37, 40).

<b>Bodovi</b>	<b>Gubitak tjelesne mase (%)</b>	<b>Konzistencija stolice</b>	<b>Rektalno krvarenje</b>
0	<5%*	Normalna stolica	Nije prisutno
1	5-10%		
2	10-15%	Mekana stolica (ljepljiva i poluformirana)	Blago krvarenje
3	15-20%		
4	>20	Dijareja (tekuća stolica)	Jako krvarenje

\*Dnevne promjene tjelesne mase u zdravih životinja kreću se u rasponu do 4% te je stoga bodovanje gubitka tjelesne mase uzima u obzir samo gubitak veći od 5%.

### **3.4. Priprema tkivnih rezova debelog crijeva za histološke analize**

Uzorci tkiva debelog crijeva fiksirani su 24 sata u 4%-tnom paraformaldehidu, a zatim se iz tkiva uklonila voda postupnim uranjanjem u otopine etanola rastuće koncentracije, slijedom od 70%, 80%, 96% i na kraju u apsolutni alkohol. Etanol se ne miješa s parafinom pa se nakon postupka dehidracije tkivo uranjalo u ksilol, čime tkivo postaje prozirno (postupak prosvjetljivanja tkiva). Nakon prosvjetljivanja tkiva slijedio je postupak uklapanja u parafin, uranjanjem tkiva u smjese parafina rastuće koncentracije. Postupak se provodio na temperaturi od 50-60 °C kada je parafin u tekućem stanju te se ksilol u tkivu postupno zamijenio parafinom. Hlađenjem je dobiven parafinski blok. Za rutinsko histološko bojanje dobiveni parafinski blokovi tkiva narezani su mikrotomom na parafinske tkivne rezove debljine 2 µm, a zatim adherirana na prethodno silanizirana mikroskopska predmetna stakla.

### **3.4.1. Hematoksilin-eozin bojanje**

Hematoksilin-eozin (HE) bojanje, rutinsko histološko bojanje koristilo se za dobivanje uvida u patohistološke promjene debelog crijeva. Za HE bojanje koristilo se dvije boje, hematoksilin koji kisele strukture u stanici boji plavo (kromatin, jezgra) i eozin koji bazične strukture boji crveno (citoplazma i proteini). Tkivo uklopljeno u parafin (parafinski preparat) prije postupka HE bojanja potrebno je deparafinirati (ukloniti parafin) i rehidrirati (vratiti vodu u tkivo). Uranjanjem preparata u otopinu ksilola uklonio se parafin, a u otopine alkohola padajuće koncentracije (od apsolutnog alkohola do 50% otopine) tkivo se rehidriralo. Nakon toga slijedi ispiranje u destiliranoj vodi i HE bojanje. Preparati su u otopini hematoksilina inkubirani 3 minute, zatim isprani u tekućoj vodi 2 puta po 10 minuta te diferencirani u otopini HCl alkohola 5 sekundi i ponovno ispirani u tekućoj vodi, 2 puta po 10 minuta. Slijedi inkubacija u otopini eozina 5 minuta i ispiranje u destiliranoj vodi, 4 puta po 5 minuta. Obojeni tkivni rezovi su dehidrirani kroz otopine etanola rastuće koncentracije (50%, 70%, 90% te u apsolutnom etanolu) po 1 minutu, a zatim 3 puta po 5 minuta u ksilolu. Stakla s rezovima su potom osušena na zraku, uklopljena u entelan te prekrivena pokrovnim stakalcem. Rezovi su sušeni na sobnoj temperaturi 24 sata te se zatim takav trajni preparat promatrao pod mikroskopom.

### **3.5. Izolacija ukupne RNA**

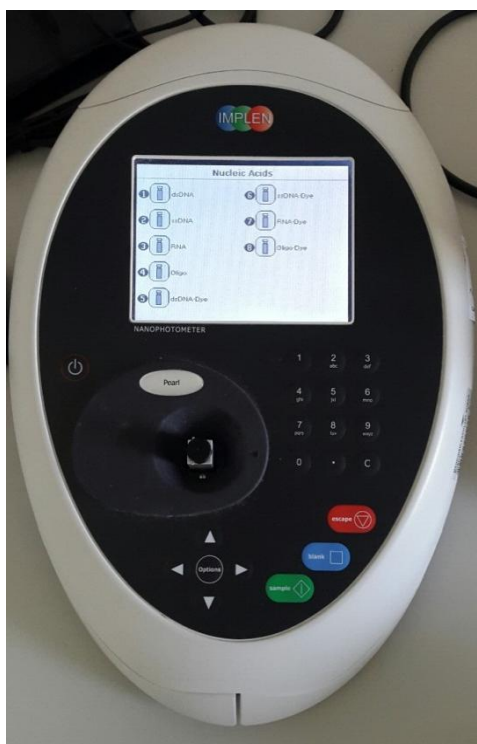
Za izolaciju RNA uzorak debelog crijeva, oko 100 mg, homogeniziran je u TRI®Reagentu u omjeru 100 mg tkiva/1 mL TRI®Reagenta. Homogenat, nakon što je inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi (RT), centrifugirao se 20 minuta na 4 °C. Dobiveni supernatant se odvojio u plastičnu epruvetu te se dodao kloroform u omjeru 200 mL kloroforma/1 ml TRI®Reagenta. Nakon inkubacije u trajanju od 5 minuta na RT, homogenat se centrifugirao 30 minuta (4°C). Nakon centrifugiranja, razdvajaju se tri faze: gornja nebojana vodena faza, središnji bijeli

prsten precipitiranih proteina te donja ružičasta fenol-kloroform faza. Izolirana RNA se nalazi u supernatantu, koji se pipetom prenosi u čistu plastičnu epruvetu i nakon toga dodaje 500  $\mu$ L izopropanola/1 ml TRI®Reagenta. Uzorak se promućka i pusti na RT 5-10 minuta te zatim centrifugira 30 minuta. Nakon centrifugiranja, RNA se istaloži u obliku bijelog taloga. Supernatant se pažljivo odlije te se dodaje 1 mL 75% etanola/1 mL TRI®Reagenta i dobro promućka. Slijedi još jedno centrifugiranje, 30 minuta na 4 °C. Ovaj postupak može se ponoviti kako bi se što bolje uklonila zaostala H<sub>2</sub>O. Nakon centrifugiranja supernatant se odlije, pričekava se da se uzorak osuši te nakon toga dodaje voda bez nukleaza i zagrijava na 55 °C (10-15 min) da se izolirana RNA otopi. Uzorak se zatim alikvotira za daljnje analize.

### **3.6. Određivanje koncentracije, čistoće i integriteta izdvojene RNA**

Koncentracija (ng/ $\mu$ L) i čistoća ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) izolirane RNA u uzorku izmjerena je na nanospektrofotometru BioSpec-nano (Shimadzu Biotech) (Slika 2) nanošenjem 2  $\mu$ L uzorka izolirane ukupne RNA.

Za RNA se uvijek mjeri i ekstinkcija na 280 nm, koja označuje zagađenje proteinima. Omjer O.D.260/O.D.280 veći od 1,8 upućuje da je izolirana RNA čista. U uzorcima kod kojih omjer nije bio unutar očekivanih vrijednosti ili ako je zaostao DSS provedeno je pročišćavanje s litijevim-kloridom (41).



**Slika 2. Implen NanoPhotometer™ Pearl**

Cjelovitost RNA provjerena je vodoravnom elektroforezom na 0,9%tnom agaroznom gelu. Agarozni gel se priprema na način da se 0,9 g agaroze otopi u 100 mL 1 x TBE pufera. Kako bi se agarozna u potpunosti otopila prethodno pripremljena suspenzija agaroze se zagrijala u mikrovalnoj pećnici do vrenja, a potom hladila (do 50 °C) uz blago miješanje. Ohlađena agarozna otopina se zatim ulila u pripremljenu kadnicu za polimeriziranje gela (sobna temperatura, 40 min.) te je umetnut češljčić kako bi se u gelu formirale jažice. Uzorak RNA za elektroforezu pripremljen je na način 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 se gel skrutne izvade se češljčići i gel se smjesti u kadnicu za elektroforezu u koju se zatim ulije 1x TBE pufer, gel mora biti u potpunosti prekriven s puferom. Neposredno prije nanošenja uzoraka u jažicu, prethodno pripremljenom uzorku RNA dodaje se pufer za nanošenje uzoraka na gel.

Elektroforeze se provela pri konstantnim naponu, 80 V, tijekom 60 minuta. Elektroforezom se RNA razdvojila na dvije vrpce, 28S i 16S ribosomsku RNA u omjeru 2:1, koje se vizualizirala na UV transiluminatoru i dokumentirala fotografiranjem (Image Master, Amersham Pharmacia Biotech).

### 3.7. Sinteza komplementarne DNA

Za reakciju sinteze komplementarne DNA (cDNA), odnosno, reverzne transkripcije korišten je komercijalno dostupni kit za reverznu transkripciju (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems). Reakcijska smjesa je sadržavala 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 MultiScribe RT (reverzna transkriptaza; 50 U/µL), 1 µL inhibitora RNaza te 3,2 µL H<sub>2</sub>O bez nukleaza. Sama reakcija provodila se prema uputama proizvođača u uređaju 7300 RT-PCR System (Applied Biosystems) uz uvjete navedene u Tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti odvijanja reakcije reverzne transkripcije.

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

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

Ekspresija ciljnih gena MCP-1 i MIP-1 u transkriptima mRNA u uzorcima crijeva kontrolnih miševa i miševa u kojih je induciran kolitis određena je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR, prema engl. *real-time polymerase chain reaction*). Pri tome su korištene komercijalno dostupne predizajnirane početnice i probe za mišji MCP-1 i MIP-1 (Tablica 4). Kao referentni gen za normalizaciju uzorka koristio se  $\beta$ -aktin. Prije primjene početnice su otopljene u deioniziranoj vodi, s ciljem dobivanja "stock" otopine koncentracije 100  $\mu$ M, koja se čuva na -20 °C. Kao radnu otopinu koristila se smjesa obje početnice (10XPM), u kojoj je koncentracija svake početnice 2  $\mu$ M.

Tablica 4. Početnice za mišji MCP-1 i MIP-1.

Gen	Slijed nukleotida u početnici (5'→3')	
	uzvodna početnica	nizvodna početnica
MCP-1	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA	GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
MIP -1 $\alpha$	CATATGGAGCTGACACCCCG	GTCAGGAAAATGACACCTGGC
$\beta$ -aktin	GATCTGGCACCCACCTTCT	CCATCACAATGCCTGTGGTA

Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 25  $\mu$ L, a sadržavao je 5  $\mu$ L pripremljene cDNA, 20  $\mu$ L reagensa SYBER i 2  $\mu$ L odgovarajućih početnica i proba. Reakcija se odvijala u uređaju 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Uvjeti reakcije prikazani su u tablici 5. Rezultati su analizirani u programu 7300 System Software (Applied Biosystems). Za određivanje relativne ekspresije mRNA korištena je komparativna  $C_t$  metoda, gdje  $C_t$  (engl. *threshold cycle*) označava ciklus pri kojem količina umnoženog PCR produkta dosegne određeni prag.

Ekspresija ciljnih gena izražavana je kao  $\Delta C_t$  vrijednost (razlika ciljnog i referentnog gena). Promjena transkripcijske ekspresije izražavana je kao relativna ekspresija (engl. *fold change*) u odnosu na kontrolni uzorak prema formuli  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  gdje je  $\Delta\Delta C_t$  razlika  $\Delta C_t$  vrijednosti promatranog i kontrolnog uzorka.

Tablica 5. Uvjeti odvijanja lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.

	Predinkubacija	Aktivacija polimeraze	40 ciklusa PCR	
			denaturacija	sparivanje
Temperatura (°C)	50	95	95	60
Vrijeme	2 min	10 min	15 s	1 min

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

### 3.9. Etički aspekt istraživanja na eksperimentalnim životinjama

Predloženo istraživanje na pokusnim životinjama provedeno je u skladu s važećim Zakonskim propisom (NN19/99), te Pravilnikom (NN176/04), uz poštivanje temeljnih etičkih i znanstvenih principa o provođenju pokusa na životinjama, a u skladu s načelima 3R (1. nadomještanje životinja - Replacement, 2. smanjenje broja životinja Reduction i 3. oplemenjivanje postupaka - Refinement). Budući da se predloženo istraživanje provedeno u sklopu znanstvenoistraživačkog projekta „Uloga dipeptidil-petidaze IV (CD26/DPP IV) u kroničnim bolestima“ odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Rijeci.



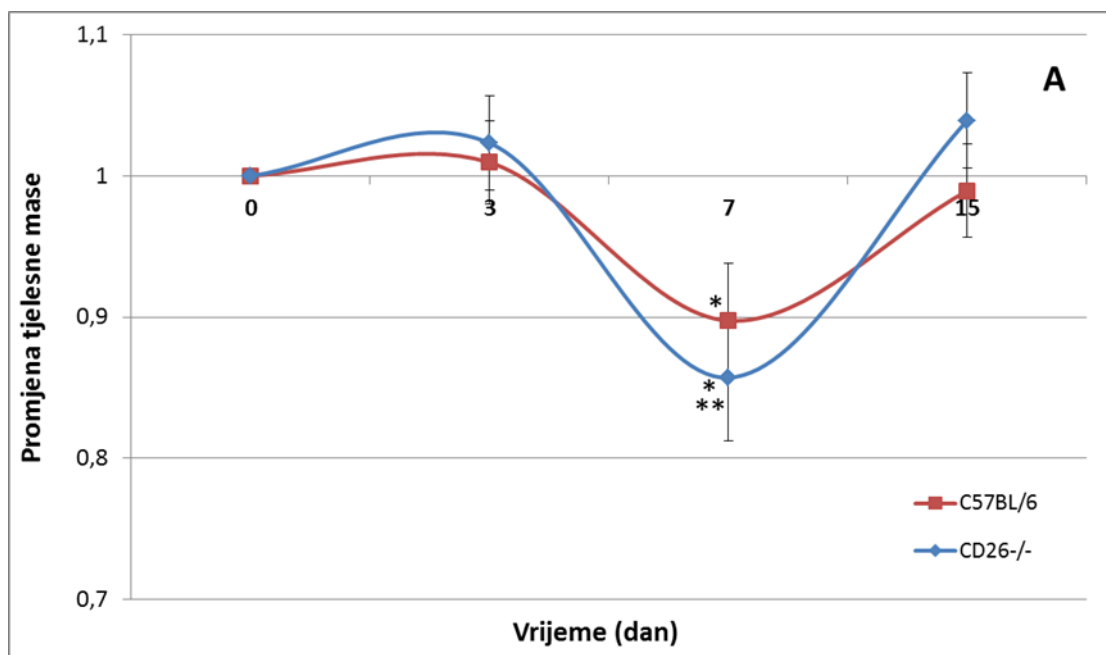
### **3.10. Statistička obrada podataka**

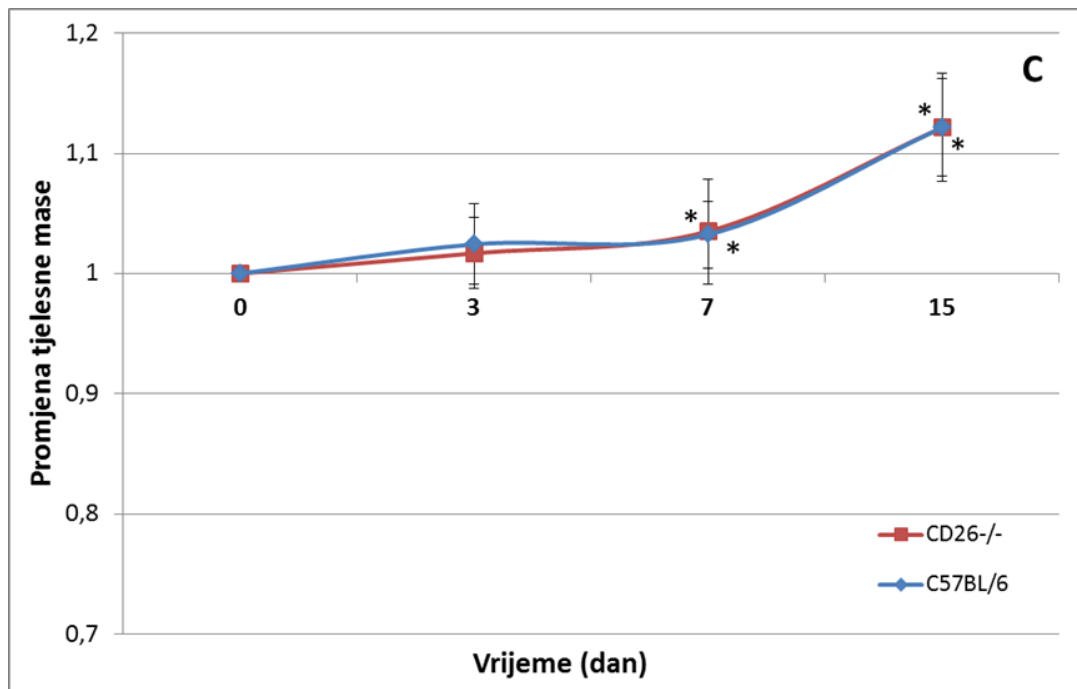
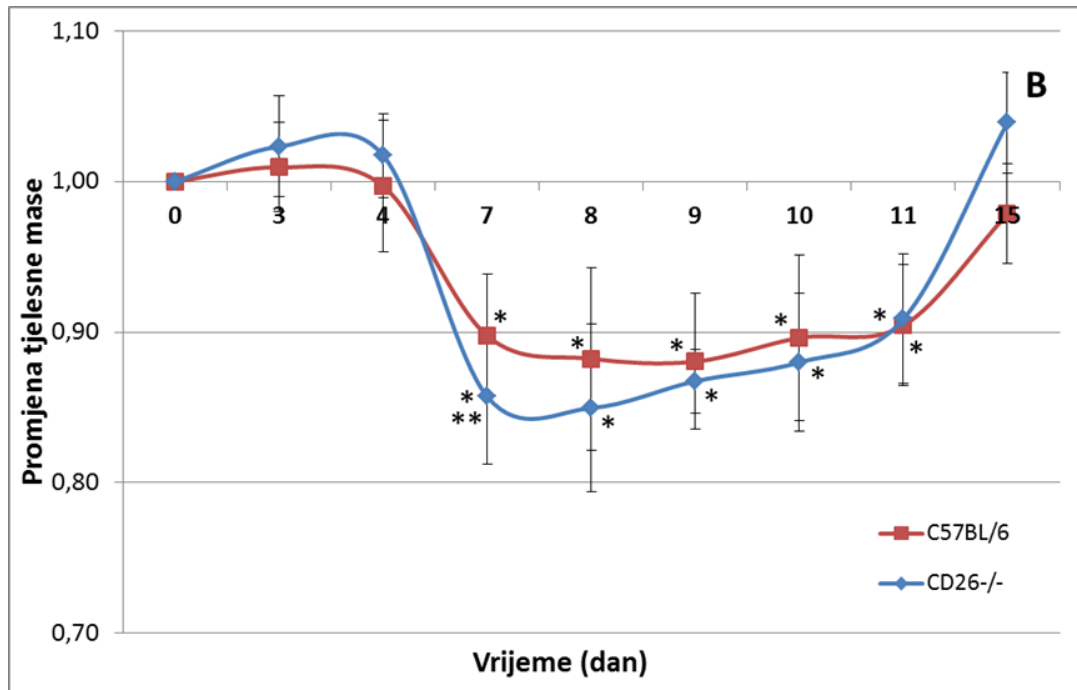
Prikupljeni podaci pohranjeni su u bazu podataka koristeći program Microsoft Excell. Statistička obrada rezultata učinjena je korištenjem programskog paketa STATISTICA 10 (StatSoft Inc.; Tulsa, OK 74104, SAD). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost za pojedinu grupu. Razlike između grupa testirane 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. Klinički pokazatelji razvoja kolitisa

Tijekom razvoja upale u debelom crijevu tretiranih životinja obaju sojeva zamijećene su promjene kako na lokalnoj tako i sistemskej razini. Kolitis se kod pokusnih životinja oba soja manifestirao promjenom: kliničkog stanja, tjelesne mase, konzistencije stolice u kojoj je bilo moguće vidjeti krv u tragovima te pojavom opsežnog rektalnog krvarenja. Navedeni simptomi bolesti su se postepeno pojavljivali, a najintenzivniji su bili sedmog do devetog dana od primjene otopine DSS. U obje ispitivane skupine zabilježen je pad tjelesne mase (Slika 3A). Gubitak tjelesne mase u obje ispitivane skupine miševa započinje četvrtog dana, doseže maksimalni pad osmog dana, a od devetog dana tjelesna masa počinje polako rasti te početnu vrijednost doseže petnaestog dana (Slika 3B). Maksimalni pad tjelesne mase u odnosu na početnu vrijednost u C57BL/6 miševa iznosi oko 10%, a u skupini CD26<sup>-/-</sup> miševa, oko 13%. Usporedbom gubitka tjelesne mase u određenom vremenskom periodu između ispitivanih sojeva miševa vidljiv je nešto intenzivniji pad mase u CD26<sup>-/-</sup> u akutnoj fazi kolitisa. Tijekom oporavka CD26<sup>-/-</sup> miševi nešto brže nadoknađuju izgublenu tjelesnu masu (Slika 3B).





**Slika 3. Promjene tjelesne mase tijekom razvoja kolitisa i cijeljenja upalno promijenjene sluznice debelog crijeva tretiranih životinja (A i B) i kontrolnim skupinama (C).**

Promjena tjelesna mase izračunata je i izražena kao omjer početne tjelesne mase i mase određenog dana pokusa. 0, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 15, dani pokusnog perioda. \*, značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu. \*\*, značajna razlika između C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa žrtvovanih u istim vremenskim intervalima,  $P < 0,05$ .

Razvojem kolitisa mijenja se postepeno i konzistencije stolice i to od mekane koja se pojavljivala petog ili šestog dana pokusnog perioda, do vodenaste stolice koja je bila prisutna u svih životinja od sedmog dana do devetog ili desetog dana, ovisno o intenzitetu upale. Prisustvo krvi u stolici, odnosno promjena boje stolice iz svjetlo smeđe u tamno smeđu, uočeno je šestog dana pokusnog perioda, a u ponekad već i petog dana. Rektalno krvarenje bilo je prisutno sedmog dana pokusnog perioda u svim tretiranim životinjama te se postepeno smanjivalo do devetog dana pokusnog perioda kada se u potpunosti izgubilo. Sve kliničke promjene postepeno se smanjuju te su se do petnaestog dana pokusnog perioda u potpunosti izgubile.



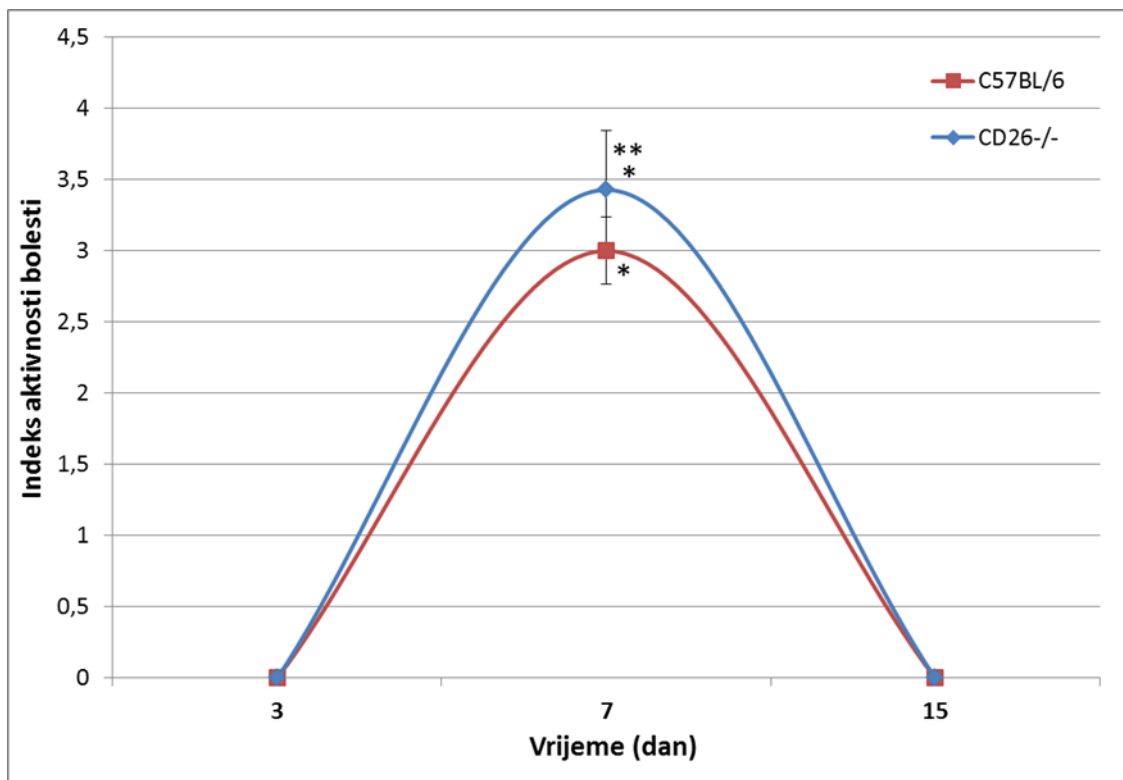
**Slika 4. Rektalno krvarenje u akutnoj fazi upale**

Obzirom na prethodno opisanu dinamiku razvoja kolitisa i intenzitet simptoma period od 3. do 6. dana pokusnog perioda razmatra se kao razdoblje razvoja kolitisa, period od 7. do 8. dana smatra se akutnom fazom bolesti, dok je razdoblje od 9. do 15. dana razdoblje oporavka odnosno cijeljenja upalno promijenjene sluznice.

U kontrolnoj skupini C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> životinja koje su tijekom pokusa konzumirale vodu gubitak tjelesne mase, promjene konzistencije stolice ili rektalno krvarenja nije zapaženo (Slika 3C).

#### 4.1.1 Indeks aktivnosti bolesti

U skupinama C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> životinja koje su tijekom sedam dana konzumirale 3% otopinu DSS Za svaku ispitivanu skupinu životinja učinjena je procjena intenziteta promjena nastale uslijed razvoja kolitisa odnosno upale temeljem izračuna indeksa aktivnosti bolesti u različitim vremenskim intervalima, a prema parametrima definiranim u Tablici 2. Dobivene vrijednosti grafički su prikazane na slici 5. Uspostavom i razvojem kolitisa indeks aktivnosti bolesti oba soja miševa raste, ali je u usporedbi s C57BL/6 miševima porast nešto veći u CD26<sup>-/-</sup> miševa (Slika 5.) Promjene indeksa aktivnosti bolesti u skladu je s promjenom kliničkog stanja životinja.



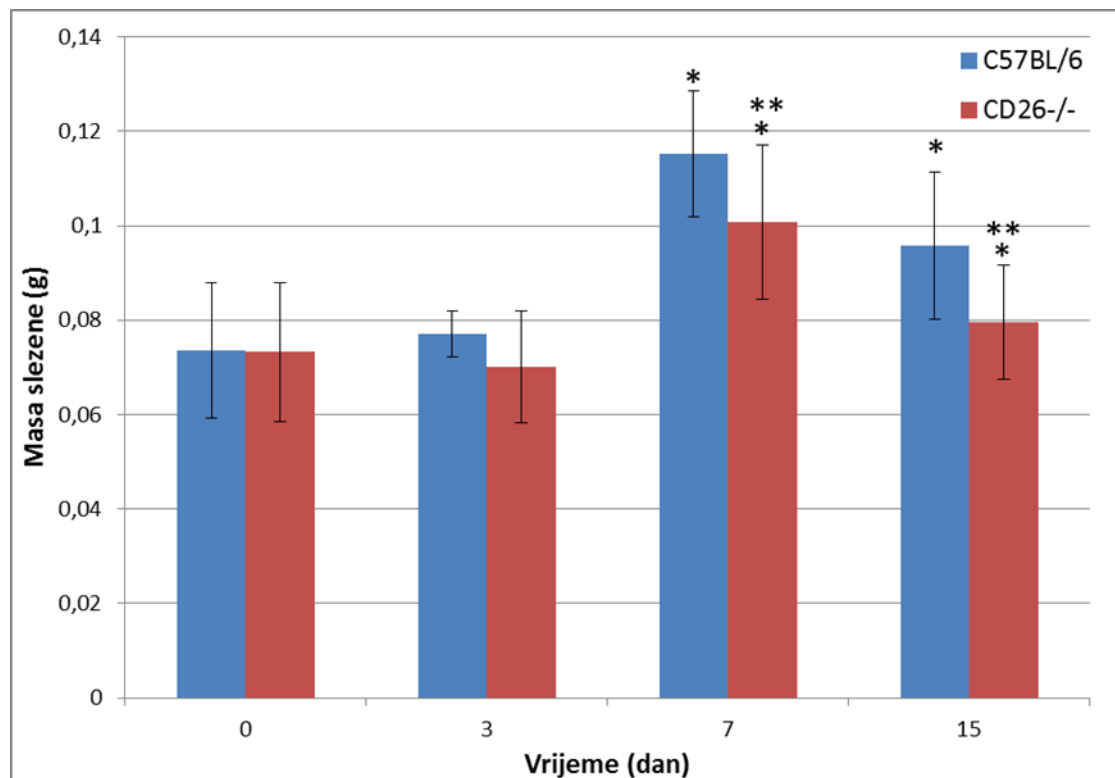
Slika 5. Indeks aktivnosti bolesti.

3, 7, 15, dani žrtvovanja. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (n=6).

\*, značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu. \*\*, značajna razlika između C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa žrtvovanih u istim vremenskim intervalima,  $P < 0,05$ .

#### 4.1.2. Promjene mase slezene tijekom razvoja kolitisa i cijeljenja upalno promijenjene sluznice crijeva

Tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa utvrđene su značajne promjene mase slezene u odnosu na kontrolnu skupinu te između C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa žrtvovanih u istim vremenskim intervalima (Slika 6.).



Slika 6. Promjene mase slezene tijekom razvoja i rezolucije kolitisa u C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševima.

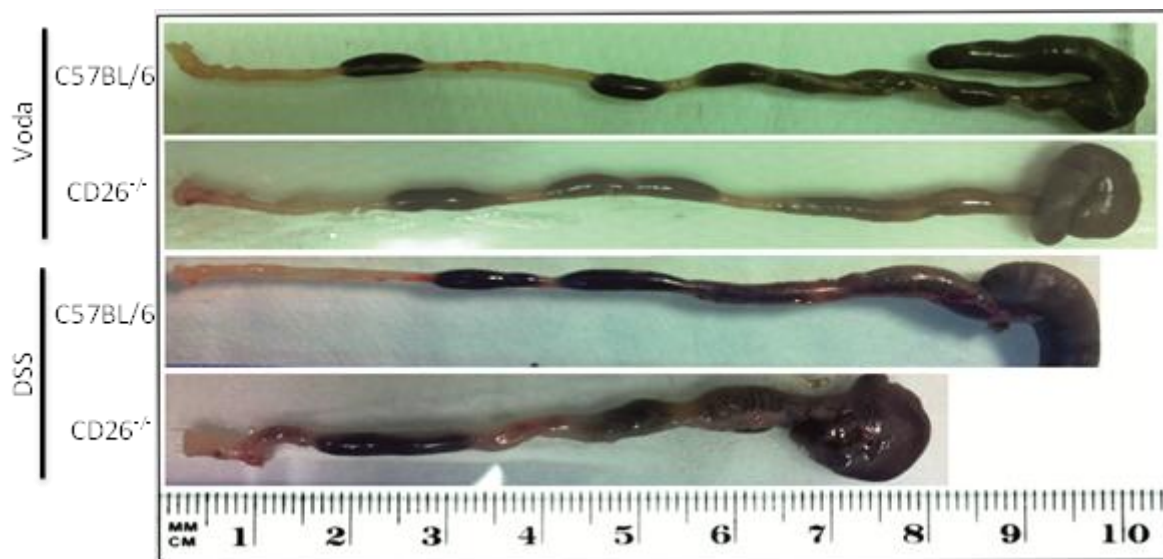
0, 3, 7, 15, dani žrtvovanja. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ( $n=6$ ).

\*, značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu \*\*, značajna razlika između C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa žrtvovanih u istim vremenskim intervalima,  $P < 0,05$ .

Unatoč činjenici da tretirane životinje gube na ukupnoj tjelesnoj masi, razvojem kolitisa zabilježen je porast mase slezene. U obje ispitivane skupine životinja u odnosu na kontrolnu skupinu maksimalni porast mase slezene opažen je sedmog dana pokusa. Masa je potom počela lagano opadati te se normalizirala na kraju pokusnog razdoblja. Promjena mase značajno je veća u C57BL/6 miševa 7 i 15 dana u odnosu na iste ispitivane skupine CD26<sup>-/-</sup> miševa.

#### 4.2. Makroskopske promjene debelog crijeva

Makroskopske promjene završnog dijela crijeva također su bile najizraženije u akutnoj fazi upale pokusnog perioda, a manifestirale su se kao skraćenje i zadebljanje debelog crijeva (Slika 7).



Slika 7. Makroskopske promjene debelog crijeva u akutnoj fazi upale

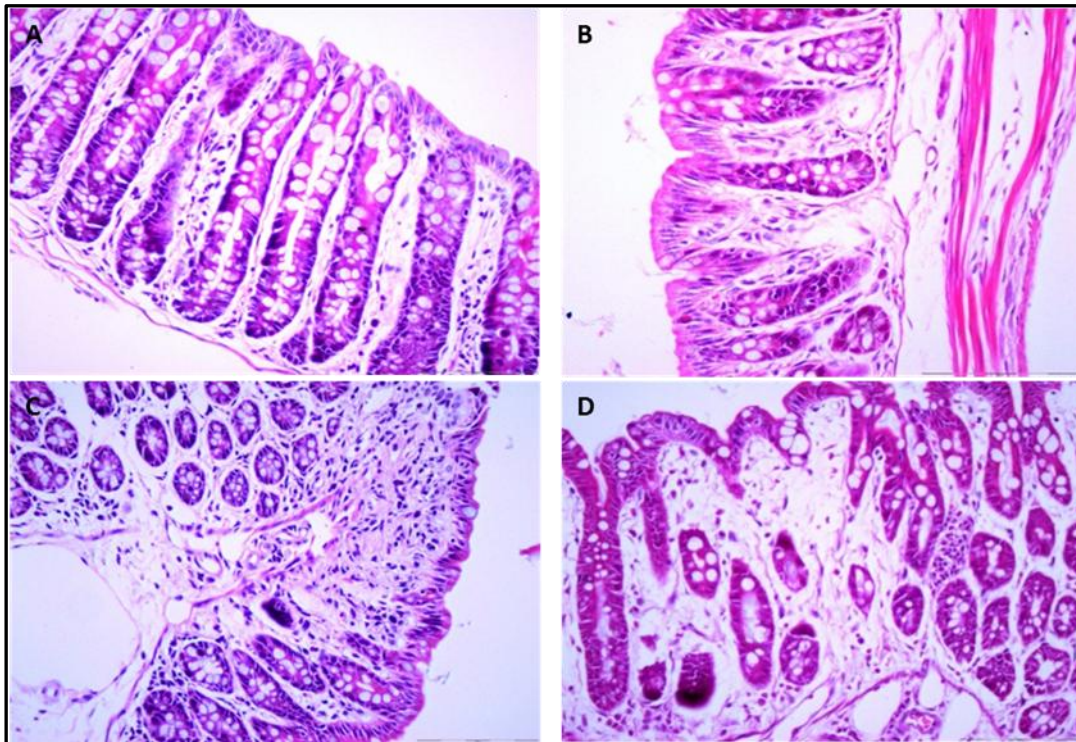


### **4.3. Patohistološke promjene sluznice debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa i cijeljenja upalnih promjena**

Patohistološkom analizom sluznice debelog crijeva utvrđeno je da primjena 3% otopine DSS kroz sedam dana dovodi do razvoja epitelnog oštećenja, ulceracija, promjene broja kripti u obje ispitivane skupine miševa, a koje nisu vidljive u kontrolnim skupinama. Upalni proces ograničen je na kolon, s vidljivim područjima krvarenja i ulceracijama. Upala uglavnom zahvaća mukoza i u pojedinim dijelovima se širi u dublje slojeve, submukoza i lamina muskularis mukoze. Površinske ulceracije, edem, distorzija kripti i abscesi u kombinaciji s infiltracijom mukoze i submukoze upalnim stanicama glavne su osobine prisutnog upalnog procesa.

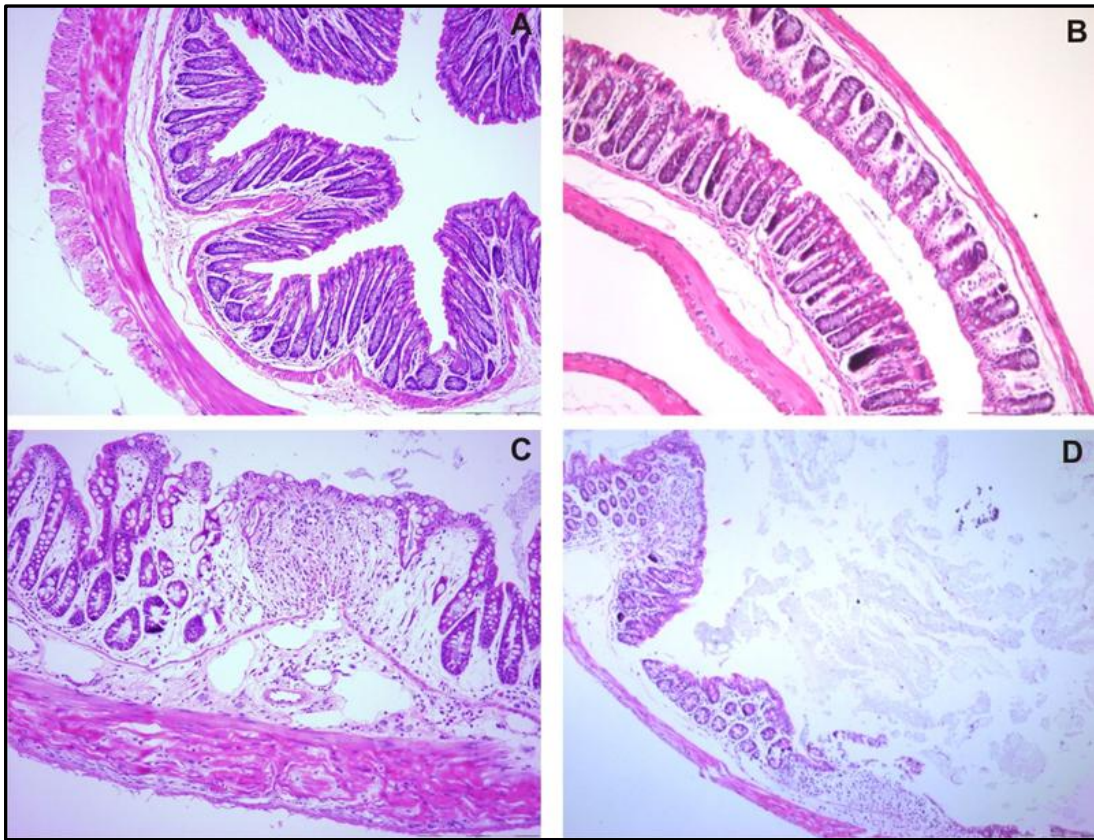
U ranoj fazi razvoja kolitisa odnosno 3. dana pokusnog perioda pojavljuju se prve promjene u lamini propriji sluznice debelog crijeva. Okarakterizirane su pojavnom upalnih stanica uz edem što rezultira smanjenjem broja kripti na milimetar sluznice (Slika 8B). Upalni proces se zatim postepeno širi na dublje slojeve, odnosno, mukoza i submukoza, a često je zahvaćena i *tunica muscularis*. U akutnoj fazi (7. dan) prisutan je intenzivni stanični upalni odgovor te površne erozije sluznice debelog crijeva u kombinaciji s edemom, hemoragijom i infiltracije polimorfonuklearnim leukocitima (Slika 8C). Ovisno o intenzitetu upale na sluznici kolona mogu se uočiti i područja potpuno bez kripti s jakim upalnim infiltratom. Upala je okarakterizirana transmuralnom infiltracijom s fokalnom nekrozom, infiltracijom neutrofilima, fibrozom i zadebljanjem stijenke. Jako izraženi limfni čvorići i difuzni infiltrati limfocita nalaze se u lamini propriji, ali i u podsluznici uz oštećenje lamine muskularis mukoze.

Patohistološke promjene smanjuju se tijekom cijeljenja kolitisa, odnosno, u periodu od 10. do 15. dana. Histološke promjene u kolonu pokazuju povlačenje akutnog upalnog odgovora i prisustvo određene količine kroničnog upalnog infiltrata u mukozi i submukozi. Javlja se i fibrozno cijeljenje oštećenja uz postupno povećanje broja i veličine kripti na fiziološku veličinu (Slika 8D).



**Slika 8. Patohistološke promjene sluznice debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa i cijeljenja upalno promijenjene sluznice u C57BL/6 miševa**

Normalna sluznica debelog crijeva (A); 3. dan razvoja kolitisa, edem i infiltracija upalnim stanicama (B) akutna faza upale, 7. dan, oštećenje epitela, atrofija crijevne resice uz krvarenje, (C); nakupina limfatičnog tkiva u lamini proprijji, 14. dan (D). Parafinski preparati, obojani HE metodom, povećanje 40X.



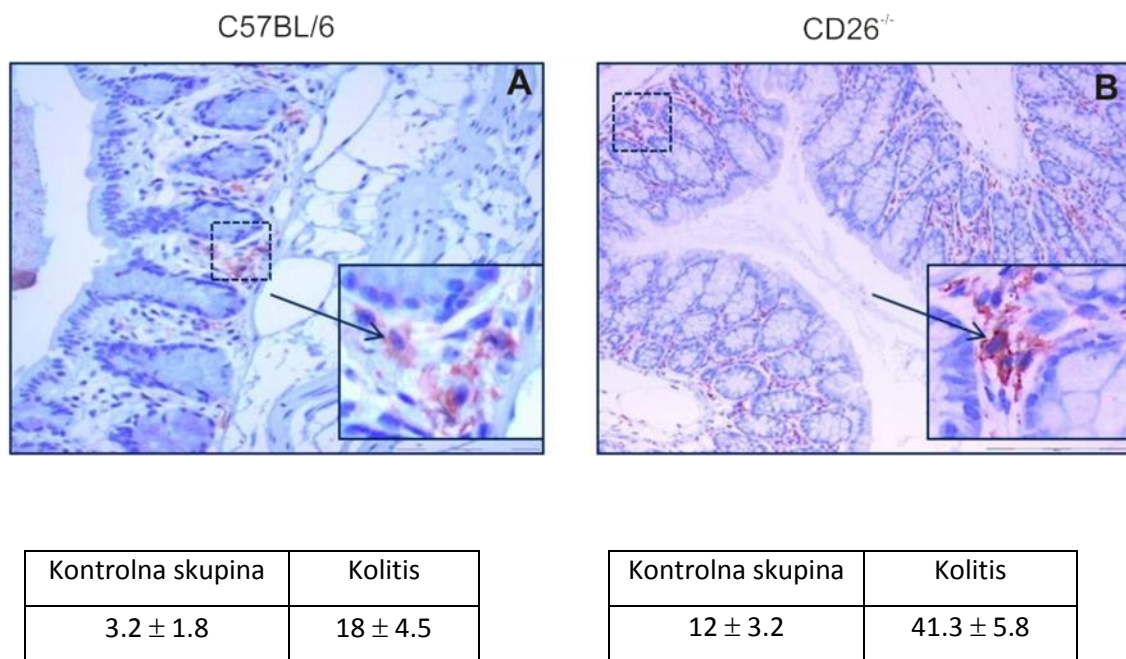
**Slika 9. Patohistološke promjene sluznice debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa i cijeljenja upalno promijenjene sluznice u CD26<sup>-/-</sup> miševa**

Normalna sluznica debelog crijeva (A); rana faza razvoja upale, 3. dan, edem s infiltracijom upalnih stanica između kripti debelog crijeva (B) akutna faza bolesti, oštećenje epitela uz snažno krvarenje, 7. dan (C); stvaranje novih kripti, fibroza nakupina limfatičnog tkiva u lamini propriji, 15. dan (D).

Parafinski preparati, obojani HE metodom, povećanje 20X.

#### 4.4. Imunohistokemijska analiza sluznice debelog crijeva u akutnoj fazi upale

U fiziološkim uvjetima, analizom tkivnih rezova debelog crijeva utvrđeno je da CD26<sup>-/-</sup> miševi imaju značajno veći broj makrofaga u odnosu na C57BL/6 miševе (Slika 9.). Porast broja upalnih stanica prati patohistološke promjene te je izraženiji u manje oštećenim dijelovima sluznice.



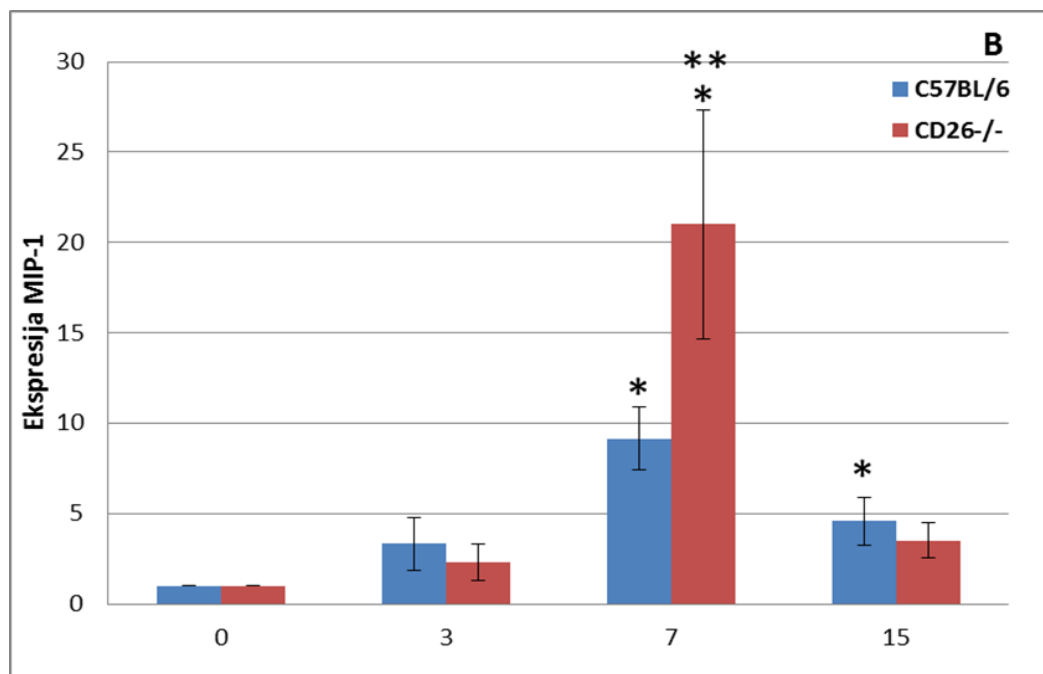
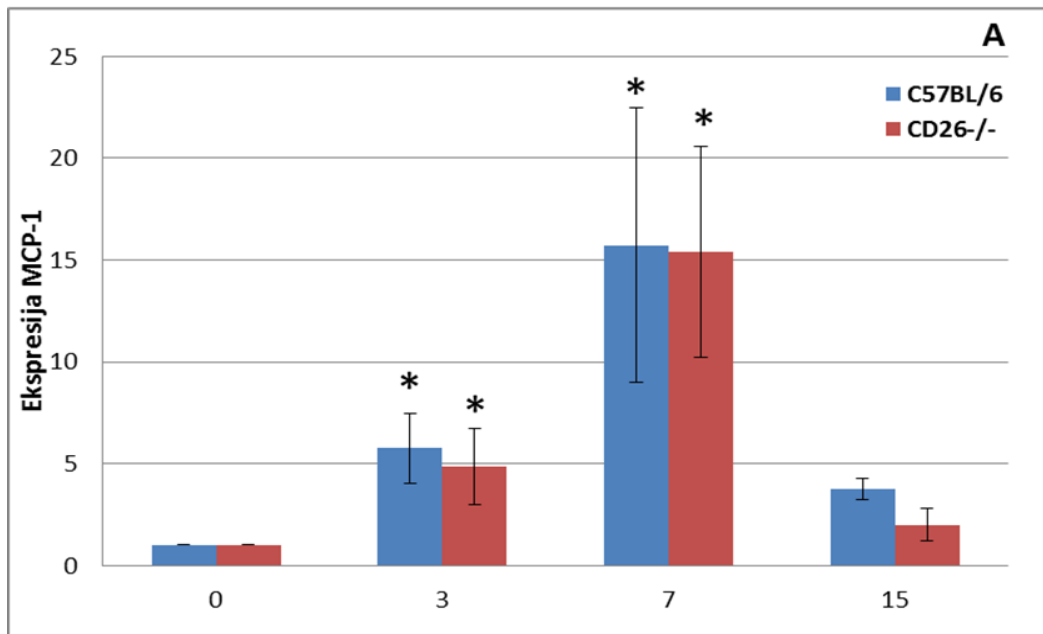
**Slika 10. Distribucija i broj makrofaga u sluznici debelog crijeva u akutnoj fazi kolitisa C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa**

Izražaj makrofaga utvrđen je imunohistokemijskim bojanjem parafinskih tkivnih rezova sluznice debelog crijeva s F4/80 protutijelima. Brojčane vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Broj stanica određen je kao srednja vrijednost izbrojenih stanica u 10 vidnih polja površine 400 μm<sup>2</sup>. \*, značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu. \*\*, značajna razlika između C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa žrtvovanih u istim vremenskim intervalima, P < 0,05.

U dubljim slojevima sluznice odnosno u području dna kripti zabilježen je porast makrofaga. Iako kao rezultat razvoja upale dolazi do značajnog porasta broja makrofaga ( $P < 0.05$ ) u oba soja miševa, u CD26<sup>-/-</sup> miševa porast je dvostruko veći nego u C57BL/6 miševa ( $18.0 \pm 4.5$  versus  $41.3 \pm 5.8$ ).

#### **4.5. Analiza genske ekspresija kemokina tijekom razvoja DSS kolitisa i cijeljnja upalnih promjena u debelom crijevu**

Transkripcijska ekspresija MCP-1 i MIP-1 kemokina određena je u upalno promijenjenom debelom crijevu te je potom uspoređena s transkripcijskom ekspresijom ovih kemokina u zdravim uzorcima debelog crijeva kontrolnih C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa. U oba soja miševa razvojem kolitisa odnosno upalnog procesa raste i ekspresija kemokina. Maksimalni porast MCP-1 je zabilježen u akutnoj fazi upale odnosno 7. dana pokusnog perioda (slika 11A). Porast ekspresije MCP-1 u debelom crijevu C57BL/6 miševa u akutnoj fazi upale podjednaka je ekspresiji u CD26<sup>-/-</sup> miševa. Ekspresija MIP-1 također je najveća u akutnoj fazi upale ali za razliku od MCP-1 ekspresija MIP-1 mRNA je značajno veća u debelom crijevu CD26<sup>-/-</sup> miševa.



**Slika 11. Analiza genske ekspresije monocitnog kemotaktičnog proteina (MCP)-1 (A) i makrofagnog upalnog proteina (MIP)- 1 (B) u debelom crijevu tijekom razvoja i rezolucije upale.**

Rezultati prikazuju relativnu ekspresija u odnosu na onu u kontrolnim uzorcima, bez tretmana; te su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  SD triplikata. 0, 3, 7, 15, dani žrtvovanja. \*, značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu \*\*, značajna razlika između C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa žrtvovanih u istim vremenskim intervalima,  $P < 0,05$ .

## **5. RASPRAVA**

Upalne bolesti crijeva su kronični poremećaji kompleksne etiologije praćene upalom u gastrointestinalnom sustavu. Predstavljaju ozbiljan medicinski i javnozdravstveni problem kako zbog porasta incidencije tako zbog razvoja teške kliničke slike koja utječe na radnu sposobnost i kvalitetu života (42). U ovisnosti o lokalizaciji i stupnju zahvaćenosti probavne cijevi odnosno kliničkoj slici i pojavi komplikacija razlikuju se dva klinička, patomorfološka oblika, UK i CB (30). Dosadašnja istraživanja ukazuju da oba oblika nastaju kao rezultat narušavanja ravnoteže između imunotolerancije i obrambenog odgovora, a obzirom na lokalizaciju UK zahvaća isključivo debelo crijevo i rektum, dok CB može zahvatiti bilo koji dio probavnog trakta. Etiopatogeneze ovih bolesti još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (32).

Ekperimentalno inducirani modeli kolitisa jesu vrlo koristan način za proučavanje i razjašnjavanje etiopatogeneze UK. Jedan od modela koji svojim imunskim i histopatološkim aspektima najviše nalikuje akutnoj upali u UK je kemijski inducirani model kolitisa izazvan peroralnom primjenom otopine DSS. Također, posljednjih godina veliki doprinos na području razjašnjavanja mehanizama razvoja kolitisa omogućilo je i miševa s inaktiviranim genima za pojedine čimbenike imunološkog odgovora (36, 37).

Utvrđene kliničke promjene na lokalnoj i sistemske razini potvrđuju da se u obje skupine miševa koje su tijekom pokusnog perioda konzumirale otopinu DSS došlo do razvoja oštećenja sluznice crijeva odnosno kolitisa koji se očitovao kliničkim, histološkim, imunološkim i promjenama na razini gena. Rezultati potvrđuju prethodno pokazanu dinamiku razvoja eksperimentalnog modela kolitisa koja se sastoji od tri faze ili razdoblja, razvoja kolitisa, akutna faza i rezoluciju (36).

Temeljem utvrđenih promjena lokalnih i sistemskih, direktnih i indirektnih, kliničkih pokazatelja te izračuna indeksa aktivnosti bolesti može se zaključiti da je intenzitet upale u akutnoj fazi bolesti bio nešto veći u CD26<sup>-/-</sup> miševa. Međutim, u razdoblju razvoja bolesti te



tijekom oporavka CD26<sup>-/-</sup> miševi na sistemskoj razini pokazuju veću otpornost odnosno brže ulaze u fazu oporavka tj. brže nadoknađuju izgublenu tjelesnu masu. Na lokalnoj razini, u debelom crijevu značajne razlike makroskopskih i patohistoloških promjena nisu uočene.

Postojeći literaturni podaci ukazuju da je uz genetsku predispoziciju, imunološki odgovor ključan u patogenezi UBC odnosno UK i da pokazuje značajke autoimune reakcije na neke antigene gastrointestinalne mikroflore (31). Pokazano je da upalni proces nastaje kao rezultat aktivacije različitih upalnih stanica te povećane ekspresije proinflamatornih citokina, kemokina i adhezijskih molekula uključujući TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ . Navedene promjene narušavaju ravnotežu između pro- i protu- upalnih citokina te je konačni rezultat razvoj upale odnosno jednog od dva patomorfološka oblika UBC (35).

Dosadašnja istraživanja UBC pokazala su da peptidaze stanične površine epitelnih stanica sluznice imaju važnu ulogu u razgradnji medijatora uključenih u nastanak upalnih promjena i održavanje integriteta sluznice. Jedna od njih je i DPP IV/CD26. Ova je molekula izražena na površini epitelnih stanica velikog broja organa, uključujući organe probavnog sustava, na kapilarnim endotelnim stanicama bubrega te na nekim parenhimskim stanicama kao što su hepatociti. U prilog uključenosti DPP IV/CD26 u imunosne i upalne procese govori ekspresija ove molekule na leukocitima kao i povišena ekspresija DPPIV/CD26 u aktiviranim limfocitima (13). Pokazano je da izražaj molekule DPP IV/CD26 na T pomoćničkim stanicama definira Th1/Th2 odgovor te na taj način utječe na produkciju citokina i modulaciju imunološkog odgovora. Visok izražaj molekule CD26 pronađen je na Th0 i Th1 stanicama, dok je kod Th2 stanica izražaj ove molekule puno niži. Kako je većina dosadašnjih istraživanja bila usmjerena na ulogu DPP IV/CD26 u proliferaciji i aktivaciji limfocita (13, 43, 44) u ovom radu ispitan je utjecaj nedostatka DPP IV/CD26 na stanice makrofagnog porijekla.

Makrofagi su velika populacija fagocita koji imaju važnu ulogu u prepoznavanju bakterija i usmjeravanju imunološkog odgovora. Osim toga, novija istraživanja ukazuju da makrofagi imaju i važnu ulogu u održavanju homeostaze tkiva na način da lučenjem različitih medijatora sprječavaju da se upalni proces razbukta ili mogu sudjelovati u popravku oštećenog tkiva (45). Posebno se njihova uloga ispituje u probavnom sustavu gdje je za homeostazu sluznice izrazito značajna za očuvanje integriteta odnosno intaktnosti sluznice crijeva. Upravo je infiltracija upalnih stanica u sluznicu debelog crijeva tijekom razvoja upalnog procesa odnosno kolitisa ključan čimbenik koji utječe na razvoj i intenzitet oštećenja tkiva, a time i na stupanj disfunkcije gastrointestinalnog sustava, kako u čovjeka tako i u animalnim modelima bolesti. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da tijekom primjene otopine DSS dolazi do porasta broja, odnosno, kemotaksije makrofaga u sluznicu debelog crijeva. Rezultati su u skladu s kliničkim studijama koje su pokazale povećanu nakupljanje makrofaga u sluznici debelog crijeva kod bolesnika kojima je dijagnosticiran UK (21). Nadalje, Qualls i sur. svojim su istraživanjima također ukazali na važnost makrofaga u razvoju kolitisa pokazavši da inaktivacija makrofaga i dendritičkih stanica dovodi do povećanja intenziteta upale odnosno oštećenja sluznice (46). Točan mehanizam tih promjena nisu utvrdili, ali pretpostavljaju da je to rezultat pojačanog nakupljanja drugih upalnih stanica, prvenstveno neutrofila. S druge strane istraživanja (47). su pokazala da primjena DPP IV/CD26 inhibitora rezultira smanjenom produkcijom proinflammatory medijatora te da CD26<sup>-/-</sup> miševi s kolitisom imaju smanjenu aktivnost neutrofila u sluznici. Navedeno istraživanje i rezultati našeg istraživanja dobro koreliraju, odnosno podupiru pretpostavku da inhibicija DPP IV/CD26 ima pozitivnu, a moglo ni se reći i zaštitnu ulogu. Nadalje, ako uzmemo u obzir da CD26<sup>-/-</sup> miševi u usporedbi s C57BL/6 miševima imaju nešto veći broj makrofaga i

istovremeno jače kliničke promjene, ali se u konačnici brže oporave možemo zaključiti da aktivirani makrofagi mogli imati imunosupresivni fenotip.

Regulacija migracije i aktivacije makrofaga aktivirana kao promjene ekspresije i/ili aktivnosti kemokina prepoznat je kao važan korak u razvoju akutne ili kroničnog upalnog procesa. Istraživanja ukazuju da je MCP-1 pro-upalni medijator te da njegov nedostatak rezultira smanjenim privlačenjem monocita i već stvorenih makrofaga iz krvi u upalno promijenjeno tkivo, a konačni rezultat je oslabljen Th1 imunološki odgovor (48). S druge strane, pokazano je da je ekspresija MCP-1 povećana u upalno promijenjenoj sluznici crijeva kod bolesnika s UBC u usporedbi s kontrolnom skupinom (24). Dobiveni rezultati potvrđuju obje studije jer je pokazan porast ekspresije MCP-1 u korelaciji s razvojem kolitisa odnosno upale u debelom crijevu. Nadalje, rezultati ispitivanja lokalne ekspresije kemokina su pokazali da inaktivacija gena za DPP IV/CD26 ne utječe na ekspresiju mRNA MCP-1 u akutnoj fazi kolitisa. U skladu s time moglo bi se zaključiti da pokazan broj makrofaga u sluznici CD26<sup>-/-</sup> miševa nije rezultat povećane ekspresije MCP-1, kao ključnog kemotaksijskog i regulatornog čimbenika makrofaga, nego najvjerojatnije nekih drugih mehanizama ili medijatora.

Kemokin MIP-1 otkriven je kao topivi faktor koji sudjeluje u aktivaciji makrofaga. Današnje spoznaje o ovom kemokinu nešto su drugačije jer se više ne promatra samo sa stajališta proinflamatorni čimbenika, nego mu se pripisuje i značajna uloga i u održavanju odnosno u oštećenom tkivu ponovnom uspostavljanju homeostaze (25, 29). Ovim istraživanjem pokazana je povećana ekspresija MIP-1 kemokina u CD26<sup>-/-</sup> miševa u akutnoj fazi bolesti u usporedbi s C57BL/6 miševa. Povećana ekspresija, može se smatrati jednim od razloga povećanog broja makrofaga.

Utvrđene promjene na lokalnoj razini ukazuju na ulogu DPP IV/CD26 u aktivaciji stanica makrofagnog porijekla, a time i u modulaciji imunosnog odgovora tijekom razvoja

kolitisa i cijeljenja upalom oštećene sluznice. Nadalje, rezultati otvaraju put ka daljnjim istraživanjima uloge DPP IV/CD26 u proliferaciji, aktivaciji i ekspresiji M1/M2 fenotipa stanica makrofagnog porijekla.

## **6. ZAKLJUČAK**

Pokazane promjene kliničkih i histoloških parametara na lokalnoj i sistemske razini potvrđuju da je model DSS potaknutog kolitisa uspostavljen u obje ispitivane skupine miševa.

Razvoj kolitisa praćen je povećanjem broja upalnih stanica u sluznici crijeva što ukazuje na uključenosti DPP IV/CD26 u modulaciji imunološkog odgovora tijekom razvoja kolitisa.

Budući da DPP IV/CD26 ima ulogu u procesu usmjeravanje kretanja stanica imunološkog sustava prema mjestu infekcije, pokazano otvara vrata novim istraživanjima uloge DPP IV/CD26 u aktivaciji imunoloških stanica odnosno modulaciji imunološkog odgovora.

## **7. LITERATURA**

1. Mentlein R. Cell-surface peptidases. *Int Rev Cytol.* 2004;235:165-213.
2. Sedo A, Malik R. Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities? *Biochimica et biophysica acta.* 2001 Dec 17;1550(2):107-16.
3. Lambeir AM, Durinx C, Scharpe S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2003 Jun;40(3):209-94.
4. Ogata S, Misumi Y, Ikehara Y. Primary structure of rat liver dipeptidyl peptidase IV deduced from its cDNA and identification of the NH<sub>2</sub>-terminal signal sequence as the membrane-anchoring domain. *The Journal of biological chemistry.* 1989 Feb 25;264(6):3596-601.
5. Ludwig K, Fan H, Dobers J, Berger M, Reutter W, Bottcher C. 3D structure of the CD26-ADA complex obtained by cryo-EM and single particle analysis. *Biochemical and biophysical research communications.* 2004 Jan 9;313(2):223-9.
6. Gorrell MD. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clin Sci (Lond).* 2005 Apr;108(4):277-92.
7. Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology.* 2001 Sep;54(3):249-64.
8. Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C. Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends Immunol.* 2008 Jun;29(6):295-301.
9. Boonacker E, Van Noorden CJ. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur J Cell Biol.* 2003 Feb;82(2):53-73.
10. Yazbeck R, Howarth GS, Abbott CA. Growth factor based therapies and intestinal disease: is glucagon-like peptide-2 the new way forward? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Apr;20(2):175-84.
11. De Meester I, Korom S, Van Damme J, Scharpe S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunology today.* 1999 Aug;20(8):367-75.



12. Neumiller JJ, Wood L, Campbell RK. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Pharmacotherapy*. 2010 May;30(5):463-84.
13. Dong RP, Morimoto C. Role of CD26 for CD4 memory T cell function and activation. *Hum Cell*. 1996 Sep;9(3):153-62.
14. Ohnuma K, Hosono O, Dang NH, Morimoto C. Dipeptidyl peptidase in autoimmune pathophysiology. *Adv Clin Chem*. 2011;53:51-84.
15. Baticic L, Detel D, Kucic N, Buljevic S, Pugel EP, Varljen J. Neuroimmunomodulative properties of dipeptidyl peptidase IV/CD26 in a TNBS-induced model of colitis in mice. *Journal of cellular biochemistry*. 2011 Nov;112(11):3322-33.
16. Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol*. 1998;18(5):389-418.
17. Pacheco R, Martinez-Navio JM, Lejeune M, Climent N, Oliva H, Gatell JM, et al. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Jul 5;102(27):9583-8.
18. Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol*. 2003 Aug;3(8):609-20.
19. Iwaki-Egawa S, Watanabe Y, Kikuya Y, Fujimoto Y. Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J Biochem*. 1998 Aug;124(2):428-33.
20. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011 Nov;11(11):762-74.
21. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008;13:453-61.
22. Mills CD. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. *Crit Rev Immunol*. 2001;21(5):399-425.

23. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of immunology*. 2000 Jun 15;164(12):6166-73.
24. Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P, Doe WF. Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa. *J Leukoc Biol*. 1996 Jun;59(6):804-12.
25. Papadakis KA. Chemokines in inflammatory bowel disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2004 Jan;4(1):83-9.
26. Andreis I BD, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Taradi M, Višnjić D. *Imunologija*. Zagreb: Medicinska naklada, Zagreb; 2010.
27. Bakhautdin B, Febbraio M, Goksoy E, de la Motte CA, Gulen MF, Childers EP, et al. Protective role of macrophage-derived ceruloplasmin in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2013 Feb;62(2):209-19.
28. Shireman PK, Contreras-Shannon V, Ochoa O, Karia BP, Michalek JE, McManus LM. MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. *J Leukoc Biol*. 2007 Mar;81(3):775-85.
29. Zhong W, Kolls JK, Chen H, McAllister F, Oliver PD, Zhang Z. Chemokines orchestrate leukocyte trafficking in inflammatory bowel disease. *Front Biosci*. 2008;13:1654-64.
30. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jul;3(7):521-33.
31. Cader MZ, Kaser A. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut*. 2013 Nov;62(11):1653-64.
32. Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol*. 2000 Sep;35(3):154-67.
33. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007 May 12;369(9573):1627-40.

34. Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol*. 2004 Jul;99(7):1371-85.
35. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*. 2009 Nov 19;361(21):2066-78.
36. Perse M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:718617.
37. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1993 Aug;69(2):238-49.
38. Melgar S, Engstrom K, Jagervall A, Martinez V. Psychological stress reactivates dextran sulfate sodium-induced chronic colitis in mice. *Stress*. 2008 Sep;11(5):348-62.
39. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1995 Oct;109(4):1344-67.
40. Ito R, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, Takada R, Sakagami J, et al. Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clinical and experimental immunology*. 2006 Nov;146(2):330-8.
41. Viennois E, Chen F, Laroui H, Baker MT, Merlin D. Dextran sodium sulfate inhibits the activities of both polymerase and reverse transcriptase: lithium chloride purification, a rapid and efficient technique to purify RNA. *BMC research notes*. 2013;6:360.
42. Lakatos PL. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World journal of gastroenterology : WJG*. 2006 Oct 14;12(38):6102-8.
43. Reinhold D, Hemmer B, Gran B, Steinbrecher A, Brocke S, Kahne T, et al. Dipeptidyl peptidase IV (CD26): role in T cell activation and autoimmune disease. *Advances in experimental medicine and biology*. 2000;477:155-60.

44. Bank U, Bohr UR, Reinhold D, Lendeckel U, Ansorge S, Malfertheiner P, et al. Inflammatory bowel diseases: multiple benefits from therapy with dipeptidyl- and alanyl-aminopeptidase inhibitors. *Front Biosci.* 2008;13:3699-713.
45. Hibbs JB, Jr., Vavrin Z, Taintor RR. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *Journal of immunology.* 1987 Jan 15;138(2):550-65.
46. Qualls JE, Kaplan AM, van Rooijen N, Cohen DA. Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes. *J Leukocyte Biol.* 2006 Oct;80(4):802-15.
47. Yazbeck R, Howarth GS, Geier MS, Demuth HU, Abbott CA. Inhibiting dipeptidyl peptidase activity partially ameliorates colitis in mice. *Front Biosci.* 2008;13:6850-8.
48. Huang DR, Wang J, Kivisakk P, Rollins BJ, Ransohoff RM. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine.* 2001 Mar 19;193(6):713-26.

## **8. PRILOZI**

## **8.1. Popis tablica**

Tablica 1. Podjela kemokina.

Tablica 2. Kriteriji za izračun indeksa aktivnosti bolesti.

Tablica 3. Uvjeti odvijanja reakcije reverzne transkripcije.

Tablica 4. Početnice za mišji MIP-1 i MCP-1.

Tablica 5. Uvjeti odvijanja lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.

## **8.2. Popis slika**

Slika 1. Uloga tkivnih makrofaga.

Slika 2. Implen NanoPhotometer™ Pearl.

Slika 3. Promjene tjelesne mase tijekom razvoja kolitisa i cijeljenja upalno promijenjene sluznice debelog crijeva debelog crijeva tretiranih životinja (A i B) i kontrolnim skupinama (C).

Slika 4. Rektalno krvarenje u akutnoj fazi upale.

Slika 5. Indeks aktivnosti bolesti.

Slika 6. Promjene mase slezene tijekom razvoja i rezolucije kolitisa u C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševima.

Slika 7. Makroskopske promjene debelog crijeva u akutnoj fazi upale.

Slika 8. Patohistološke promjene sluznice debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa i i cijeljenja upalno promijenjene sluznice u C57BL/6 miševa.

Slika 9. Patohistološke promjene sluznice debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa i cijeljenja upalno promijenjene sluznice u CD26<sup>-/-</sup> miševa.

Slika 10. Distribucija i broj makrofaga u sluznici debelog crijeva u akutnoj fazi kolitisa C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa.

Slika 11. Analiza genske ekspresije monocitnog kemotaktičnog proteina (MCP)-1 (A) i makrofagnog upalnog proteina (MIP)- 1 (B) u debelom crijevu tijekom razvoja i rezolucije upale.

## **ŽIVOTOPIS**

Ime i prezime: Ivona Gačić

Ime oca i majke: Goran, Jadranka

Datum rođenja: 13.11.1991

Mjesto rođenja: Rijeka, RH

Državljanstvo: Hrvatsko

Narodnost: Hrvatica

Bračno stanje: Neudata

Adresa: Ružice Mihić 25, 51 000 Rijeka

### Školovanje

1998. – 2006. Osnovna škola Fran Franković Rijeka

2000. – 2006. Glazbena škola Ivana Matetića Ronjgova Rijeka

2006. – 2010. Prva sušačka hrvatska gimnazija u Rijeci, jezični smjer

2010. – 2013. Medicinski fakultet – Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva

2013. – 2015 Medicinski fakultet – Diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva