

# PROMJENE IZRAŽAJA ČIMBENIKA PRIVLAČENJA MONOCITA -1 TIJEKOM RAZVOJA KOLITISA

---

**Vučetić, Vana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*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:184:390544>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-03**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Vana Vučetić

PROMJENE IZRAŽAJA ČIMBENIKA PRIVLAČENJA MONOCITA-1 TIJEKOM

RAZVOJA KOLITISA

Diplomski rad

Rijeka, 2017.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Vana Vučetić

PROMJENE IZRAŽAJA ČIMBENIKA PRIVLAČENJA MONOCITA-1 TIJEKOM  
RAZVOJA KOLITISA

Diplomski rad

Rijeka, 2017.



Mentor rada: doc.dr.sc. Dijana Detel, dr.med.

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

1 \_\_\_\_\_

Rad ima \_\_\_\_\_ stranica, \_\_\_15\_\_\_slika, \_\_\_4\_\_\_tablica, \_\_\_\_\_literaturnih navoda.

Istraživanje je provedeno u sklopu Potpore Sveučilišta u Rijeci „Uloga proteina obitelji DPP IV u kroničnim bolestima (br. 13.06.1.2.26; voditelj, prof. dr. sc. Jadranka Varljen).

Diplomski rad je najvećim dijelom izrađen na Zavodu za kemiju i biokemiju te Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

## SAŽETAK

**UVOD:** Ulcerozni kolitis (UK) je kronična upalna imunološki posredovane bolesti obilježena ponavljajućim upalnim procesima koji rezultiraju oštećenjem i gubitkom funkcije crijevne sluznice. Etiologija razvoja upale nije u cijelosti poznata, no pokazano je da ključnu ulogu u razvoju ima abnormalni imunološki odgovor kod genetski predisponiranih osoba uz djelovanje i drugih čimbenika poput, okoliša i prehrane.

Dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV/CD26) je transmembranski glikoprotein tipa II, serinska proteaza koja svojim proteolitičkim djelovanjem, ulogom u međustaničnoj komunikaciji i prijenosu signala u stanicu sudjeluje u modulaciji imunoloških mehanizama koji vode k razvoju UK.

Čimbenik privlačenja monocita-1 (engl. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*; MCP-1) je jedan od ključnih kemokina koji reguliraju migraciju i infiltraciju monocita, odnosno makrofaga, ima važnu ulogu u procesu angiogeneze te u razvoju malignog procesa.

**CILJ:** Obzirom da još uvijek nije u potpunosti istraženo na koji način molekula DPP IV/CD26 utječe na razvoj i rezoluciju kolitisa cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj ove molekule na ključni faktor u migraciji upalnih stanica, MCP-1 kemokin, uspostavom pokusnog modela DSS kolitisa kod divljeg tipa (C57BL/6) i CD26 deficijentnih miševa (CD26<sup>-/-</sup>).

**MATERIJALI I METODE:** Animalni model kolitisa izazvan je, kod obje ispitivane skupine miševa, primjenom otopine natrijev dekstran sulfata (DSS) kroz sedam dana *per os*. Životinje su žrtvovane u tri vremenske točke (3, 7 i 20 dan) kako bi se pratio razvoj kolitisa te potvrdila uspostava kolitisa i oporavka sluznice debeloga crijeva. Procjena uspostave i intenzitet kolitisa pratila se na dnevnoj bazi temeljem pojavnosti i intenziteta sistemskih i lokalnih markera upalnog procesa te izračunom indeksa aktivnosti bolesti. Promjene izražaja MCP-1 pratile su se na proteinskoj razini u debelome crijevu i serumu te na transkripcijskoj razini u

debelome crijevu. Transkripcijski izražaj MCP-1 određena qPCR metodom, a izražaj na proteinskoj razini ELISA metodom.

**REZULTATI:** Izražaj MCP-1 na proteinskoj razini u debelome crijevu tijekom razvoja i u akutnoj fazi kolitisa značajno je veći u odnosu na kontrolnu skupinu u obje ispitivane skupine miševa. Međutim, porast u CD26<sup>-/-</sup> miševa je gotovo dvostruko veći u odnosu na C57BL/6 miševe. Na transkripcijskoj razini porast izražaja MCP-1 3. i 7. dana kolitisa je značajno veći u C57BL/6 miševa.

**ZAKLJUČAK:** Promjene izražaj MCP-1 na proteinskoj i transkripcijskoj razini u upalno promijenjenom tkivu debeloga crijeva u CD26<sup>-/-</sup> životinja ukazuju na ulogu DPP IV/CD26 u procesu aktivacije ovog kemokina te indirektno u aktivaciji upalnih stanica te ostalih čimbenika upale.

Ključne riječi: ulcerozni kolitis; dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV/CD26); pokusni model kolitisa; čimbenik privlačenja monocita-1.



## **SUMMARY**

### **CHANGES IN THE EXPRESSION OF MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1 DURING THE COLITIS DEVELOPMENT**

**INTRODUCTION:** Ulcerative colitis (UC) is a chronic immune mediated disease characterized by recurrent episodes of inflammation of the colon. Etiology has not yet been clarified but it is considered that disease develops as a result of inadequate immune response in a genetically susceptible host including the interaction of environmental and nutritional factors.

Dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV/CD26) is a type II transmembrane glycoprotein, serine protease that through proteolytic cleavage, role in interstitial communication, signal transmission is involved in modulation of immune response which leads to the development of UC.

Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) is one of the key chemokines that regulate the migration and infiltration of monocytes or macrophages.

**GOAL:** Given that it is still not fully understand how DPP IV/CD26 molecules influence on the development and resolution of colitis, the aim of this study was to examine the influence of this molecule on the main factor in the migration of inflammatory cells, MCP-1 chemokines by establishing experimental model of DSS colitis in wild type (C57BL/6) and CD26 deficient (CD26<sup>-/-</sup>)

**MATERIALS AND METHODS:** Colitis was induced in both mouse strains using sodium dextran sulfate solution (DSS) administered for 7 days in drinking water *ad libitum*. In order to monitor the development of colitis and recovery both groups of animals were sacrificed on days 2, 7, and 20 following treatment. Evaluation of colitis establishment was monitored on a daily basis based on the appearance and intensity of inflammatory markers and calculation of

disease activity index. Transcriptional activity of MCP-1 was done by qPCR, while protein expression was assessed by ELISA.

**RESULTS:** Protein expression of colon MCP-1 during the development of colitis and in acute phase significantly increases in both mouse strains. However, in CD26<sup>-/-</sup> animals the increase of MCP-1 was twice that in C57BL/6 animals. The transcriptional activity of MCP-1 during colitis development and in the acute phase was higher in C57BL/6 animals.

**CONCLUSION:** Changes of MCP-1 expression, at protein and transcriptional level, in inflamed colon tissue in CD26<sup>-/-</sup> animals implicate the involvement of DPP IV/CD26 in the process of activation of MCP-1 chemokine and indirectly in the activation of inflammatory cells and other factors.

## SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....  | 1  |
| 1.1. UPALNE BOLESTI CRIJEVA.....                                     | 1  |
| 1.1.1. ULCEROZNI KOLITIS .....                                       | 2  |
| 1.1.1.1. Povijesni pregled .....                                     | 2  |
| 1.1.1.2. Epidemiologija .....  | 2  |
| 1.1.1.3. Morfološke promjene.....                                    | 3  |
| 1.1.1.4. Etiologija i patogeneza .....                               | 3  |
| 1.1.1.5. Klinička slika i ocjena aktivnosti bolesti.....             | 6  |
| 1.1.1.6. Dijagnostički postupak .....                                | 7  |
| 1.2. POKUSNI MODELI UPALNE BOLESTI CRIJEVA.....                      | 7  |
| 1.2.1. Mehanizam djelovanja .....                                    | 9  |
| 1.3. PROTEAZE I OBITELJI DIPEPTIL-PEPTIDAZA IV (DPP IV) .....        | 11 |
| 1.3.1. Struktura i lokalizacija DPP IV/CD26.....                     | 11 |
| 1.3.2. Uloga DPP IV/CD26 u fiziološkim procesima .....               | 13 |
| 1.4. MAKROFAGI.....  | 14 |
| 1.4.1. Rasprostranjenost i uloga.....                                | 14 |
| 1.4.2. Aktivacija i diferencijacija makrofaga.....                   | 16 |
| 1.5. KEMOKINI .....  | 17 |
| 1.6. ČIMBENIK PRIVLAČENJA MONOCITA-1 .....                           | 18 |
| 1.6.1. Kemokinska uloga MCP-1 molekule .....                         | 19 |
| 1.6.2. Lokalizacija i pojavnost u patološkim procesima .....         | 20 |
| 1.6.3. Signalni put i regulacija izražaja.....                       | 21 |
| 1.7. IMUNOENZIMSKI TEST (ELISA) .....                                | 24 |
| 1.7.1. ELISA test - definicija i osnovni princip.....                | 24 |
| 1.7.2. Vrste ELISA testova.....                                      | 26 |
| 1.7.3. Interpretacija rezultata ELISA metode .....                   | 27 |
| 1.8. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM .....                              | 27 |
| 1.8.1. Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja..... | 29 |
| 1.8.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu .....         | 29 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....   | 31 |
| 3. MATERIJALI I METODE.....  | 32 |
| 3.1. KEMIČALIJE I REAGENSI .....                                     | 32 |
| 3.2. LABORATORIJSKE ŽIVOTINJE .....                                  | 33 |

|   |    |
|---|----|
| 3.3. POKUSNI MODEL KOLITISA.....  | 33 |
| 3.4. UZIMANJE BIOLOŠKIH UZORAKA.....  | 34 |
| 3.5. PRIPREMA PREPARATA ZA HISTOLOŠKE ANALIZE .....   | 35 |
| 3.6. HEMATOKSILIN - EOZIN BOJANJE .....   | 35 |
| 3.7. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE MCP-1 IMUNOENZIMSKIM TESTOM.....   | 36 |
| 3.8. ISTRAŽIVANJE NA EKSPERIMENTALNIM ŽIVOTINJAMA .....   | 37 |
| 3.9. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....   | 37 |
| 4. REZULTATI.....   | 38 |
| 4.1. PROCJENA RAZVOJA I INTENZITETA KOLITISA .....  | 38 |
| 4.1.1. Sistemske promjene tijekom pokusnog razdoblja .....  | 38 |
| 4.1.2. Lokalne promjene tijekom pokusnog razdoblja .....  | 42 |
| 4.2. PROMJENE IZRAŽAJA MCP-1 TIJEKOM RAZVOJA DSS KOLITISA I OPORAVKA NA SISTEMSKOJ I<br>LOKALNOJ RAZINI ..... | 45 |
| 4.2.1. Proteinski izražaj MCP-1 na sistemskoj i lokalnoj razini tijekom pokusnog razdoblja .....              | 45 |
| 4.2.2. Transkripcijski izražaj MCP-1 u debelome crijevu tijekom pokusnog razdoblja.....                       | 51 |
| 5. RASPRAVA.....  | 54 |
| 6. ZAKLJUČAK.....   | 58 |
| 7. DODACI .....   | 64 |
| 7.1. POPIS SLIKA.....   | 64 |
| 7.2. POPIS TABLICA.....   | 66 |

# 1. UVOD

## 1.1. UPALNE BOLESTI CRIJEVA

Upalne bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel diseases*; UBC) podrazumijevaju poremećaje koji za posljedicu imaju upalu debelog ili tankog crijeva. Nepoznatog su uzroka, a dva najučestalija oblika uključuju Crohnovu bolest (CB) i ulcerozni kolitis (UK) (1). Unatoč velikom broju jasnih kriterija koji ih odvajaju, kod manjeg broja bolesnika teško se određuje o kojoj je bolesti riječ. Tada se bolest označava kao nerazvrstani kolitis (engl. *Undetermined colitis*). Kod većeg broja bolesnika, koji godinama boluju od UK, postoji mogućnost razvitka bolesti u CB. Primarno promjene zahvaćaju probavni sustav, no prisutne su patološke promjene na drugim organima poput zglobova, očiju ili kože. Iako su uzroci upalne bolesti crijeva još uvijek nepoznati, postoji rizik od nasljeđivanja, stoga određenu, a prema literaturnim podacima vrlo važnu ulogu u procesu patogeneze igraju genetski faktori. Oba oblika UBC prevladavaju u razvijenijim zemljama te se iz tog razloga vjeruje da upravo vanjski čimbenici poput ishrane i stresa imaju ulogu u razvoju bolesti, iako su i dalje nejasna istraživanja u tom pogledu. Pojedina istraživanja pokazuju da se bolest prije razvije kod osoba koje imaju genetsku sklonost jer se agensu (npr. virus ili bakterija) omogućuje pokretanje odnosno aktivaciju nenormalnog imunološkog odgovora. Na osnovi prikazanog poremećaja na razini imunološkog odgovora, UBC često se nazivaju i imunosnim bolestima (2).

### **1.1.1. ULCEROZNI KOLITIS**

#### ***1.1.1.1. Povijesni pregled***

Ulcerozni kolitis prvi put je prepoznat 1859. godine od strane Samuela Wilks-a, kao klinički entitet različit od bacilarne dizenterije. Pretpostavka da je infektivna dizenterija uzrok kolitisa odbačena je 1931. godine kada je napravljen, prvi puta, endoskopski pregled gastrointestinalnog trakta. Time je potvrđen detaljan opis simptoma i prirodni tijek koje je iznio Hawkins 1909. godine. Incidencija UK raste do kasnih 1970. – tih godina, a od tada je stabilna (2).

#### ***1.1.1.2. Epidemiologija***

Upalne bolesti crijeva pojavljuju se u svakoj životnoj dobi, međutim na temelju mnogih epidemioloških studija, razdoblje u kojem se najčešće pojavljuje varira između 20.- 40. te 60.- 80. godine života i to pretežito kod muškaraca. Pojavnost UK stabilna je od pedesetih godina 20. stoljeća, no zbog povećanja svijesti, razvoja dijagnostičkih metoda i tehnika očekuje se povećanje incidencije u onim područjima gdje se često javlja infektivni kolitis. Dosadašnja saznanja upućuju da genetski čimbenici imaju manji utjecaj u nastanku UK, u odnosu na Chronovu bolest, iako je incidencija veća uz pozitivnu obiteljsku anamnezu. Obiteljska anamneza je za razvoj bolesti najznačajniji neovisni faktor rizika, a pozitivna je u 6 do 20% oboljelih. Bolesnici koji imaju najveći rizik od oboljenja su braća i sestre, a mogućnost za razvoj bolesti im je 10 – 15 puta veći u odnosu na ostatak obitelji (3).

### ***1.1.1.3. Morfološke promjene***

UK zahvaća rektosigmoidno područje te se može proširiti proksimalno u kontinuitetu. Katkad zahvaća cijeli kolon. U rjeđim slučajevima, 10 – 20%, zahvaća ileum uz obilježja ulceroznih promjena u debelom crijevu. Morfološke značajke znatno variraju, ovisno o stupnju aktivnosti i trajanju bolesti (4).

### ***1.1.1.4. Etiologija i patogeneza***

Etiologija razvoja upale u UBC nisu poznate unatoč nizu provedenih istraživanja. Iako je nepoznat specifičan luminalni antigen na koji se nadovezuje imuni odgovor, potvrđeno je da se radi o abnormalnom imunološkom odgovoru kod genetski predisponiranih osoba. Nadalje, smatra se da osim prethodno navedenih i mnogi drugi faktori rizika odnosno čimbenika okoliša mogu imati ili imaju utjecaja na razvoj bolesti. Dosadašnja istraživanja ukazuju na uzročno – posljedičnu vezu navedenih čimbenika s nastankom UK. „Zapadnjački“ način života uvelike utječe na dosadašnje spoznaje, stoga se vjeruje da osim genetskih čimbenika veliku ulogu igraju okolišni uvjeti i prehrana. Ono što je sigurno – UBC je multifaktorijalna bolest za koju se teško može reći točan čimbenik rizika koji je odgovoran za specifičan imunski odgovor i koji za posljedicu ima pojavu bolesti. Sumiranjem svih podataka dobivenih dosadašnjim istraživanjima pretpostavka je da zbog pretjeranog imunskog odgovora kod genetski predisponiranih pojedinaca nastaje bolest uz dodatan utjecaj okolišnih čimbenika (5).

### **Imunosni čimbenici**

Nekontrolirana aktivacija imunološkog odgovora karakteristična je za eksperimentalno izazvane kolitise jednako kao i za humane oblike UBC. Posljedica je aktivacije makrofaga,

povećane ekspresije adhezijskih i kostimulacijskih molekula te produkcije proupalnih citokina i kemokina. Temeljem istraživanja, razlozi zbog kojih dolazi do kronične upale crijeva, su poremećaji ravnoteže pro- i protuupalnih regulacijskih citokina. Ključni proupalni regulacijski citokini su interleukin (IL)-1, TNF- $\alpha$ , IL-12, i interferon (INF)- $\gamma$ , a najvažnije immunosupresijske regulacijske molekule IL-10, IL-4, IL-5, i TGF- $\beta$ . Također, dokazana je aktivacija Th1, Th2, ili Th17 limfocitnog odgovora tijekom razvoja UBC. Th2 tip imunskog odgovora posredovan je citokinima IL-10, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, a Th2 stanice su odgovorne za posljedičnu indukciju humoralnog imunološkog odgovora. Th-2 tip imunog odgovora dominira u patogenezi UK. Posredovan je citokinima IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13. Radi se o humoralnom imunom odgovoru.

### Genetski čimbenici

Najvažniji čimbenik na koji ne možemo utjecati je genska predispozicija. Obzirom na genetsku podložnost smatra se da je UBC heterogena poligenska bolest. Do sada je provedeno niz istraživanja svrhu određivanja genetskih čimbenika npr. skeniranje genoma za otkrivanje lokusa na kromosomima. Prema dosadašnjim saznanjima genski lokusi su podijeljeni u 9 skupina imenovanih od IBD1 do IBD9, ovisno o vremenskom razdoblju otkrivanja.

Upravo ti lokusi sadrže pojedine gene koji se dokazano povezuju s nastankom UK. Jedan od njih je polimorfan gen CARD15, odnosno gen NOD2, koji je sastavni dio lokusa IBD1. To je prvi gen s jasno dokazanom povezanošću s UBC-om. Nalazi se na dugom kraku 16. kromosoma. Iako sve vodi k tome da on zapravo utječe na razvoj bolesti, mehanizam mutacije gena i UBC-a nije još razjašnjen. Mogućim otkrićem mehanizma pronalazi se odgovor na liječenje bolesti (6).

Primijećeno je češće genetsko pojavljivanje UBC među članovima iste obitelji, međutim bolest se ne nasljeđuje klasičnim Mendelovim putem. Smatra se da 15% oboljelih ima



srodnike u prvom koljenu koji boluju od UBC. Tako postoji veća sklonost oboljenju kod monozigotnih blizanaca u usporedbi s dizigotnim blizancima te povezanost između specifičnih genskih markera i različitih oblika UBC-a. Upravo zbog veće pojavnosti bolesti u blizanaca, vjeruje se da genetski čimbenici uvelike djeluju u nastanku i razvitku same bolesti. Razvoj UC povećava se do 30% unutar iste obitelji, a nerijetko se događa da se isti oblik bolesti javlja ukoliko u obitelji postoji visoka stopa pojavnosti UBC (7).

### Okolišni čimbenici

Uz genetske čimbenike, faktor koji uvelike utječe na pojavnost UK jesu okolišni čimbenici. Uzimajući u obzir podatke koji se odnose na pojavu UK, vidljivo je povećanje učestalosti ovisno o geografskom položaju. Tako sjeverne zemlje imaju veću pojavnost u odnosu na južne. Iako sjeverne zemlje zauzimaju veći postotak javljanja bolesti, postoji mogućnost da upravo genetske predispozicije stanovnika određenih dijelova svijeta uvjetuju različitu stopu incidencije.

Osim geografskog položaja, postoje sumnje da na razvoj UC djeluju i prehrambene navike stanovništva, no to još nije znanstveno dokazano.

### Komenzalne bakterije

Ljudsko tijelo sadrži različite bakterije koje su neophodne za normalno funkcioniranje organizma. Takvu ulogu imaju i komenzalne bakterije koje pomažu da se zaustavi razvoj patogenih bakterija u organizmu. Narušavanjem ravnoteže u probavnom traktu javljaju se komplikacije i upalni procesi te dolazi do razvoja bolesti gastrointestinalnog sustava, kao što su UBC. Upravo preko sluznice crijeva, organizam je u doticaju s mikroorganizmima i njihovim štetnim produktima te ukoliko je sluznična barijera oštećena postoji velika mogućnost razvoja neželjene reakcije odnosno bolesti. Kroz oštećenu sluznicu omogućen je protok proupalnih molekula, bakterijskih antigena ili bakterija koji narušavaju ravnotežu (8).

### 1.1.1.5. Klinička slika i ocjena aktivnosti bolesti

UK kao kronična bolest može imati različitu kliničku sliku, ovisno o trenutnom stanju ili stupnju bolesti i mogućim komplikacijama. Simptomi krvavog proljeva se pojavljuju u razmaku od nekoliko dana do nekoliko mjeseci te su praćeni grčevitom abdominalnom boli, mučninama, febrilitetom uz gubitak tjelesne težine. Proljev se može javiti opet nakon nekog vremena. Bolest možemo definirati ovisno o aktivnosti upalnog procesa odnosno pojavi simptoma i općem stanju bolesnika. Stoga, postoje 3 oblika: blaga, umjereno teška i teška bolest. U čak 60% slučajeva prisutan je blagi oblik bolesti, koji započinje bez općih simptoma i bez znatnije izraženog krvavog proljeva, sa do 4 stolice na dan. Umjereno teška bolest se pojavljuje u 25% slučajeva uz blage opće i ekstraintestinalne simptome, s prisutnim grčevima i povišenjem temperature. Popraćeno je s 4 do 5 stolica na dan. Kod fulminantnog oblika bolesti, odnosno teškog, dolazi do 6 ili više proljevastih stolica dnevno uz mogućnosti rektalnog krvarenja, dehidracije, anemije, hipoalbuminemije ili toksičnog megakolona. Teška bolest pojavljuje se najrjeđe, kod 15% bolesnika. Tijek bolesti se razlikuje. Tijekom bolesti dolazi do razvoja komplikacija koje mogu biti intestinalne i ekstraintestinalne (7).

**Tablica 1. Prikaz intestinalnih i ekstraintestinalnih komplikacija upalne bolesti crijeva (UBC)**

| <b>Intestinalne komplikacije</b>  | <b>Ekstraintestinalne komplikacije</b>  |
|---|---|
| Anorektalne promjene (hemoroidi, fisure, apsces, fistule, rektalni prolaps) | Nutritivne i metaboličke komplikacije (hipokalijemija, hipoalbuminemija, defecit željeza) |
| Inflamatorni polip  | Oštećenja jetre   |
| Toksični megakolon (fulminantni kolitis s dilatacijom kolona.               | Kožne promjene ( <i>erythema nodosum</i> i <i>pyoderma gangrenosum</i> )                  |
| Karcinom kolona   | Očne lezije (iritis)  |

### **1.1.1.6. Dijagnostički postupak**

Postavljanje dijagnoze temelji se na karakterističnim simptomima i povijesti bolesti. Promatra se izgled debelog crijeva i analiza tkiva. Dijagnostički postupak koji u 95% slučajeva dovodi do promjena, zbog prisutnosti tog segmenta crijeva, je proktosigmoidoskopija. Sam proces dijagnostike je bolan, često popraćen komplikacijama npr. hemoroidi. Ukoliko nalazi sigmoidoskopije nisu dovoljni za postavljanje dijagnoze UK, radi se biopsija tkiva. Biopsijom se otkrivaju promjene oblika sluznice, atrofija žlijezda ili karakteristične nakupine gnoja u udubinama sluznice.

Dodatne pretrage koje se provode su: kolonoskopija, mikrobiološki pregled stolice, fizikalni pregled za detekciju mogućih izvancrijevnih komplikacija bolesti.

Kolonoskopija se provodi za detekciju mogućih proširenja bolesti, malignih struktura i evaluacije polipoidnih tvorbi. Međutim, kod teže bolesnih pacijenata, primjena kolonoskopije može imati negativne posljedice npr. pucanje crijeva.

Zbog nespecifičnih simptoma bolesti koji ne karakteriziraju samo jednu bolest, bitno je isključiti sljedeće zarazne bolesti: infekcije Salmonellom, Shigellom, Campylobacterom, Aeromonasom, Yersiniom Speci. Upala debelog crijeva uzrokovana bakterijom *Clostridium difficile* može se javiti kao posljedica antibiotske terapije (7).

## **1.2. POKUSNI MODELI UPALNE BOLESTI CRIJEVA**

Kompleksnost UBC-a i u potpunosti ne shvaćen mehanizam razvoja upalnog procesa razlozi su teškog pronalaženja pokusnog modela. Potreban je model koji bi svojim histološkim, imunskim i kliničkim značajkama najviše sličio UBC i time pomogao pronalasku mogućeg načina liječenja bolesti kao i pridonijeti novi uvid u testiranje

terapeutskih lijekova. Prema dosadašnjim saznanjima postoje više od 60 animalnih modela UBC. Razvoj i progresija upalnog procesa postiže se primjenom kemijskih agensa, manipulacijom ciljnih gena ili prijenosom imunskih stanica (9).

Unutar skupine kemijskih induciranih kolitisa ističe se kolitisa izazvan primjenom otopine natrijeva dekstran sulfata (DSS). Otopina DSS se primjenjuje *ad libitum, per os*. Model se često primjenjuje zbog niza prednosti i vrlo malo nedostataka. Simptomi te slijed događaja koji su prisutni prilikom uspostave modela su vrlo slični kao kod humanog oblika i vrlo lako se mogu pratiti, a uključuju gubitak tjelesne mase i krvavo-sluzave proljevaste stolice. Nadalje, model je pouzdan, ima visoki stupanj ponovljivosti te se relativno lako inducira.

Tijekom razvoja modela, na patohistološkoj razini sluznice debelog crijeva dolazi do razvoja upale koja započinje s epitelnim oštećenjem zatim razvojem ulceracija i promjenom broja kripta.. U skladu s ljudskim oblikom bolesti upalni proces zahvaća područje debelog crijeva, s vidljivim područjima krvarenja i ulceracijama. Iako se upalni proces u pojedinim dijelovima prodire u dublje slojeve, submukozu i laminu muskularis mukoze uglavnom zahvaća mukoza. Ukoliko se želi izazvati akutni i/ili kronični oblik bolesti, primjenjuju se različite koncentracije DSS otopine u različitim vremenskim intervalima. Maligni proces izaziva se dugotrajnom primjenom malih doza u kombinaciji s jednokratnom ili višekratnom dozom azoksimetana koji se može primjeniti u vodi za piće ili u obliku intraperitonealnih injekcija (10).

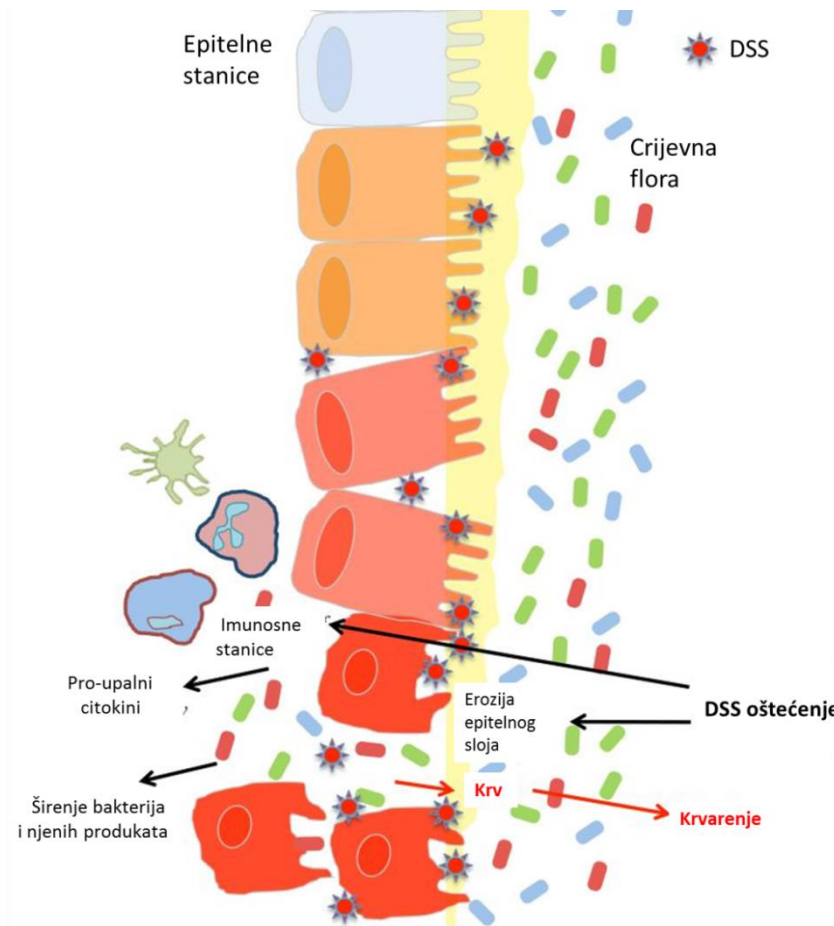
S biokemijskog pogleda DSS čini osnovni lanac na koji se nadograđuju pobočni lanci ili grane te stoga, ovisno o broju pobočnih lanaca, njegova molekulska masa se kreće u rasponu od 50 pa sve do visokih 1400 kDa. Osnovni i pobočni lanci građeni su od molekula glukoze te kažemo da je DSS složeni polimer glukoze za čiju sintezu su odgovorne bakterije, najčešće *Leuconostoc spp* i *Streptococcus spp* iz saharoze. Sumpor čini oko 17% molekule, a to odgovara omjeru dvije sulfatne skupine na jednu molekulu glukoze. Osim broja pobočnih

lanaca na molekulu masu ovog polimera utječe i raspon molekulske mase dekstrana. Istraživanja provedena od strane Kitajima i sur. ukazala su da na intenzitet i lokalizaciju kolitisa utječe molekulska masa DSS-a (5000, 40000 i 500000 Da) (11). Pokazano je da je nakon primjene DSS-a molekulske mase od 40 kDa intenzitet kolitisa najveći, a da se kolitis nikako nije mogao uspostaviti primjenom DSS otopine molekulske mase 500 kDa. Ovim istraživanjem potvrdila se pretpostavka da molekulska masa DSS utječe na brzinu uspostave, proširenost i intenzitet kolitisa.

### **1.2.1. Mehanizam djelovanja**

Unatoč čestoj primjeni DSS u uspostavi modela UBC odnosno UK mehanizami kojim DSS dovodi do razvoja oštećenja sluznice odnosno razvoja upalnog procesa nije još uvijek u potpunosti objašnjen. Prema dosadašnjim saznanjima pretpostavlja se da u razvoju modela kolitisa sudjeluje nekoliko mehanizama. Primarni proces smatra se DSS-om uzrokovano oštećenje sluznice crijeva, a aktivacija imunološkog odgovara se smatra posljedicom prethodnog (12). U etiopatogenezi neke bolesti vrlo je važan integritet sluznice i svaki poremećaj koji dovodi do povećanja propusnosti sluznice rezultirat će i njenim oštećenjem. Iz toga je i proizašla pretpostavka da se mehanizam djelovanja DSS temelji na prethodnom odnosno da utječe na stupanj propusnosti stijenke crijeva, a u prilog tome pridonosi i činjenica da je pokazano da primjenom DSS-a dolazi do smanjenja broja bazalnih kripta te njihovo odvajanje od *lamina muscularis mucosae*. Na modelu DSS-kolitisa izazvanog u miševa pokazano je da je upravo povećana propusnost mukoznog sloja sluznice omogućava nakupljanje upalnih stanica, odnosno formiranje upalnog infiltrata (13). Ova su saznanja su potvrđena i na štakorskom modelu kolitisa (14). Poritz i sur. su još dublje objasnili prethodno jer su u svom radu pokazali značajno sniženje ekspresije proteina čvrstih veza već prvog dana pokusnog razdoblja odnosno prvog dana primjene DSS-a, a razvojem kolitisa,

odnosno petog dana pokusnog razdoblja, izražaj ovog proteina je bio gotovo na donjoj granici detekcije, što je u konačnici potvrdilo ulogu propusnosti sluznice u patogenezi DSS-kolitisa (15).



**Slika 1: Prikaz mehanizma djelovanja natrijeva dekstran sulfata (DSS) na sluznicu crijeva (16).**

Nadalje, pretpostavlja se da se djelovanja DSS sastoji i u njegovoj direktnoj toksičnosti na samu sluznicu gastrointestinalnog sustava, a stupanj toksičnosti ovisi o primjenjenoj koncentraciji. S molekularnog pogleda ova pretpostavka potvrđena je temeljem promjene izražaja integrin  $\alpha 4$  i M290 podjedinica na epitelnim stanicama što rezultira promjenom njihove interakcije s  $\gamma\delta$ - intraepitelnim limfocitima (17). Navedene interakcija je važna jer se smatra da ima zaštitnu ulogu u obrani od različitih štetnih čimbenika, uključujući i DSS (18).

### 1.3. PROTEAZE I OBITELJI DIPEPTIL-PEPTIDAZA IV (DPP IV)

Proteaza (peptidaza/proteinaza) je svaki enzim koji katalizira proteolizu – hidrolizira peptidne veze koje povezuju aminokiseline u polipeptidnom lancu. Različite vrste proteaze mogu provoditi jednaku reakciju, ali uz potpuno drugačiji katalitički mehanizam. Zbog njihove velike važnosti u aktivaciji i regulaciji imunskog odgovora te u procesima prijenosa signala, smatra se da imaju važnu ulogu u razvoju i progresiji različitih patoloških stanja (19). Ovisno o funkciji, kroz istraživanja je utvrđeno pet različitih vrsta proteina koji s DPP IV/CD26 pripadaju DPP4 genskoj obitelji. Pripadaju serinskim peptidazama, te imaju sličnu aktivnost prema supstratima. To su: dipeptidil-peptidaza 8, dipeptidil-peptidaza 9, FAP- $\alpha$  (engl. *fibroblast activation protein; sepraza*), dipeptidil-peptidaza 6 i dipeptidil-peptidaza 10 (20).

Zbog mutacije u katalitičkom dipeptidil-peptidaza 6 i dipeptidil-peptidaza 10 nisu enzimski aktivna, dok prva tri djeluju kao enzimi i pokazuju sličnosti u aminokiselinskom slijedu za 27 – 60% (21). Upravo zbog takve sličnosti u strukturi, ali i funkciji, za njih je uveden skupni naziv DASH – homolozi DPP IV/CD26 po aktivnosti i/ili strukturi. Funkcija se temelji na odcjepljivanju N- terminalnih dipeptida s peptidnog lanca u čijoj se primarnoj strukturi na predzadnjem mjestu nalaze aminokiseline – alanin ili prolin.

#### 1.3.1. Struktura i lokalizacija DPP IV/CD26

DPP IV/CD26 kao transmembranski glikoprotein tipa II, ima primarnu strukturu od 766 aminokiselina. Molekulska masa mu je 110 kDa. Humani gen koji kodira DPP4 lociran je na dužem kraku drugog kromosoma. Na 5' kraju ne nalaze se ni TATA kutija ni CAAT kutija. Područje veličine oko 300 parova baza koje obiluju citozinom i gvaninon (oko 72%) i sadrži

potencijalna vezna mjesta za nekoliko transkripcijskih faktora –nuklearni faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), AP2 i Sp1 (22).

Primarna struktura utvrđena je 1989. godine sekvencioniranjem i kloniranjem štakorske cDNA. U organizmu najviše nalazimo u obliku dimera koji je sastavljen od 2 jedinice monomera, a posjeduje devet potencijalnih mjesta za glikozilaciju koji se najvećim dijelom nalaze na  $\beta$ -propelernoj domeni (23). Svaka monomerna jedinica sadrži i 2 podjedinice:

- 1)  $\alpha$  –  $\beta$  hidrolaznu domenu (501. – 766. aminokiselinski ostatak)
- 2) N- terminalna  $\beta$ - propelerna domena (59. – 497. aminokiselinski ostatak)

$\alpha$ - $\beta$  hidrolazna domena građena je od 6 paralelnih beta lanaca (nabrana struktura i dva antiparalelna lanca), a zajedno čine veliku nabranu ploču povezano s  $\alpha$  uzvojnica. Katalitička domena smještena je na površini stanične membrane.

$\beta$  – propelerna domena se dijeli na dvije subdomene, a sakriva aktivno središte molekule čime otežava pristup supstratu. Važan dio ove domene je cisteinom bogata regija zbog toga što sadrži 10 do 12 cisteina koji sudjeluju u procesu stvaranja disulfidnih mostova.

Područje koje je odgovorno za katalitičku aktivnost, ekstracelularno područje, podijeljeno je na tri dijela: glikolizacijska regija, katalitička regija i regija bogata cisteinom.

Kao protein izražen je dijelom organizma: pluća, jetra, endotelne stanice, epitelne stanice bubrežnih tubula, žučovoda i tankog crijeva. Transmembranski oblik enzima pronaći se može u srcu, mozgu i skeletnim mišićima.



### 1.3.2. Uloga DPP IV/CD26 u fiziološkim procesima

DPP IV/CD26 molekula ima nekoliko mehanizma djelovanja u organizmu: proteolitičko, međustanična komunikacija, prijenos signala u stanicu, a upravo joj oni omogućavaju da sudjeluje odnosno da ima važnu ulogu u modulaciji imunosnog odgovora.

**Tablica 2. Prikaz djelovanja DPP IV/CD26 molekule**

|  |  |
|--|--|
| <b>Proteolitička uloga</b>                   | Proteolitiča razgradnja pojedinih biološki peptida (aktivacija i/ili inaktivacija) te na taj način utječe na neuroimunobiokemijski odgovor organizma u patološkim i fiziološkim procesima. |
| <b>Uloga u međustaničnoj komunikaciji</b>    | Uloga dvojaka – kao kolagen i fibronektin-vezujući protein, kao čimbenik metastaziranja tumora i kao koreceptor za HIV-1 u međudjelovanju s adenzin-deaminazom.                            |
| <b>Prijenos signala u stanicu</b>            | Zbog kratke citoplazmatske domene – uloga koreceptora u kaskadnim reakcijama prijenosa specifičnih signala kroz membranu.  |
| <b>Uloga u modulaciji imunosnog odgovora</b> | Može mijenjati imunosni odgovor vezivanjem na adenzin deaminazu. Uključenost u mehanizme stanične proliferacije i diferencijacije.   |

## 1.4. MAKROFAGI

### 1.4.1. Rasprostranjenost i uloga

Makrofag je najzreliji oblik stanica mononuklearne fagocitne loze. Njegov neposredni prethodnik je monocit koji sazrijeva uz pomoć citokina, posebno uz GM – CSF (engl. *Colony stimulating factor*), čimbenika poticanja granulocitno – makrofagnih kolonija. Monociti cirkuliraju krvlju te ulaskom u tkiva diferenciraju se do aktivnih makrofaga. Ovisno o tkivu u kojem se nalaze, makrofagi poprimaju određene uloge. Makrofagi kao stanice mogu biti pokretne i nepokretne, odnosno slobodne i fiksne. Nepokretne makrofage možemo pronaći u različitim tkivima, u vezivu i oko mišića nazivamo ih histiocitima, u jetri Kupfferovim stanicama, u mozgu mikroglijalnim stanicama, u bubregu mezangijalnim stanicama, a u plućima alveolarnim makrofagima (5). Pokretne u većini slučajeva nalazimo u peritonealnoj i pleuralnoj šupljini, koštanoj srži, plućima, slezeni i limfnim čvorovima. Monociti – makrofagi jako dobro adheiraju za staklene i plastične površine, stoga to pridonosi njihovoj velikoj sposobnosti fagocitoze.

Glavne uloge makrofaga su: kemotaksija, lučenje prouupalnih i /ili protuupalnih posrednika, fagocitoza, liziranje mikroorganizama, uklanjanje stare i apoptotične stanice te predočivanje antigena limfocitima T. Djeluju kao čistači tkivnih prostora zbog svoje mogućnosti fagocitiranja raznih čestica (npr. mikroorganizama, inertnih tvari), apoptičkih stanica (neutrofili) i oštećenih eritrocita. Nosioci su nespecifične imunosti, no sudjeluju i u specifičnoj imunosti. Makrofagi uz pomoć posebnih receptora prepoznaju „strana“ tijela. Receptore dijelimo na opsoninske i ne – opsoninske.

**Tablica 3. Prikaz djelovanja opsoninskih i ne-opsoninskih receptora**

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| <b>Opsoninski receptori</b>      | Receptori za Fc-ulomak protutijela (FcR) i receptori za ulomke komplementa (CR) dok se u skupinu ubrajaju lektinski, TLR (engl. <i>Toll-like receptor</i> ), NLR (engl. <i>NOD-like receptor</i> ), RLR (engl. <i>RIG1-like helicase receptor</i> ) i receptori čistači |
| <b>Ne – opsoninski receptori</b> | Ne-opsoninski receptori prepoznaju konzervirane molekularne obrasce, ali i molekularne obrasce otpuštene oštećenjem vlastitih tkiva i stanica te se zbog toga nazivaju receptorima za prepoznavanje obrazaca  |

Receptori se razlikuju po svojoj ulozi i po tome što prepoznaju. Lektinski i receptori čistači uključeni su u proces fagocitoze, dok su u prijenos signala uključeni NLR, RLR i TLR. Receptori koji pripadaju skupini ne – opsoninskih receptora mogu se razlikovati po načinu prepoznavanja „stranih tijela“ npr. lektinski receptori imaju sposobnost prepoznavanja šećernih ostataka stijenki mikroorganizama, a TLR produkte bakterija, virusa, plijesni i vlastitih oštećenih stanica. Svi ne – opsoninski receptori nazivaju se i receptorima za prepoznavanje obrazaca zbog svoje mogućnosti prepoznavanja molekulskih obrazaca i/ili molekulskih obrazaca otpušteni oštećenjem vlastitog tkiva i stanica. Makrofagi izlučuju različite tvari u okoliš (> 60) npr. TNF- $\alpha$ , interleukini (IL-1, IL-6, IL-8 i IL-12), lipidni metaboliti iz skupine upalnih posrednika (prostagandini i leukotrieni), koagulacijski čimbenici (npr. protrombin), kemokini, enzimi (npr. lizozim, elastaze i kolagenaze), reaktivni intermedijarni metaboliti kisika (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH) i dušika (NO, NO<sub>2</sub>). Osim navedenih uloga, makrofagi sudjeluju u povezivanju nespecifične i specifične imunosti. Važni su u aferentnoj fazi specifične i humoralne imunosti jer predočuju proteinske antigene limfocitima T, izlučuju citokine koji kasnije pospješuju aktivaciju limfocita. Također, pri izgradnji unutarstaničnih patogena, pod utjecajem citokina, sudjeluju i kao efektorske stanice (24).

### 1.4.2. Aktivacija i diferencijacija makrofaga

U procesu aktivacije makrofaga sudjeluje velik broj kako endogenih tako i egzogene tvari. Aktivirani limfociti T i NK stanice luče citokine koji predstavljaju skupinu najvažnijih endogenih tvari IFN- $\gamma$  i IL-4. Egzogeni čimbenici koji aktiviraju makrofage čine proizvodi mikroorganizama ili mikroorganizmi koji napadaju same makrofage. Aktivirani makrofagi su važni i u nespecifičnoj otpornosti na tumore zbog svoje mogućnosti liziranja stanica zloćudnih tumora.

Ovisno o uvjetima mikrookoliša odnosno uvjetima u kojima se nalaze u trenutku aktivacije makrofagi se diferenciraju u funkcionalno različite fenotipove: M1 ili M2. Put aktivacije makrofaga koji se pokreće u prisustvu bakterijskog lipopolisaharida te lučenjem IFN- $\gamma$  naziva se klasični put ili M1 put.. S druge strane, alternativni put aktivacije odnosno M2 put može biti potaknut kombinacijom različitih citokina, imunokompleksima, lipopolisaharidima te glukokortikoidima. Ovisno o kombinaciji citokina koji sudjeluju u aktivaciji makrofaga unutar M2 puta razlikuje se M2a, M2b i M2c (25). Primarna uloga M1 makrofaga je u obrani organizma kako u upali tako i prilikom ozljede odnosno u slučaju tumorske proliferacije. Osim toga, makrofagi su dobro poznate antigen prezentirajuće stanice. Budući da makrofagi aktivirani klasičnim putem luče velik broj proupalnih citokina, reaktivne kisikove spojeve te dušikov oksid smatra se da oni imaju proupalno djelovanje. Prema dosadašnjim saznanjima M2 makrofagi za razliku od M1 makrofaga, imaju protupalno djelovanje. Nadalje, budući da je dokazano da M2 makrofagi luče posrednike koji potiču angiogenezu, diobu endotelnih stanica i sintezu izvanstaničnog matrikasa pretpostavlja se da imaju važnu ulogu u obnovi, cijeljenju tkiva. U procesu smirivanja upale odnosno uspostave homeostaze lučenjem medijatora poput IL-10 M2b makrofagi imaju ključnu imunomodulacijsku ulogu. Stoga, uzimajući u obzir prethodno navedeno zaključujemo da fenotip makrofaga ima ulogu u razvoju, napredovanju i prognozi upale (26).

Makrofagi su smješteni u lamini propriji i na dodirnoj površini crijevnog lumena gdje prepoznaju mikrobe i progutane podražaje. Imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze tkiva te u patogenezi UBC. Najrasprostranjeniji su fagociti u zdravoj crijevnoj sluznici. Ukoliko se homeostaza naruši npr. infekcijom, dolazi do promjene funkcije te broja i fenotipa makrofaga. To za posljedicu ima prekomjerni odgovor na crijevne mikrobne podražaje. Veliku ulogu fenotip makrofaga ima u oštećenju sluznice crijeva, ovisno o uvjetima u okolišu, sudjeluju u uklanjanju bakterija i obnavljanju oštećene sluznice aktivacijom procesa.

## **1.5. KEMOKINI**

Kemokini su sekretorni proteini koje proizvode leukociti i tkivne stanice konstitutivno ili nakon indukcije. Molekulske su mase 6 – 14 kDA te se sastoje od 70 – 1 AK. Predstavljaju obitelj kemoatraktantnih citokina te su na temelju broja i razmaka konzerviranih cisteinskih ostataka na N- kraju proteina, podijeljeni u 4 obitelji. Igraju važnu ulogu u selektivnom regrutiranju monocita, neutrofila i limfocita, kao i u induciranju kemotaksije aktivacijom receptora vezanih za G – protein.

Pojam kemokina označava skraćeni naziv za kemotaksijske citokine, a kod čovjeka postoje u više od 50 oblika tvoreći veliku porodicu medijatora upale i imunosti. Upravo zbog njihove funkcije, imaju sličnosti sa citokinima, međutim razlika je u veličini i načinu djelovanja. U odnosu na citokine kemokini su nešto manji, a svoje djelovanje ostvaruju kroz interakciju s receptorima koji su povezani na G protein. Dijelimo ih u 2 skupine: homeostatsku i oni koje proizvode stanice tijekom infekcije ili slijede proupalni podražaj i migraciju leukocita na mjesto infekcije. Kao posljedica toga su kemokini koji aktiviraju stanice za pojačavanje imunskog odgovora i pomažu u procesu cijeljenja rana. Kemokini jako slične svojim

receptorima, a  $\alpha$  i  $\beta$  kemokini imaju dva mjesta uz pomoć kojih se povezuju s receptorima. U amino-terminalnoj domeni prije prvog cisteina nalazi se jedno vezno mjesto koje ujedno predstavlja i najvarijabilnije područje kemokina. Drugo vezno mjesto se nalazi unutar strukturnog zavoja iza drugog cisteina, a oba se povezuju uz pomoć disulfidnih mostova. Receptori su definirani kao CXC, CC, XC (X je umetnut da se razlikuje od receptora komplementa 1, CR1) i CX3C iza čega slijedi R i broj. Do sada je poznato da postoji 6  $\alpha$  i 10  $\beta$  receptora. Unatoč činjenici da jedan receptor može, ima mogućnost vezivanja više kemokina, oni su ograničeni na jednu podskupinu. Također, jedna vrsta kemokina se može vezati za više različitih receptora u određenom trenutku.  $\alpha$  receptori posjeduju šesnaest, a  $\beta$  receptori osamnaest različitih kemokina. Unutar svake skupine receptora naknadno se granaju podskupine npr.  $\alpha$  receptori se dijele u ovisnosti sadrže li tripeptid glutaminsku kiselinu-leucin-arginin u NH<sub>2</sub> kraju. Kemokine koji u svojoj strukturi imaju prethodno navedeni tripeptid proizvode različite stanice kao odgovor na brojne podražaje, uglavnom citokine s proupalnim djelovanjem poput IL-1 i TNF- $\alpha$ .

## 1.6. ČIMBENIK PRIVLAČENJA MONOCITA-1

Čimbenik privlačenja monocita-1 (engl. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*; MCP-1), dio je male skupine induktivne obitelji gena koju čine četiri člana MCP -1, -2, -3 i -4. Naziva se i malim inducibilnim citokinom A-2 (SCY A2) i monocitni kemotaktični i aktivirajući faktor. MCP-1 je jedan od ključnih kemokina koji reguliraju migraciju i infiltraciju monocita, odnosno makrofaga. Migracija monocita iz krvotoka preko vaskularnog endotela je potrebna za rutinski imunološki odgovor tkiva, kao i kao odgovor na upalu. Temeljem dosad

provedenih istraživanja, smatra se da je MCP-1 identičan genu čija je izražaj inducirana u mišjim fibroblastima pomoću faktora rasta izvedenog iz trombocita (27).

### **1.6.1. Kemokinska uloga MCP-1 molekule**

Član je C-C kemokinske obitelji te je poznat kao CCL2 kemokin te se stoga u literaturi vrlo često koristi i skraćenica MCP-1/CCL2. CCL2 je prvi otkriveni humani C-C kemokin i intenzivno se istražuje posljednjih godina. Ljudski homolog karakteriziran kao CCL2, prvi je puta pročišćen je iz ljudskih staničnih linija na temelju svojih monocitno – kemoatraktantnih svojstava. Homologija sekvence između CCL2 i ostalih članova obitelji je visoka i varira između 61% za CCL8 i CCL4, a 71% za CCL7. Primarne proteinske strukture ljudskih CCL2, CCL7 i CCL8 početno su određene upotrebom pročišćenog prirodnog materijala, dok je humana CCL13 proteinska sekvenca izvedena iz izoliranih cDNA. Uz ove proteine, pročišćeni su CCL2 proteini različite molekularne mase, a obrazloženje se nalazi u procesu O-glikozilacija. Osim što glikozilacija utječe na molekularnu masu utječi i na sposobnost privlačenja monocita odnosno smanjuje tu sposobnost.

CCL2 proizvode različiti tipovi stanica, konstitutivno ili nakon indukcije oksidativnim stresom, citokinima ili čimbenicima rasta. Proizvode ga: endotelne, epitelne, fibroblaste, mirkoglijalne i monocitne stanice. Navedene stanice važne su za antivirusni imunološki odgovor u perifernoj cirkulaciji i tkivu. Kako su makrofagi jedni od glavnih izvora CCL2, on regulira migraciju i infiltracije monocita, T limfocita i NK stanica. CCL2 sudjeluje, kao potencijalna intervencijska točka, u liječenju različitih bolesti: multipla skleroza, reumatoidni artritis, ateroskleroza, itd. Analiza mutacija CCL2 rezultirala je identificiranjem dviju regija primarne strukture koje su kritične za biološku aktivnost. Prva regija sastoji se od sekvence od Thr-10 do Tyr-13, dok se druga regija, također funkcionalno važna, sastoji od ostataka 34 i

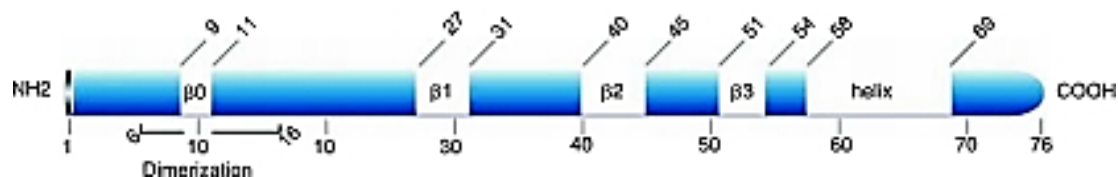
35. Mutacija bilo kojeg ostatka 10 ili 13 uzrokuje smanjenje aktivnosti CCL2. Važnost druge regije utvrđena je temeljem rezultata dobivenih mutacijama kojima je uveden prolin između Ser-34 i Lys-35, a drugi zamjenom tih dvaju ostataka sa slijedom Gly-Pro-His. Bilo koja od prethodno navedenih mutacija značajno smanjuje aktivnost CCL2. Osim ovih dviju regija, također je objavljeno da specifičnost vezivanja CCL2 na stanice mijenja se nakon mutacije ostataka 28 i 30, ali ne samo na ostatke 30. Nadalje, brisanje ostataka na N-terminalnoj domeni rezultira gubitkom aktivnosti CCL2 unatoč činjenici da neki produkti N-terminalnih mutacija djeluju kao CCL2 antagonisti (27).

Nadalje, podaci o ulozi CCL2 dobiveni su temeljem pokusa provedenih u miševa kojima je uklonjen gen te receptor za CCL2 (28).

### 1.6.2. Lokalizacija i pojavnost u patološkim procesima

Istraživanja ukazuju da su MCP-1 i njegov receptor uključeni u razvoj mnogih patoloških procesa od infektivnih, preko degenerativnih te sve do karcinoma.

MCP-1 je pronađen u zglobovima osoba s dijagnosticiranim reumatoidnim artritismom gdje mogu poslužiti za regrutiranje makrofaga i perpetuirati upalu u zglobovima. Također, može se pronaći u urinu osoba dijagnosticiranih s lupusom kao znak upozorenja na upalu bubrega.

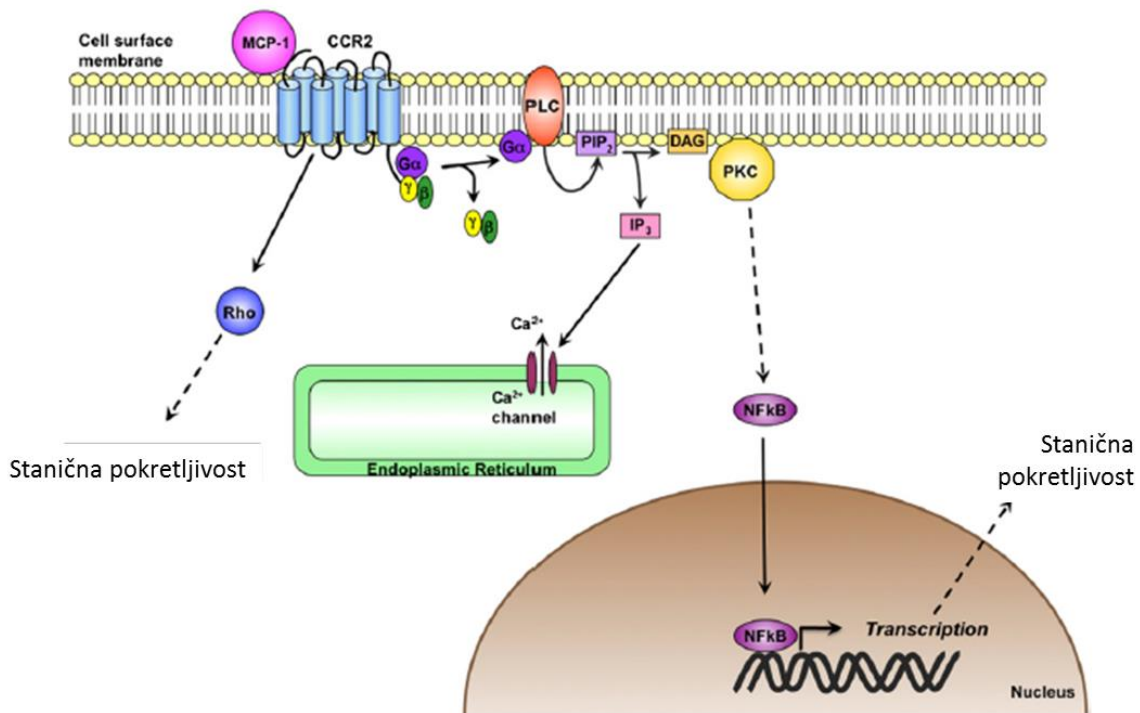


Slika 2. Shematski prikaz strukture MCP-1 (29).



### 1.6.3. Signalni put i regulacija izražaja

Kao što je prethodno navedeno MCP-1 ostvaruje svoj učinak vezivanjem za receptor koji je vezan na G-protein te potiče aktivaciju i migraciju ciljnih stanica. Aktivacijom receptora, odnosno nizom reakcija koje rezultiraju stvaranjem inozitol-trifosfata, unutarstaničnim otpuštanjem kalcija te aktivacijom protein kinaze C. Zanimljivo, istovremeno dolazi i do aktivacije proteina Rho obitelji koji su GTP-vezujući proteini (30). Na slici 2. prikazan je biosignalni proces MCP-1. Većina veže više različitih kako MCP-1 proteina te i neke druge kemokine iz obitelji C-C kemokina. Prema dosadašnjim podacima postoje dva oblika receptora: CCR2A i CCR2B. Oni se međusobno razlikuju samo po C-terminalnom repu. CCR2A je izoforma uglavnom izražena na mononuklearnim stanicama i mišićnim stanicama krvnih žila dok monociti i aktivirane NK stanice na svojoj površini izražavaju uglavnom CCRB izoformu receptora. Moguće je, ali još uvijek nije dokazano, da ove dvije izoforme aktiviraju različite signalne puteve i time ostvaruju različite učinke u stanici odnosno tijekom određenog procesa. Potrebno je naglasiti da se signalizacijom kroz receptor MCP-1 može ostvariti dvojaku ulogu, proupalnu i/ili protuupalnu (29).

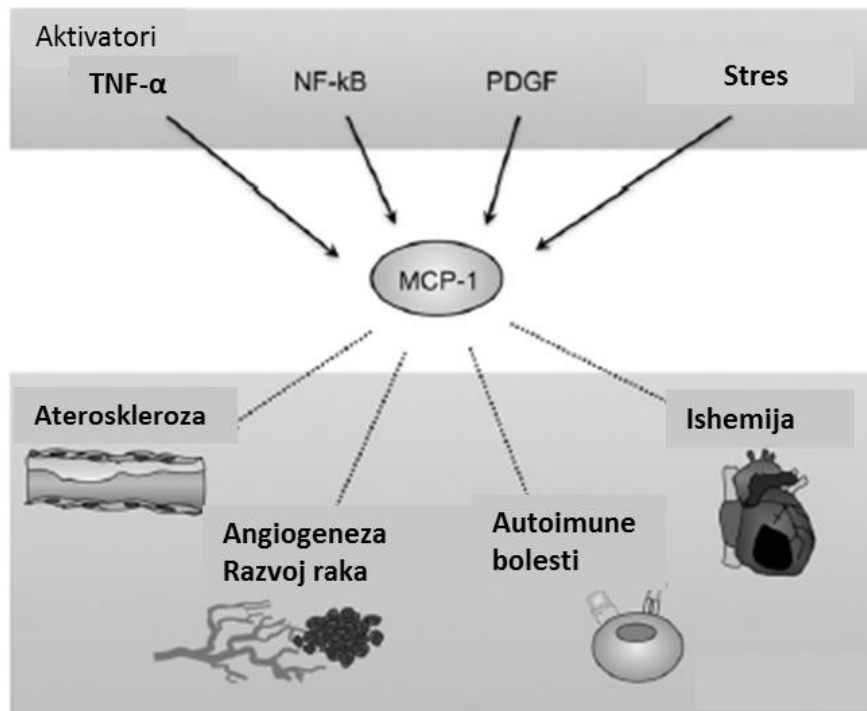


**Slika 3. Signalni put MCP-1 molekule (29).**

MCP-1, Čimbenik privlačenja monocita-1; CCR2, receptor za MCP-1; PLC, fosfatidil –kolin; PKC, protein-kinaza C; IP<sub>3</sub>, inozitol-trifosfat; NF-κB, nuklearni faktor-κB (30).

Regulacija izražaja MCP-1 na transkripcijskoj razini ovisna je o različitim molekulama odnosno čimbenicima (Slika 3). Među navedenim čimbenicima ključnu ulogu u aktivaciji odnosno pojačanom izražaju ima pro-upalni transkripcijski faktor NF-κB. S druge strane, glukokortikoidi i estrogen imaju negativan učinak na izražaj MCP-1 molekule. Dosadašnja saznanja ukazuju da je tijekom razvoja upalnog procesa povećana aktivnost NF-κB u korelaciji s infiltracijom mononuklearnih stanica, adhezijskim molekulama te izražajem MCP-1 TNF-α, COX2 i iNOS. Time NF-κB ima važnu ulogu u aktivaciji i kemotaksiji

makrofaga, pro-upalnog djelovanju i tkivnoj remodelaciji. Nadalje ovaj transkripcijski faktor ima vrlo važnu ulogu u procesu angiogeneze i proliferacije te u razvoju malignog procesa.



**Slika 4. Čimbenici i patološka stanja koja utječu na transkripcijski izražaj MCP-1 (30).**

MCP-1, Čimbenik privlačenja monocita-1; TNF- $\alpha$ , tumorski faktor nekroze  $\alpha$ ; NF- $\kappa$ B, nuklearni faktor- $\kappa$ B; PDGF,

## **1.7. IMUNOENZIMSKI TEST (ELISA)**

Imunoenzimski testovi su jednostavne, osjetljive, specifične i isplative zamjene ili dodaci raspoloživim analitičkim metodama te stoga danas čine vrlo važan dio unutar laboratorijskih tehnika. Jedna od glavnih prednosti imunokemijskih analiza je mogućnost neposredne kvalitativne i kvantitativne karakterizacije malih količina tvari u složenim biološkim uzorcima. Nadalje većina ovih metoda je bazirana na fotometrijskom, fluorimetrijskom i elektrokemijskom principu te stoga ne zahtjeva primjenu skupih instrumenata (31).

One se temelje na reakciji antigen-protutijelo te su jakost vezivanja antigena i protutijela određena njihovim svojstvima. S obzirom na način uspostavljanja reakcije između antigena i protutijela, imunokemijske tehnike se mogu podijeliti u dvije osnovne skupine (Tablica 4).

### **1.7.1. ELISA test - definicija i osnovni princip**

ELISA (engl. *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) je imunoenzimski test visoke osjetljivosti i selektivnosti koji se koristi za određivanje ukoliko su prisutni određeni analiti, te u kojim količinama. Koristi se uz jednostavnu pripremu uzoraka, a moguće je odrediti vrlo niske koncentracije analita. Nadalje, ova metoda odnosno proces same reakcije odvija se u mikrotitarskoj pločici što je ujedno još jedna od prednosti jer se tijekom jednog pokusa, istovremeno, odvija ispitivanje velikog broja uzoraka. Kao što je prethodno navedeno, sve imunokemijske metode pa tako i ELISA zasnivaju se na specifičnoj interakciji antigen – protutijelo te spektrofotometrijskom mjerenju nastale reakcije, do koje dolazi zbog promjene boje. Povezivanje antigena i protutijela odvija se uz pomoć slabih, nekovalenih veza, koje

djeluju na maloj udaljenosti pa stoga navedena interakcija ovisi o prostornom poklapanju antigena i protutijela (31, 32).

*Protutijelo* ili imunoglobulini su po kemijskom sastavu proteini, glikoproteini koje organizam proizvodi kao odgovor na imunogene. Pod pojmom imunogene podrazumijeva se svaka kemijska tvar koja je sposobna potaknuti stvaranje protutijela. Sintezu protutijela mogu potaknuti različite vrste tvari od bjelančevina, polipeptida, preko nukleinskih kiselina te nekih organizmu nepoznatih molekula. U ELISA metodi koriste se dvije vrste, tipa protutijela, monoklonalna ili poliklonalna.

*Poliklonalna protutijela* nastaju u organizmu kao odgovor na pojedine složene antigene su heterogena smjesa jer ih proizvodi različite stanične linije plazma stanica, od kojih je svaki sposoban proizvesti protutijelo koje reagira s različitom antigenskom determinantom kompleksnog antigena. Suprotno, *monoklonska protutijela* proizvode stanice koje su podrijetlom i s jedne stanice te su homologna, a time i izrazito specifična.

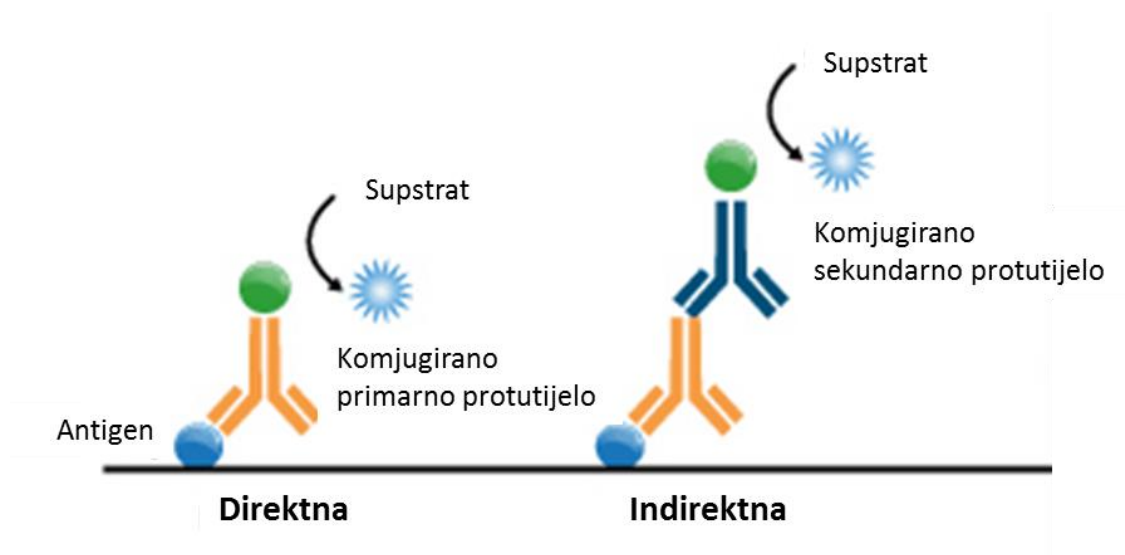
*Antigen* po kemijskoj prirodi može biti protein, polisaharid ili jednostavna mala tuđa molekula koja potiče proizvodnju protutijela. Kvaliteta antitijela definira specifičnost i osjetljivost analize.

Test u svom imenu nosi naziv enzimski jer se rezultat vizualizira uz pomoć enzimске reakcije u posljednjoj fazi izvođenja testa. Detekcijska protutijela poznatija pod nazivom sekundarna protutijela obilježena su enzimom koji kroz enzimsku reakciju mijenjaju boju supstrata. Najčešće korišteni enzimi su alkalna fosfataza, peroksidaza iz hrena i  $\beta$ -galaktozidaza. Ovaj korak je multiplikacijski odnosno jedna molekula enzima vezana za jednu molekulu protutijela, koja je vezana za jednu molekulu antigena, može enzimski promijeniti više molekula supstrata (31, 32).

Postupak ELISA testa izvodi se u nekoliko koraka. Uzorak s nepoznatom količinom antigena imobilizira se na krutu podlogu (mikrotitarska ploča) adsorpcijom na površinu (nespecifično) ili hvatanjem drugim antitijelima specifičnim za isti antigen (specifično). Nakon imobilizacije antigena, dodaje se detekcijsko protutijelo (sekundarno protutijelo) na taj način stvarajući kompleks s antigenom. Između svakog koraka ploča se ispiri blagom otopinom deterđenta za uklanjanje proteina ili antitijela koji nije specifično vezan. Nakon završnog koraka pranja, ploča se razvija dodavanjem enzimskog supstrata u svrhu dobivanja vidljivog signala koji će pokazivati količinu antigena u uzroku (31, 32).

### 1.7.2. Vrste ELISA testova

Postoje tri osnovna tipa ELISA testa: direktni, indirektni i „sendvič“ test. Mogu se temeljiti na kompetitivnoj ili inhibicijskoj tehnici (Slika 5).



Slika 5. Vrste ELISA metode (32).

"Sendvič" ELISA mjeri količinu antigena između dvaju slojeva protutijela (primarnog i sekundarnog). Antigen koji se određuje mora imati najmanje dva antigenska mjesta za vezanje na protutijela, jer najmanje dva protutijela djeluju u "sendvič" testu.

### **1.7.3. Interpretacija rezultata ELISA metode**

Rezultat ELISA testa jest obojenje, a intenzitet obojenja mjeri se spektrofotometrom, a izmjerena vrijednost naziva se apsorbancija. Određivanje količine mjerene tvari može se odrediti na više načina ali najčešće se određuje prema standardu u kojem je količina tvari poznata. Količina tvari može biti izražena u jedinicama koncentracije ( npr.  $\mu\text{g/mL}$ ).

## **1.8. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM**

Lančana reakcija polimerazom (PCR) (eng. *Polymerase Chain Reaction*) je metoda koja je imala presudni utjecaj na primjenu molekularno-bioloških metoda u znanstvenim istraživanjima. Čovjek koji je osmislio ovu metodu je dr. Kary Mullis, 1993. god. dobio Nobelovu nagradu za svoje otkriće, a time je potvrđena važnost ove metode. Njome se relativno kratki dio DNA umnožava u veliki broj identičnih kopija. Sam proces metode je vrlo jednostavan: ciljni dio DNA molekule koji se želi umnožiti određuje se prom kratkim oligonukleotidnim sekvencama odnosno početnicama (engl. *primers*), koji su komplementarni krajevima DNA od interesa. Početnice su pokretači niza reakcija uz pomoć enzima DNA polimeraze, koja na kalupu jednog lanca DNA sintetizira novi, komplementarni lanac.

Veličina sintetiziranog dijela DNA molekule odgovara dužini koju omeđuju izabrane početnice (31).

PCR se provodi u posebnom uređaju koji kontrolira promjene temperature tijekom ciklusa amplifikacije. Za provođenje metode potrebno je: termostabilna DNA polimeraza, uzorak DNA, dva odgovarajuća oligonukleotidna primera, reakcijski pufer i nukleotidi.

Svaki PCR proces može se podijeliti u 3 osnovna dijela:

1. Inicijalno denaturiranje DNA u trajanju od 3 do 5 minuta na temperaturi od 94 °C
2. Hibridizacija početnica na komplementarne odjeljke DNA (temperatura je snižena na oko 55 °C zbog mogućnosti vezanja primera na komplementarne razdvojene lance)
3. Sinteza komplementarnog lanca na temperaturi od 72 °C

Tijekom procesa denaturacije DNA lanci se razdvajaju i u otopini stvaraju strukturu nasumičnog klupka. Hlađenjem smjese u rasponu od 40 °C do 60 °C dolazi do sparivanja početnica s 5 krajem na 3 kraju denaturiranih DNA lanaca čime se oblikuju granice odsječka koji se umnaža, a istovremeno se postavlja početna sekvenca neophodna da bi DNA polimeraza mogla započeti svoju aktivnost. Ponovnim zagrijavanjem smjese do 72 °C je optimalna temperatura za djelovanje termostabilne Taq-polimeraze. DNA polimeraza izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus*, koja živi u termalnim vodama, a stabilna je na visokim temperaturama od 70 °C. Maksimalna djelotvornost joj je pri 74 °C i pH 8, a efikasnost sinteze oko 2800 nukleotida/min. Ugrađivati će nove komplementarne nukleotide sve dok ne stigne do druge početnice. Pošto se na oba dva lanca odvija sinteza, u jednom ciklusu amplifikacije će se broj DNA udvostručiti. Proces se odvija u 30 do 40 ciklusa, nakon toga dolazi do zasićenja i gubi se efikasnost reakcije. Navedeni koraci dio su jednog ciklusa PCR reakcije, a kako bi se dobile dovoljne količine ispitivanog ulomka koraci se ponavljaju najčešće u 20-40 ciklusa (33).



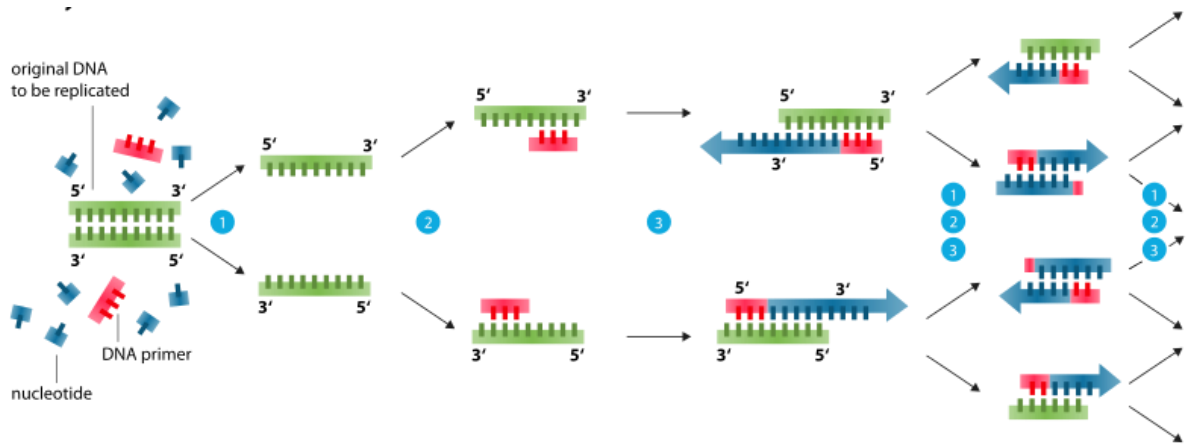
### **1.8.1. Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja**

Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR) je metoda koja se vrlo često koristi u istraživanjima, a temelji se na obrnutom prepisivanju prethodno izolirane RNA u komplementarnu DNA (cDNA) koja se zatim umnaža metodom PCR. RT-PCR se koristi za a) određivanje prisutnosti ili odsutnosti određenog transkripta b) za procjenu razine ekspresije gena i c) kloniranje cDNA. Ova metoda ima vrlo visoku osjetljivost te je stoga pogodna za analizu slabije izraženih gena. RNA služi kao kalup, a reakciju obrnutog prepisivanja omogućuje enzim reverzna transkriptaza koja se odvija se u nekoliko koraka. Prvi korak odnosno denaturacija sekundarnih struktura RNA provodi se zagrijavanjem RNA tijekom 5 minuta pri 65 °C uz dodatak inhibitora RNaze. Nakon toga slijedi sparivanje početnica pri 25 °C i inkubacija na odgovarajućoj temperaturi, za vrijeme koje se odvija sinteza prvog lanca cDNA. Na kraju sinteze cDNA reakcijska smjesa se zagrije do 95 °C, čime se inaktivira reverzna transkriptaza.

### **1.8.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu**

Budući daje RT-PCR semikvantitativna metoda stoga je došlo d razvoja lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*) ili kvantitativni PCR. U reakciji produkti su obilježeni fluorescencijskom bojom, koja se veže za dvolančanu (novonastalu) DNA, a produkti se analiziraju dok nastaju. Stoga, mjerenjem fluorescencije mjeri se razina nastale DNA jer je količina fluorescencije proporcionalna PCR produkta. Ova metoda koristi se za apsolutnu ili relativnu kvantifikaciju DNA/RNA. U slučaju kada odredimo broj kopija RNA u nekom uzorku uspoređujući fluorescenciju sa standardnom krivuljom govorimo o

metodi apsolutne kvantifikacije. Relativnom kvantifikacijom možemo analizirati relativne promjene u količini transkripta (31, 33).



Slika 6. Prikaz PCR procesa (33).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Obzirom na pokazanu uključenosti DPP IV/CD26 u modulaciji imunološkog odgovora tijekom razvoja kolitisa i ključne uloge imunosnih stanica pretpostavka istraživanja je da kroz modulaciju aktivnosti kemokina te medijatora upale DPP IV/CD26 sudjeluje u razvoju upale i/ili procesima cijeljenja u UK.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj DPP IV/CD26 na ključne faktore u migraciji upalnih stanica, to jest MCP-1 kemokina, uspostavom pokusnog modela DSS kolitisa kod divljeg tipa (C57BL/6) i CD26 deficijentnih miševa (CD26<sup>-/-</sup>).

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

#### **3.1. KEMIKALIJE I REAGENSI**

- aceton (Kemika)
- agaroza (Invitrogen, Life Technologies)
- assay diluent RD1W
- calibrator diluent RD5-3
- coomasie Brilliant Blue G-250 (Acros Organics)
- eozin (Shandon Inc)
- etanol (70%, 90%, 96%, 100%), (Kemika)
- etidij-bromid (Sigma)
- hematoksilin (Shandon Inc.)
- izopropilni alkohol (Kemika)
- klorovodična kiselina (Kemika)
- ksilol (Kemika)
- natrijev dekstran-sulfat (DSS) (MP Biomedicals)
- natrijev-hidroksid (Kemika)
- paraformaldehid (4%) (Sigma)
- parafin (Shandon Inc.)
- fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (Sigma)
- tripansko modriilo (Serva)
- tris-borat-EDTA pufer (Invitrogen, Life Technologies)
- vodikov peroksid (30%) (Kemika)
- voda bez nukleaza; Ambiom, Life Technologies

### 3.2. LABORATORIJSKE ŽIVOTINJE

U ovom istraživanju koristile su se dvije vrste miševa koji su dobiveni iz laboratorija „Centre d'Immunologie de Marseille Luminy, Parc Scientifique de Luminy“, Marseille Cedex, Francuska ili uzgajani u središnjem uzgojnom centru Medicinskog fakulteta u Rijeci, starosti od 8 do 12 tjedana i istog spola (mužjaci). Korišteni su miševi soja divlji tip, C57BL/6 i s inaktiviranim genom za molekulu DPP IV/CD26 (CD26<sup>-/-</sup>).

Životinje su hranjene standardnom laboratorijskom hranom (Standard Diet GLP; 4 RF 21, Mucedola) i vodom *ad libitum* te su obitavali u kavezima pri temperaturi od 21 °C i vlažnosti od 50% u režimu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Najmanje 24 h prije početka postupka izazivanja kolitisa i žrtvovanja, miševima je hrana uskraćena.

### 3.3. POKUSNI MODEL KOLITISA

Animalni model kolitisa izazvan je, kod miševa kojima je inaktiviran gen za molekulu CD26 te u divljem tipu miša soja C57BL/6, primjenom natrijev dekstran sulfata (DSS) prethodno otopljenim u vodi za piće u koncentraciji od 3%. Svježa otopina DSS-a pripremala se svakog drugog dana, a miševi su je pili *ad libitum* tokom sedam dana. Kontrolnu skupinu činili su miševi koji su tijekom 7 dana pili pitku vodu. Obje skupine životinja su žrtvovane u istim vremenskim intervalima, a svaka je skupina uključivala 6 – 8 životinja.

Procjena uspostave kolitisa pratila se na dnevnoj bazi temeljem pojavnosti i intenzitet markera upalnog procesa: konzistencija stolice, tjelesna težina, opće stanje životinje i pojave krvi u stolici odnosno vidljivog krvarenja u području rektuma. Prisustvo krvi u stolici dokazano je uz pomoć Hemocult II SENSEA testa (Beckman Coulter, USA). Svaki od

navedenih parametara je bodovan prema kriterijima navedenim u tablici 5. te je zbrajanjem pojedinih bodova određen ukupni zbroj bodova odnosno indeks aktivnosti bolesti.

**Tablica 4. Kriteriji za izračunavanje indeksa aktivnosti bolesti**

| <i>Bodovi</i> | <i>Gubitak tjelesne mase (%)</i> | <i>Konzistencija stolice</i>                  | <i>Rektalno krvarenje</i>                                 |
|---------------|----------------------------------|---|---|
| <b>0</b>      | <5%*                             | Uredna stolica                                | Nije prisutno<br>(negativan hemokult)                     |
| <b>1</b>      | 5-10%                            |   | Pozitivan hemokult  |
| <b>2</b>      | 10-15%                           | Mekana stolica<br>(ljepljiva i poluformirana) | Blago krvarenje (pozitivan hemokult i vidljivo krvarenje) |
| <b>3</b>      | 15-20%                           |   |   |
| <b>4</b>      | >20                              | Dijareja (tekuća stolica)                     | Opsežno 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%.

Broj bodova kretao se u rasponu od 0 (nema bolesti) do 12 (maksimalna aktivnost bolesti).

Nakon žrtvovanja, a u cilju procjene intenziteta upale izmjerena je duljina izdvojenog dijela debeloga crijeva te se zabilježila masa.

### **3.4. UZIMANJE BIOLOŠKIH UZORAKA**

Neposredno prije žrtvovanja uzeti su uzorci krvi iz koje su nakon centrifugiranja izdvojeni uzorci seruma. Nakon žrtvovanja izolirano je tkivo debelog crijeva od cekuma do završnog dijela, rektuma. Kao što je navedeno, tkivo je izvagano i određena mu je dužina, a nakon što je isprano u fiziološkoj otopini, podjeljeno je u nekoliko dijelova. U svrhu pripreme histoloških preparata, jedan do dva uzorka su, narezani na manje dijelove te uronjeni u 4%-tni

paraformaldehid, a preostali uzorci debelog crijeva su, do daljnjih analiza, smrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni na -80 °C.

### **3.5. PRIPREMA PREPARATA ZA HISTOLOŠKE ANALIZE**

Nakon fiksacije uzoraka debelog crijeva u 4% paraformaldehidu tijekom 24 h tkivo je uranjano u otopine etanola rastuće koncentracije 70, 80, 96% te apsolutni alkohol s ciljem uklanjanja vode iz uzoraka. Nakon dehidracije, a u cilju postizanja prozirnosti tkiva ono je uronjeno u ksilol te na kraju u smjese parafina rastuće koncentracije. Za potrebe provođenja postupka odnosno održavanja parafina u tekućem agregatnom stanju i postupne zamjene ksilola parafinom postupak zahtjeva temperaturu od 50 °C do 60 °C. Parafinski blokovi tkiva narezani su uz pomoć mikrotoma, za histološka ili imunohistokemijska bojanja. Rezovi tkiva debljine 2-4 µm su adhenirana su na silanizirana predmetna stakalca.

### **3.6. HEMATOKSILIN - EOZIN BOJANJE**

Rutinsko histološko hematoksilin – eozin bojanje tkiva (HE), provodi se zbog prikazivanja patohistoloških promjena na razini debelog crijeva. Za detekciju koriste se dvije vrste boja: hematoksilin koja kisele stanične strukture boji plavo te eozin koji crveno oboji bazične dijelove stanice. Samom procesu prethodi postupak deparafinizacije i rehidracije tkiva uklopljenog u parafin. Parafin se uklanja na način da se preparat uroni u otopinu ksilola. Tkivo se rehidrira uranjanjem u otopinu alkohola padajuće koncentracije. Nakon navedenog, ispiri se u destiliranoj vodi te se onda provodi HE bojanje. Slijedi inkubacija u trajanju od 3 minute, a preparati se ispiru 2x u 10 minuta u tekućoj vodi i diferenciraju u otopini HCl alkohola 5 sekundi. Nakon toga opet slijedi faza ispiranja u tekućoj vodi u istom

vremenskom periodu. Sljedeća faza inkubacije u otopini eozina traje 5 minuta, a proces ispiranja se provodi 4 puta u 5 minuta u destiliranoj vodi. Rehidracija se provodi kroz otopine etanola po 1 minutu, a u ksilolu 3x po 5 minuta. Kroz 24 sata, tkiva je potrebno osušiti na zraku i uklopiti u entelan te na kraju prekriti pokrivnim stakalcem.

### **3.7. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE MCP-1 IMUNOENZIMSKIM TESTOM**

Koncentracija MCP-1 u uzorku kolona i u serumu određena je imunoenzimskim testom ELISA proizvođača R & D na čitaču mikrotitarskih pločica EL808 (BioTek, VT, SAD). Po principu djelovanja, ovaj test svrstava u „sendvič“ ELISA testove. U jažice mikrotitarske pločice, na čijoj je podlozi adsorbirano primarno protutijelo specifično za MCP-1, dodano je 200  $\mu$ L uzorka, homogenata kolona ili seruma. Na temelju prethodno provedenog pilot pokus, utvrđeno je optimalno razrjeđenje uzorka te se homogenat kolona razrjeđivao 10 puta, serum, prema uputama proizvođača dva puta. Također, u jažice je dodan i 200  $\mu$ L standard MCP-1 u sljedećim razrjeđenjima: 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL i 31.3 pg/mL te je uslijedila dvosatna inkubacija. Mikrotitarske pločice su inkubirane na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije uslijedilo je ispiranje pločice kako bi se uklonili antigeni koji se nisu vezali na primarna protutijela. Ispiranje se provelo uz pomoć pufera za ispiranje koji je pripremljen prema uputama proizvođača. Nakon ispiranja u jažice je dodano je protutijelo konjugirano s molekulom peroksidaze.. Inkubacije je trajala 2 sata nakon čega se dodala 200  $\mu$ L otopine supstrata, inkubacija je trajala 30 minuta na sobnoj temperaturi, a mikrotitarska pločica se zaštitila od svjetlosti. Ukoliko je došlo do vezivanja MCP-1, dodatkom supstrata, TMB doći će do razvoja plave boje u jažicama. Kako bi se zaustavila reakcija u jažice je dodano 50  $\mu$ L sulfatne kiseline te se izmjerila apsorbancija pri  $\lambda$  450 nm. Izračunat je prosjek duplikata izmjerenih apsorbancija za svaki standard odnosno uzorak te je oduzeta vrijednost apsorbancije standarda 0. Koncentracija MCP-1 određena je



pomoću programske podrške KC Junior čitača mikrotitarskih pločica prema baždarnoj krivulji standarda iz jednadžbe 4-parametarskog logističkog modela.

### **3.8. ISTRAŽIVANJE NA EKSPERIMENTALNIM ŽIVOTINJAMA**

Provedeno istraživanje odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci te se provodi u sklopu znanstvenoistraživačkog projekta „Uloga proteina obitelji DPP IV u kroničnim bolestima (br. 13.06.1.2.26; voditelj, prof. dr. sc. Jadranka Varljen)“. Prilikom provođenja navedenog istraživanja na pokusnim životinjama sve je provedeno uz poštivanje zakona, propisa i u skladu s načelima 3R (1. nadomještanje životinja – engl. *Replacement*, 2. smanjenje broja životinja – engl. *Reduction* i 3. oplemenjivanje postupaka prema životinjama – engl. *Refinement*).

### **3.9. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Brojčani rezultati pohranjeni su u bazu podataka uz pomoć Microsoft Excell programa, a program STATISTICA 10 je korištena za statističku obradu podataka. Student t testom ili neparametrijskim Mann-Whitney U test korišteni su prilikom dokazivanja statistički značajne razlike između ispitivanih grupa (razina od  $P < 0,05$  je statistički značajna). Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

## **4. REZULTATI**

### **4.1. PROCJENA RAZVOJA I INTENZITETA KOLITISA**

Uspostava kolitisa, intenzitet upale i cijeljenje sluznice debelog crijeva pratio se uz pomoć prethodno navedenih kliničkih, makroskopskih i histoloških parametara u obje ispitivane skupine miševa odnosno u skupinama životinja u kojima je izazvan kolitis te u kontrolnoj skupini. Procjena razvoja kolitisa podijeljena je na sistemске i lokalne promjene budući da se tijekom razvoja kolitisa, kako u humanom obliku tako i u animalnom modelu, simptomi odnosno prateće promjene su prisutne upravo na te dvije razine. Nadalje, životinje kojima je izazvan kolitis žrtvovane su u tri vremenske točke (3, 7 i 20 dan) kako bi se pratio razvoj kolitisa (3. dan) te utvrdila uspostava (7. dan) i oporavka sluznice debeloga crijeva. Na temelju prikupljenih podataka zaključeno je da su miševi oba soja podložni razvoju induciranog kolitisa oralnom primjenom DSS otopine. Treći dan pokusnog perioda predstavlja fazu razvoja kolitisa, sedmi dan akutnu fazu, koja održava intenzitet do 9 ili 10 dana pokusnog perioda nakon čega slijedi razdoblje oporavka. Dvadeseti dan pokusnog razdoblja predstavlja vremensku točku u kojoj su se životinje u potpunosti oporavile.

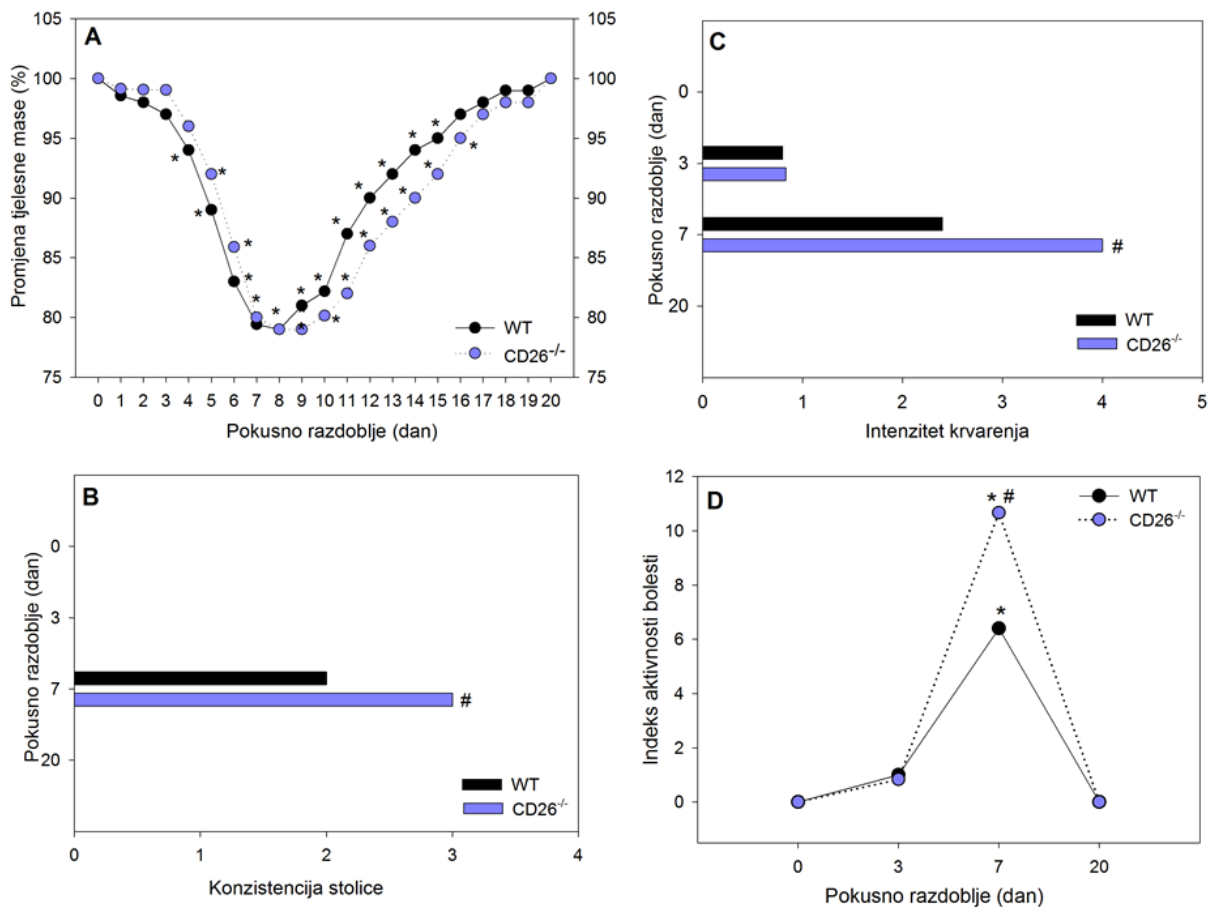
#### **4.1.1. Sistemske promjene tijekom pokusnog razdoblja**

Tijekom pokusnog razdoblja odnosno svaki dan, od početka primjene DSS otopine do žrtvovanja životinje, pratilo se opće stanje svake pojedine životinje. Kao što je prethodno navedeno, za svaku pojedinu životinju bilježena je promjena tjelesne mase, konzistencija

stolice te pojava krvi u stolici te je temeljem navedenih parametara izračunat indeks aktivnosti bolesti.

Razvojem kolitisa postepeno se pogoršavalo opće stanje životinja, a simptomi su bili najintenzivniji u razdoblju od 7. do 10. dana pokusnog perioda. U tom razdoblju životinje su imale slabiji interes za hranom, smanjenu tjelesnu aktivnost te u nekim slučajevima zgrčen položaj tijela. Prethodno opisani simptomi bili su prisutni u obje ispitivane skupine životinja, od 10. dana su polako slabili, a u potpunosti su se izgubili do 15. odnosno 20. dana pokusnog razdoblja.

Prosječna tjelesna masa miševa oba soja izražena je po skupinama te danom žrtvovanja. Tjelesna masa miševa u nultoj točki odnosno prvom danu pokusnog razdoblja, kada je životinjama u vodu za piće otopljen DSS, značajno se razlikovala među sojevima. CD26<sup>-/-</sup> miševi imaju manju tjelesnu masu u usporedbi s C57BL/6 miševima iste dobne skupine. Obzirom na zabilježene razlike u tjelesnoj masi između sojeva, te da bi se tjelesna masa iste skupine miševa što točnije izrazila promjena tjelesne mase tijekom razvoja kolitisa prikazana je kao omjer mase u trenutku žrtvovanja i početne tjelesne mase, a izražena je kao postotak (%) (Slika 7A). Značajan gubitak tjelesne mase u oba soja miševa s DSS-kolitisom uočen je četvrtog ili petog dana pokusnog razdoblja. Sedmi dan se opisuje kao početak akutne faze upale budući da su klinički simptomi i gubitak tjelesne mase najizraženiji u oba soja miševa u odnosu na početnu vrijednost. Međutim, u CD26<sup>-/-</sup> miševa se može uočiti i minimalan, ali ne i značajan, gubitak tjelesne mase tijekom 8 i 9 dana nakon čega slijedi oporavak odnosno razdoblje postepenog povećanja mase. U C57BL/6 miševa to razdoblje gubitka tjelesne mase je nešto kraće odnosno već devetog dana vidimo promjenu u pozitivnom smjeru. Prema grafičkom prikazu porast tjelesne mase je nešto brži u CD26<sup>-/-</sup> miševa (Slika 7A).



**Slika 7. Sistemske promjene tijekom razvoja kolitisa i oporavka u C57BL/6 i CD26 deficijntnim (CD26<sup>-/-</sup>) miševima**

DSS tretirani C57BL/6 (WT) i CD26<sup>-/-</sup> miševi žrtvovani su 3., 7. i 20.dana. Promjena tjelesne težine izražena kao prosječni postotak početne tjelesne težine (A). Promjene konzistencije stolice tijekom pokusnog razdoblja (B). Prikaz intenziteta krvarenja (C). Indeks aktivnosti bolesti (D). Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost ± standardno odstupanje.  $n = 6-8$  miševa/skupini. \*značajno različito u usporedbi s kontrolnom skupinom (dan 0). #značajna razlika u odnosu na istu skupinu drugog soja životinja. Razina značajnosti je  $P < 0,05$ .

Razvojem kolitisa pojavljuje se krv u stolici te se mijenja konzistencija stolice. Krvarenje je u fazi razvoja kolitisa okultno te je stoga pozitivan hemokult test. Prva pojava okultnog krvarenja zabilježena je 3. dana pokusnog perioda. Intenzitet krvarenja se povećava proporcionalno oštećenju sluznice debelog crijeva te je, kako se može vidjeti na slici 1B, najintenzivnije u akutnoj fazi kolitisa, 7. dan. Radi se o vidljivom rektalnom krvarenju koje ostaje prisutno sve do 10. dana pokusnog perioda (slika 8.). Uz prisutno krvarenje, stolica je ljepljiva, mekana i tamno smeđe boje zbog prisutnog krvarenja.



**Slika 8. Rektalno krvarenje u akutnoj fazi kolitisa**

Prethodno navedeni simptomi, promjene općeg stanja i promjene tjelesne mase i slezene nisu zapažene u kontrolnoj skupini životinja (0 dan).

Nadalje, kao indirektni odnosno sistemski pokazatelj intenziteta upalnog procesa pratila se i promjena mase slezene. Primjena DSS otopine rezultirala je povećanjem mase slezene u obje skupine miševa. U C57BL/6 miševa povećanje mase je bilo značajno u akutnoj fazi bolesti te tijekom oporavka (7-15 dan pokusnog perioda) dok je kod CD26<sup>-/-</sup> miševa bilo značajno samo 7. dana (rezultati nisu prikazani).

#### 4.1.2. Lokalne promjene tijekom pokusnog razdoblja

Lokalne promjene uključuju makroskopske, promjena dužine debelog crijeva, te mikroskopske (pathistološke) promjene. Stoga je prilikom žrtvovanja izdvojen dio debelog crijeva od cekuma do anusa. Uzorku debelog crijeva je izmjerena dužina i masa te se zatim razdjelio na nekoliko manjih djelova za daljnje analize uključujući patohistološku.

Skraćenje debelog crijeva zabilježeno je u obje skupine miševa dok u kontrolnoj skupini životinja takve promjene nisu zabilježene (slika 9.). Sedmi dan pokusnog perioda predstavlja razdoblje uspostave akutne faze kolitisa te je, kako je vidljivo na slici 8., tog dana i dužina debelog crijeva značajno manja u usporedbi s ostalim vremenskim točkama.



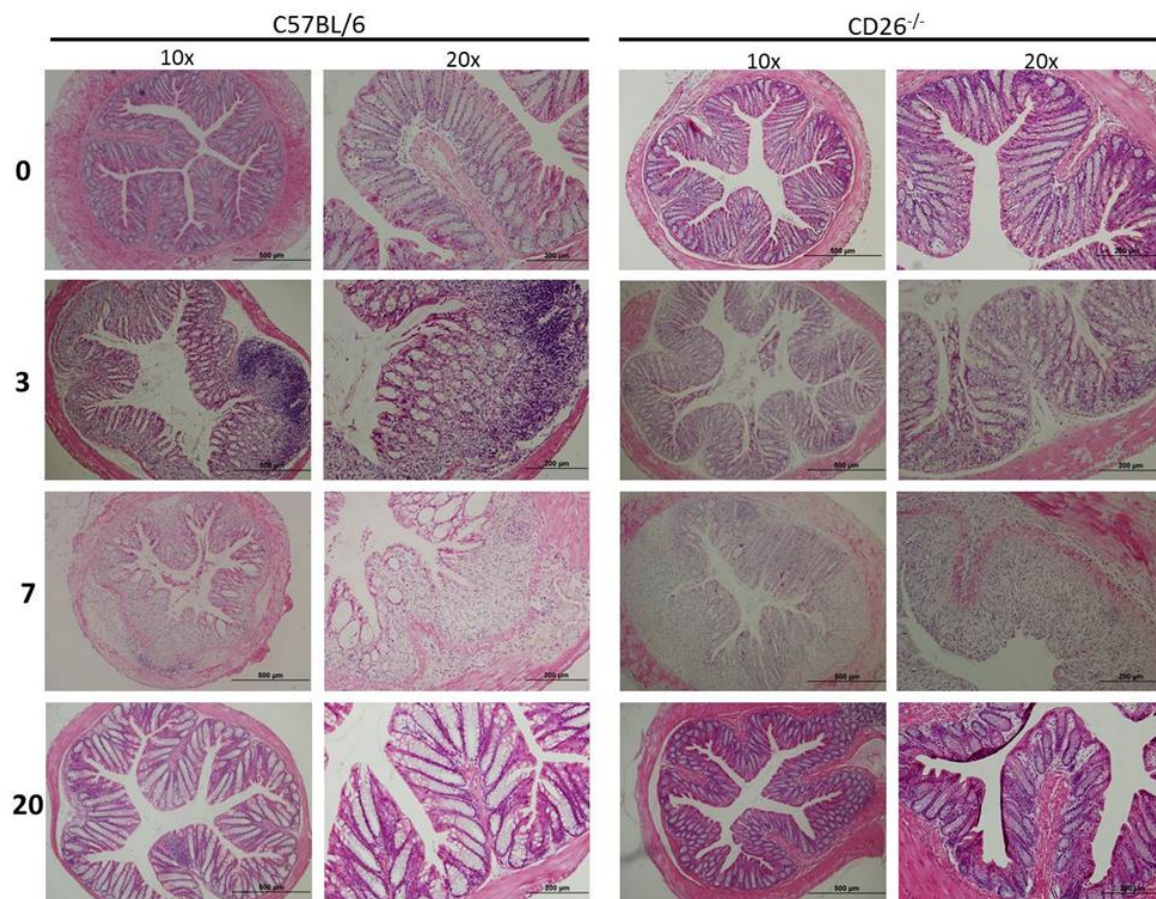
**Slika 9. Makroskopske promjene debeloga crijeva tijekom razvoja kolitisa u CD26<sup>-/-</sup> miševa.**

Ovakav obrazac promjena prisutan je u obje skupine miševa tretirane s DSS otopinom (5,9 cm u CD26<sup>-/-</sup> i 6,0 cm u C57BL/6) dok u kontrolnoj skupini takve promjene nisu bile prisutne (8,5 cm u CD26<sup>-/-</sup> i 8,8 cm u C57BL/6). Tijekom oporavka skraćenje debelog crijeva je sve manje te dvadesetog dana doseže dužinu kontrolnih vrijednosti (8,0 cm u CD26<sup>-/-</sup> i 9,1 cm u C57BL/6).

Makroskopskim pregledom izdvojenih debelih crijeva miševa s DSS kolitisom žrtvovanih u različitim vremenskim periodima uočene su makroskopske promjene koje su bile najintenzivnije sedmog dana pokusnog razdoblja. U oba soja miševa nastupa osim prethodno spomenutog skraćenja i zadebljanje stjenke debeloga crijeva koje je u pojedinim slučajevima napunjeno većim fekalnim peletima. U gotovo svih pokusnih životinja zabilježeno je prosijavanje krvi kroz stjenku debeloga crijeva u akutnoj fazi bolesti. Lezije crijevne stjenke, kao jedna od mogućih i opisanih komplikacija, zabilježene su u malom broju slučajeva. Kod miševa žrtvovanih dvadesetog dana te su promjene u potpunosti nestale te makroskopski crijevo izgleda identično onomu miša kontrolne skupine.

Primjena DSS otopine rezultirala je oštećenjem sluznice te razvojem vrlo sličnih patohistoloških promjena u oba soja miševa koje su karakteristične za akutni upalni proces. Na slici 10. prikazane su patohistološke promjene prisutne tijekom razvoja te u akutnoj fazi kolitisa C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa. Promjene sluznice nisu se razlikovale po intenzitetu ili vremenu pojavljivanja između sojeva. Tijekom razvoja kolitisa odnosno 3. dana pokusnog perioda na reprezentativnim histološkim preparatima vidljivo je smanjenje širine kripti s tog područja s infiltracijom upalnih stanica. Razvojem upalnog procesa oštećenje sluznice debelog crijeva se pojačava tako da je najintenzivnije 7. dana. U tom razdoblju, na oštećenim područjima može se uočiti nekroza sluznice koja je ujedno i obilno prožeta upalnim stanicama, posebice neutrofilnim granulocitima, kao i leukocitima koji se polako raspadaju ili su se raspali, uz područja krvarenja i nastanak nekrotičnog detritusa. U području podsluznice

izražen je edem te proboj upalnih stanica u mukožu *lamine muscularis*, a mogu se uočiti i žarišna područja transmuralne raspodjele stanica. Tijekom oporavka odnosno zarastanja upalom oštećenog tkiva patohistološki znakovi upale postepeno nestaju.



**Slika 10. Patohistološke promjene stijenke debelog crijeva u C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa uslijed djelovanja natrijevog dekstran sulfata (DSS).**

Hematoksilinom i eozinom obojeni poprečni presjeci stijenke debelog crijeva koji pokazuju razvoj upalnih promjena (3. i 7. dan) te zacjeljenje odnosno potpuni oporavak sluznice (20. dan) u C57BL/6 i CD26-deficijentnim životinjama (CD26<sup>-/-</sup>). Kontrolna skupina označena je kao "0".  $n = 6-8$  miša/skupina. Izvorno povećanje, prvi i treći stupac 10x; drugi i četvrti stupac 20x.

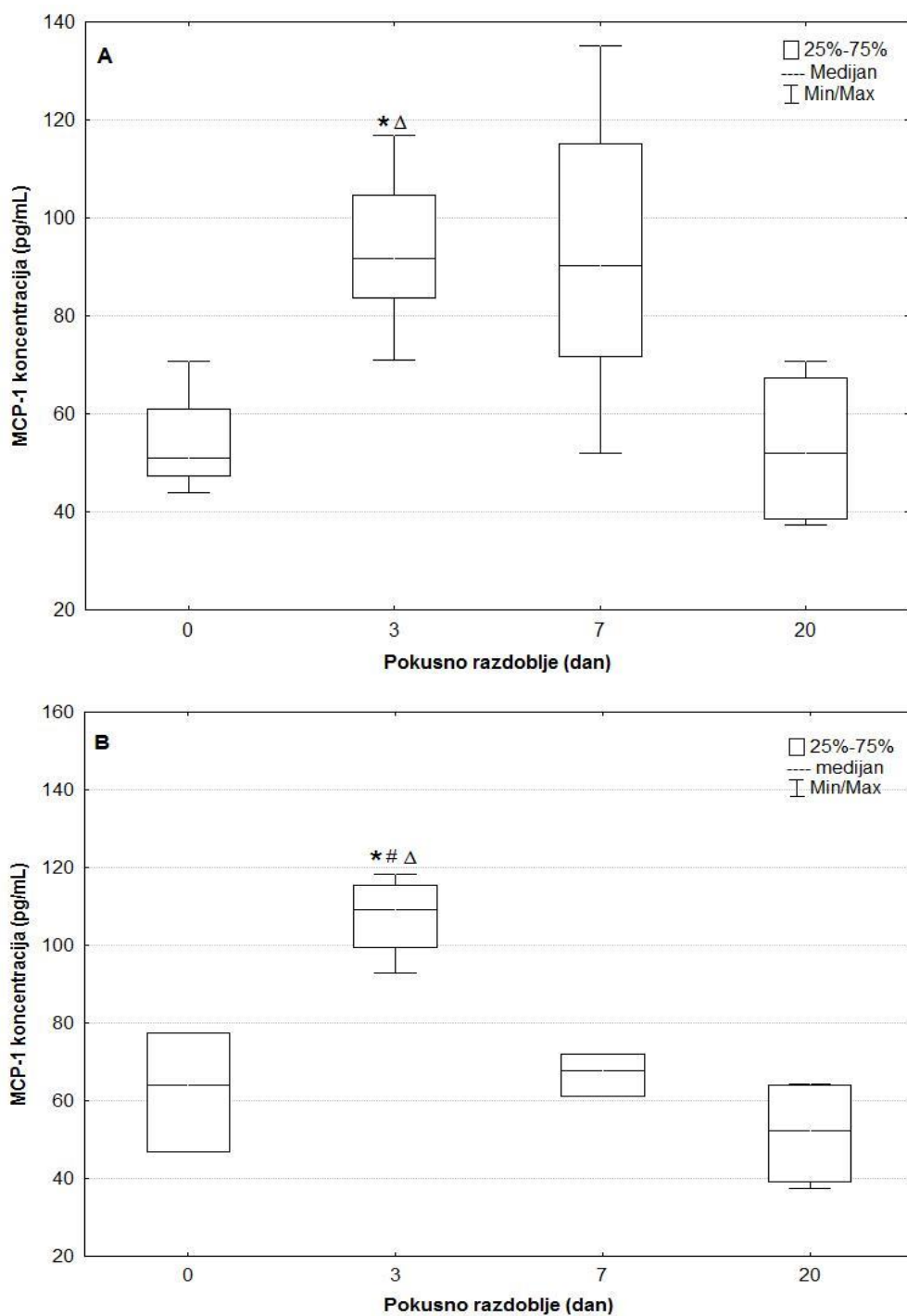


## **4.2. PROMJENE IZRAŽAJA MCP-1 TIJEKOM RAZVOJA DSS KOLITISA I OPORAVKA NA SISTEMSKOJ I LOKALNOJ RAZINI**

Obzirom na plan pokusa promjene u izražaju MCP-1 u C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševima pratile su se na proteinskoj i transkripcijskoj razini od primjene DSS otopine do dana žrtvovanja u tri vremenske točke, u fazi razvoja kolitisa (3. dan), akutne upale (7. dan), i potpunog oporavka (20. dan) te uspoređivane s kontrolnom skupinom.

### **4.2.1. Proteinski izražaj MCP-1 na sistemskoj i lokalnoj razini tijekom pokusnog razdoblja**

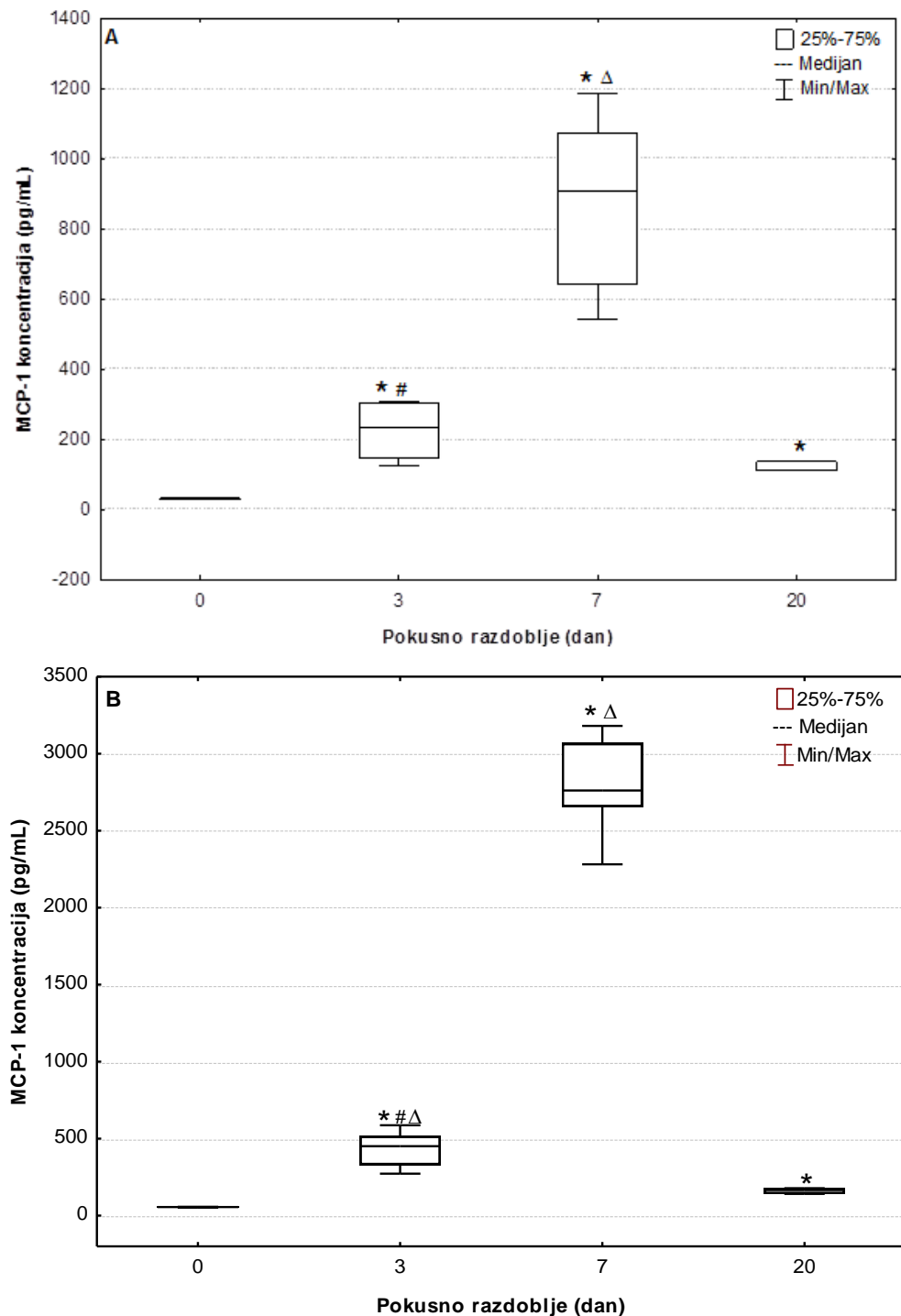
Na slici 11. prikazane su promjene koncentracije MCP-1 u serumu ispitivanih skupina pokusnih životinja oba soja. Kako se vidi iz slike koncentracija MCP-1 tijekom razvoja kolitisa raste u odnosu na kontrolnu skupinu i to kod C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> životinja. U C57BL/6 miševa porast koncentracije zabilježen trećeg dana pokusnog razdoblja značajan je u odnosu na kontrolnu skupinu te 20. dana pokusnog razdoblja. Trend porasta vrijednosti koncentracije MCP-1 nastavlja te je značajan porast zabilježen i u akutnoj fazi upale, ali samo kod C57BL/6 životinja. Do dvadesetog dana pokusnog razdoblja vrijednosti koncentracije MCP-1 polako padaju, u obje skupine miševa dolazi do normalizacije koncentracija te su 20. dana na razini fiziološke vrijednosti (dan 0).



**Slika 11. Koncentracija MCP-1 tijekom razvoja kolitisa u serumu C57BL/6 (A) i CD26<sup>-/-</sup> (B) miševa.**

MCP-1, Čimbenik privlačenja monocita-1.\*značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu (0 dan), # značajna razlika u odnosu na akutnu fazu bolesti (7. dan), Δznačajna razlika u odnosu na fazu potpunog opravka (20. dan). Razina značajnosti je  $P < 0,05$ .  $n = 6-8$  miševa/skupini.

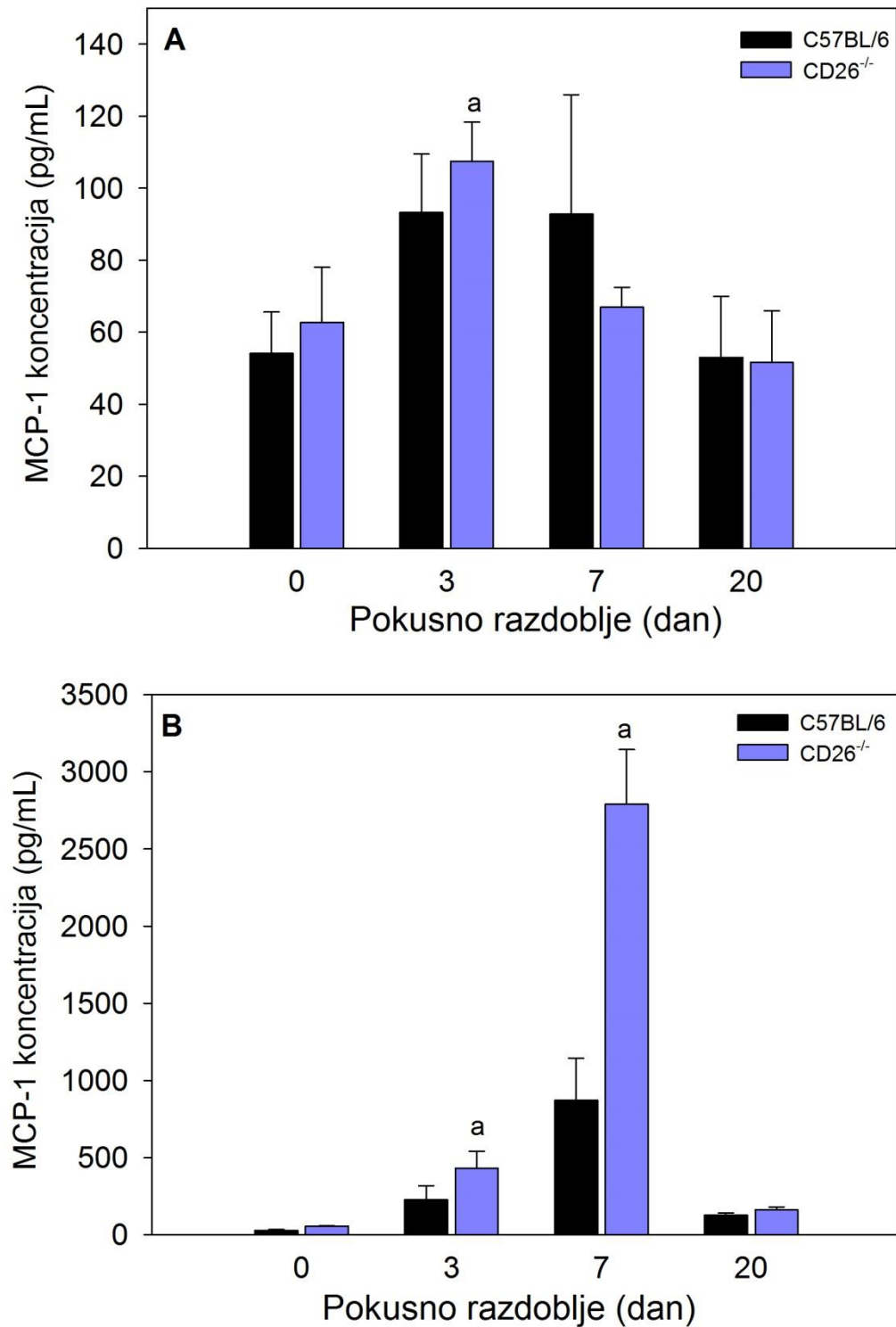
Na slici 12. prikazane su promjene koncentracije MCP-1 na lokalnoj razini, debelome crijevu ispitivanih skupina pokusnih životinja oba soja. Koncentracija MCP-1 u debelome crijevu C57BL/6 miševa mijenja se značajno tijekom pokusnog razdoblja (slika 12A). Već trećeg dana pokusnog razdoblja uočava se značajan porast koncentracije u odnosu na kontrolnu skupinu u obje ispitivane skupine miševa. Također, napredovanjem kolitisa vidljiv je daljnji porast koncentracije ovog proteina. Stoga, vrijednost zabilježena sedmog dana kolitisa značajno je povišena u odnosu na zdrave životinje te 3. dan pokusnog razdoblja u oba soja životinja. No, do dvadesetog dana pokusnog razdoblja koncentracija MCP-1 polako pada i i približavaju se fiziološkim vrijednostima (dan 0).



**Slika 12. Koncentracija MCP-1 tijekom razvoja kolitisa u debelome crijevu C57BL/6 (A) i CD26<sup>-/-</sup> (B) miševa.**

MCP-1, Čimbenik privlačenja monocita-1. \*značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu (0 dan), # značajna razlika u odnosu na akutnu fazu bolesti (7. dan), Δ značajna razlika u odnosu na fazu potpunog oporavka (20. dan). Razina značajnosti je  $P < 0,05$ .  $n = 6-8$  miševa/skupini

Na slici 13. mogu se pratiti i usporediti promjene koncentracije MCP-1 u serumu i debelome crijevu između sojeva. U fiziološkim uvjetima vrijednosti MCP-1 se ne razlikuju značajno. Vidljivo je da promjene koncentracije imaju isti ili gotovo identičan obrazac ponašanja odnosno porast koncentracije tijekom razvoja kolitisa te normalizacija vrijednosti do 20. dana pokusnog razdoblja. Međutim, intenzitet porasta izražaja MCP-1 između sojeva se značajno razlikuje, posebice trećeg dana u serumu te trećeg i sedmog dana u debelome crijevu. U serumu CD26<sup>-/-</sup> životinja u akutnoj fazi kolitisa vidljiv je pad koncentracije MCP-1 u odnosu na treći dan kolitisa i u odnosu na C57BL/6 životinje. Posebno je zanimljiv porast izražaja na razini proteina u debelome crijevu u akutnoj fazi kolitisa u CD26<sup>-/-</sup> životinja budući da je u usporedbi s C57BL/6 sojem dvostruko veći.



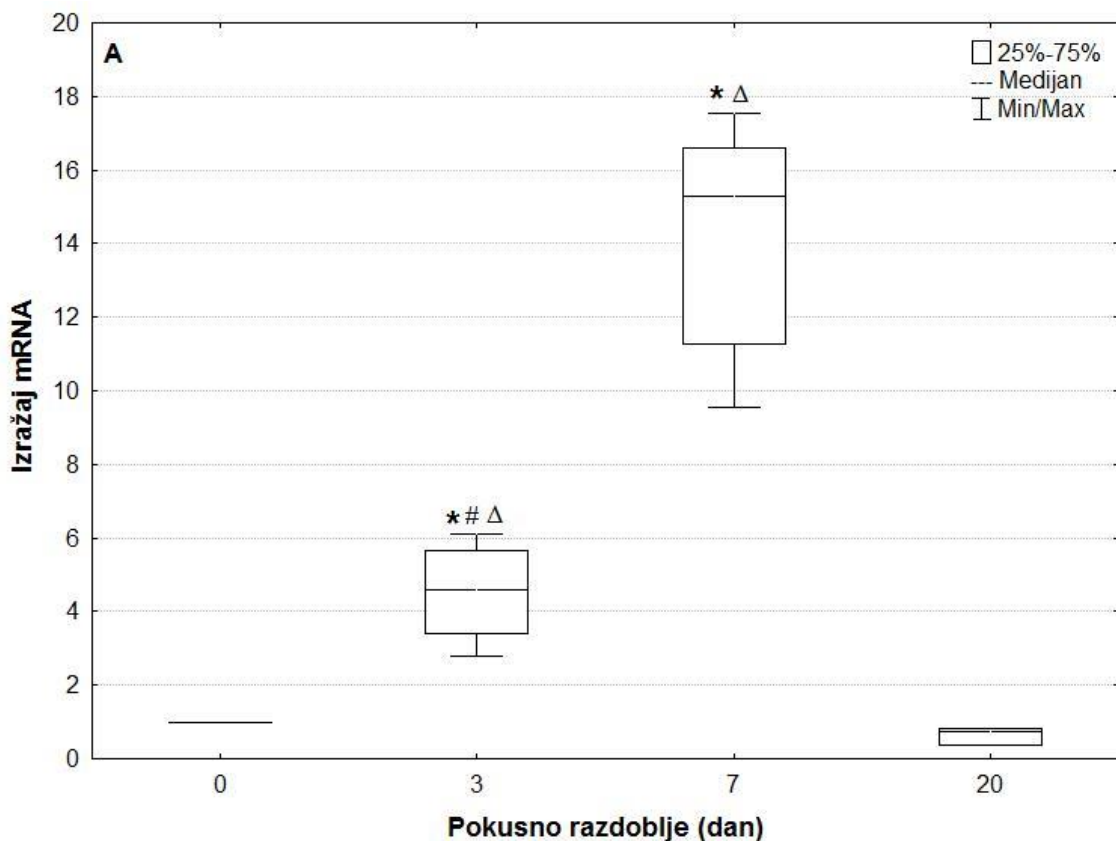
**Slika 13. Usporedba koncentracija MCP-1 u serumu (A) i debelome crijevu (B) pokusnih životinja s DSS kolitismom i kontrolne skupine.**

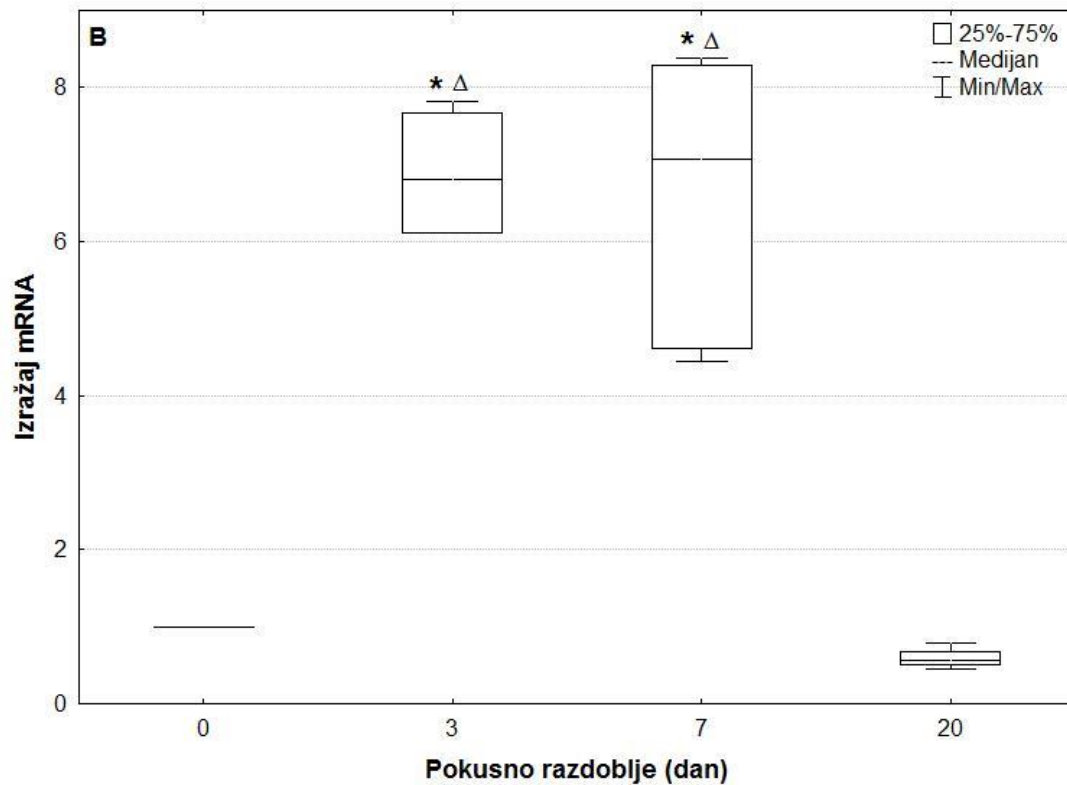
MCP-1, čimbenik privlačenja monocita-1. <sup>a</sup> značajna razlika u odnosu na istu skupinu drugog soja životinja. Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost ± standardno odstupanje. *n* = 6-8 miševa/skupini. Razina značajnosti je  $P < 0,05$ .

#### 4.2.2. Transkripcijski izražaj MCP-1 u debelome crijevu tijekom pokusnog razdoblja

Na slici 14. prikazane su promjene izražaja na transkripcijskoj razini u debelom crijevu ispitivanih skupina pokusnih životinja oba soja. Vidljivo je da se izražaj MCP-1 u C57BL/6 miševa mijenja značajno tijekom pokusnog razdoblja (slika 14).

Porast u odnosu na kontrolnu skupinu se uočava već nakon 3. dana gdje nastavlja rasti do 7. dana. Trend porasta vrijednosti izražaja nastavlja se i u aktivnoj fazi upale. U oba soja životinja nakon 7. dana, izražaj počinje lagano opadati te do 20. dana dolazi do normalizacije i približavanja fiziološkim vrijednostima, osobito kod C57BL/6 miševa.



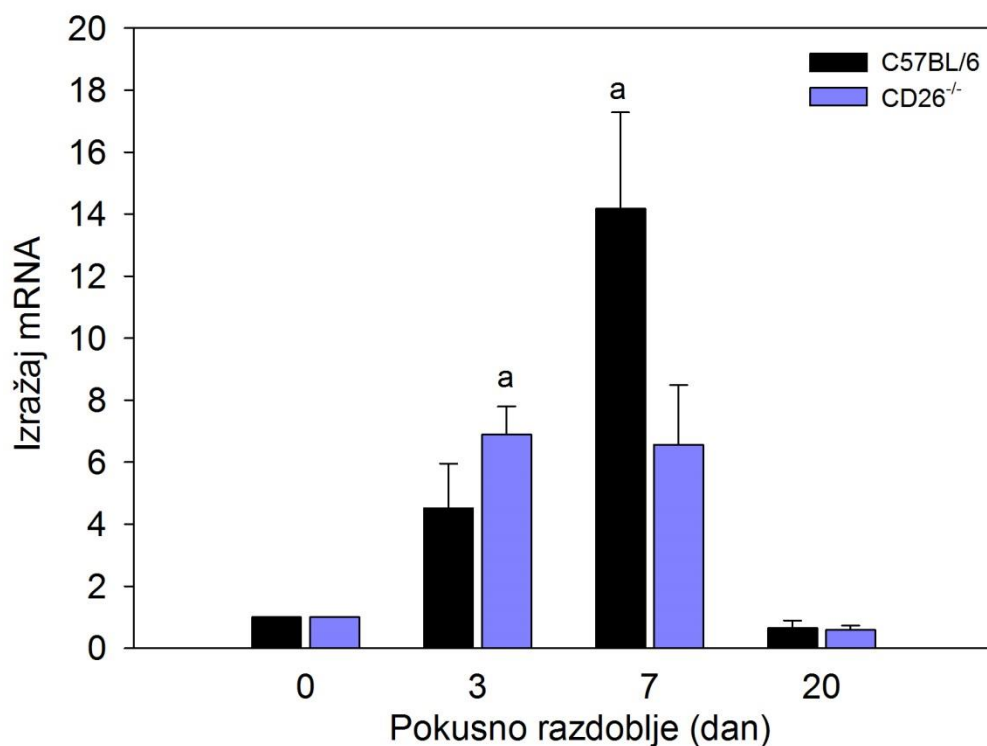


**Slika 14. Transkripcijska aktivnost MCP-1 gena u debelome crijevu C57BL/6 (A) i CD26<sup>-/-</sup> (B) i miševa u fazi razvoja kolitisa i oporavka te kontrolne skupine.**

MCP-1, Čimbenik privlačenja monocita-1. \*značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu (0 dan), #značajna razlika u odnosu na akutnu fazu bolesti (7. dan), Δznačajna razlika u odnosu na fazu potpunog oporavka (20. dan).  $n = 6-8$  miševa/skupini. Razina značajnosti je  $P < 0,05$ .



Na slici 15. mogu se pratiti i usporediti promjene transkripcijske aktivnosti MCP-1 između sojeva. U fiziološkim uvjetima vrijednosti MCP-1 se ne razlikuju značajno. Vidljivo je da promjene izražaja gena imaju značajan porast tijekom razvoja kolitisa te se ona zadržava u akutnoj fazi, dolazi do normalizacije vrijednosti do 20. dana pokusnog razdoblja. U fazi razvoja kolitisa intenzitet porasta između sojeva značajno se razlikuje, posebice trećeg dana u CD26<sup>-/-</sup> te sedmog dana u C57BL/6 životinja. Nadalje, iz slike se može iščitati da je porast izražaja mRNA za MCP-1 protein u C57BL/6 skupini gotovo dvostruko veći nego u CD26<sup>-/-</sup> životinjama.



**Slika 15. Usporedba transkripcijske aktivnosti gena MCP-1 između C57BL/6 i CD26<sup>-/-</sup> miševa u debelome crijevu.**

MCP-1, Čimbenik privlačenja monocita-1. <sup>a</sup>značajna razlika u odnosu na istu skupinu drugog soja životinja.  $n = 6-8$  miševa/skupini. Razina značajnosti je  $P < 0,05$ .

## 5. RASPRAVA

U regulaciji razvoja i popravka oštećenja sluznice crijeva sudjeluju različite molekule kao što su citokini, kemokini i faktori rasta, te različiti enzimi među kojima nalazimo metaloproteaze, katepsin-cistein proteaze i serinske proteaze (34). DPP IV/CD26 je serinska proteaza za koju je pokazano da ima važnu ulogu u migraciji, adheziji i apoptozi stanica što upućuje na pretpostavku da ima potencijalnu važnu ulogu u procesu razvoja upale (35). S obzirom na to da još nije dovoljno istraženo na koji način ova molekula utječe na razvoj i rezoluciju kolitisa, cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj DPP IV/CD26 na ključne faktore u migraciji upalnih stanica, to jest MCP-1 kemokina, uspostavom pokusnog modela DSS kolitisa kod divljeg tipa (C57BL/6) i CD26 deficijentnih miševa (CD26<sup>-/-</sup>).

Pokazane promjene sistemske i lokalne, u debelom crijevu, potvrđuju da je u obje skupine miševa, nakon primjene DSS otopine, došlo do razvoja upalnog procesa odnosno oštećenja sluznice crijeva koji se manifestirao kliničkim, histološkim, imunološkim promjenama. Također, dobiveni rezultati potvrđuju prethodno utvrđen slijed događaja u razvoju animalnog modela kolitisa koju čine tri faze ili razdoblja. Prva odnosno prvih šest dana pokusnog perioda ulaze u razdoblje razvoja kolitisa. Drugo razdoblje čini akutnu fazu koja prema literaturnim podacima, a i našim rezultatima, započinje sedmog dana i nastavlja se još 2-3 tijekom pokusnog razdoblja. U akutnoj fazi sistemske i lokalne simptome su najizraženiji. Treće razdoblje, započinje oko 10 dana, a završava između 15. i 20. dana ovisno o stupnju oštećenja sluznice. Ovo razdoblje predstavlja rezoluciju odnosno uspostavu uvjeta, na sistemske i lokalne razine, kao na početku pokusa odnosno u fiziološkim uvjetima (36). Temeljem dobivenih rezultata vidimo da u razdoblju razvoja kolitisa postoji blagi gubitak tjelesne mase, pojava okultnog krvarenja te skraćivanje crijeva te da te promjene dovode do porasta indeksa aktivnosti bolesti u obje skupine miševa. U skladu s rezultatima možemo

zaključiti da ne postoji razlika u brzini razvoja kolitisa između ispitivanih skupina. Međutim, u akutnoj fazi kolitisa simptomi intenzitet krvarenja, konzistencija stolice su značajno jače izraženi u CD26<sup>-/-</sup> miševima. Nadalje, gubitak mase je duže izražen nego u C57BL/6 miševima te stoga možemo zaključiti da ne postoji značajna razlika u intenzitetu akutne faze kolitisa između ispitivanih skupina. Unatoč tome što sistemski i lokalni simptomi u CD26<sup>-/-</sup> miševa traju nešto duže nego u C57BL/6 miševa oni ulaze u fazu oporavka i unatoč malom kašnjenju oporavljaju se do 15. ili 20. dana pokusnog razdoblja kao i C57BL/6 miševi (13).

MCP-1 ima vrlo važnu ulogu u mnogim patološkim procesima posebice s upalnim stanjima koja su povezana aktivacijom upalnih stanica, ali i reumatskim oboljenjima te bakterijskim infekcijama i bolestima bubrega. Nadalje, studije su pokazale i povišenu vrijednost MCP-1 proteina u serumu 24 sata nakon infarkta miokarda te u stanjima ishemije jetre i bubrega. Kao što i samo ime kaže, MCP-1 je snažni medijator u procesu privlačenja monocita na mjesto upale ili ozljede tkiva. U prilog tome govore i istraživanja u kojima je pokazano da uslijed delecije MCP-1 kemkina smanjuje se snaga privlačenja monocita i/ili prethodno formirane makrofage iz krvi u upalnom oštećeno tkivo, a slabiji Th1 imunološki odgovor konačan je rezultat. Osim toga, istraživanja ukazuju da ima važnu ulogu i u privlačenju T limfocita te NK stanica (30). Nadalje, pokazano je da MCP-1 deficijentni miševi su osjetljiviji na razvoj DSS kolitisa nego sojevi divljeg tipa miševa. Ovi rezultati upućuju da MCP-1 ima važnu ulogu u razvoju upalnog procesa, a mehanizmi njegovog djelovanja su različiti. Ključni čimbenik u etiopatogenezi upalnih bolesti crijeva je lokalna aktivacija imunološkog odgovora. Stoga je oštećenje sluznice i razvoj upale rezultat pojačane ekspresije proinflamatornih citokina, kemokina i adhezijskih molekula uključujući TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  te aktivacije različitih upalnih stanica. U skladu s navedenim opravdano se smatra da je ključan događaj tijekom razvoja i uspostave oštećenja tkiva infiltracija upalnih stanica u sluznicu debelog crijeva. Pri tome intenzitet upalnog procesa, koji je također ovisan

o stupnju nakupljanja upalnih stanica, utječe na disfunkciju gastrointestinalnog sustava, kako u čovjeka tako i u animalnim modelima bolesti (37). Među upalnim stanicama koje se nakupljaju na mjestu upale vrlo važnu ulogu imaju neutrofili kao „stanice pioniri“ koji aktiviraju mnoge druge stanice te upalne medijatore (38). Nadalje, važnu ulogu imaju T limfociti te makrofazi.

Istraživanja ukazuju da su makrofagi jedna od ključnih populacija u održavanju homeostaze tkiva te da lučenjem brojnih medijatora upale značajno doprinose razvoju oštećenja kao i posljedičnoj regeneraciji tkiva. Makrofagi su velika populacija fagocita za koju je pokazano da ima ključnu ulogu u procesima kao što su prepoznavanje odnosno razlikovanje patogenih od apatogenih bakterija te usmjeravanje imunološkog odgovora. Posebno je zanimljiva njihova uloga u gastrointestinalnom sustavu budući da su značajna karika u očuvanju integriteta odnosno intaktnosti sluznice (39). Utvrđeno je da u procesu diferencijacije makrofaga do funkcionalno različitih fenotipova presudnu ulogu nosi interakcija između uvjeta mikrookoliša i aktivacije ključnih signalnih molekula (40). Naši prethodni rezultati, ali i rezultati drugih istraživanja, ukazuju na značajno nakupljanje makrofaga u akutnoj fazi kolitisa u CD26<sup>-/-</sup> miševa u usporedbi s C57Bl/6 miševima (41). Rezultati ove studije su pokazali značajno veću koncentraciju MCP-1 proteina u debelom crijevu CD26<sup>-/-</sup> miševa u usporedbi s C57BL/6 miševima u akutnoj fazi kolitisa. Ako uzmemo u obzir prethodne rezultate onda možemo zaključiti da MCP-1 utječe na broj makrofaga prisutnih u sluznici debelog crijeva. S druge strane naši rezultati izražaja ovog kemokina na proteinskoj razini podupiru zaključak da nedostatak CD26 molekule utječe na koncentraciju ovog proteina. Nadalje, u skladu s našim rezultatima i prema dosad dostupnim podacima smatra se da je MCP-1 pro-upalni medijator te je pokazano da je ekspresija MCP-1 povećana u upalno promijenjenoj sluznici crijeva kod bolesnika s upalnim bolestima crijeva u usporedbi s kontrolnom skupinom (42). Međutim, naši rezultati i rezultati prethodnih istraživanja

usmjeravaju nas na razmišljanje i zaključak da određen broj makrofaga u debelom crijevu CD26<sup>-/-</sup> miševa nije isključivo odraz povećane ekspresije MCP-1, kao presudnog kemotaksijskog i regulatornog čimbenika makrofaga, nego, najvjerojatnije i odraz drugih mehanizama ili proupalnih/protuupalnih medijatora sluznice crijeva.

Ovim istraživanjem odredio se izražaj MCP-1 proteina i na genskoj razini. Rezultati ispitivanja izražaja ovog kemokina u debelome crijevu na genskoj razini su pokazali značajno veći izražaj mRNA tijekom razvoja kolitisa u CD26<sup>-/-</sup> životinja. Dok je u akutnoj fazi kolitisa izražaj mRNA značajno veći u C57BL/6 (7. dan). Stoga možemo zaključiti da inaktivacija gena za DPP IV/CD26 utječe na izražaj mRNA MCP-1 tijekom razvoja kolitisa, a u akutnoj fazi kolitisa nema značajnu ulogu budući da je izražaj mRNA na razini 3. dana pokusnog razdoblja. Ako rezultate izražaja mRNA za MCP-1 u CD26 deficijentnih životinja usporedimo s izražajem na razini proteina možemo zaključiti da su rezultati u korelaciji. Povećan izražaj MCP-1 na razini gena praćen je povećanim izražajem na razini proteina kako na lokalnoj (debelo crijevo) tako i na sistemske razini (serum). Međutim u akutnoj fazi postoji obrat situacije, izražaj na razini gena se ne mijenja u odnosu na prethodnu vremensku točku, ali izražaj na razini proteina raste šest puta u odnosu na koncentraciju zabilježenu 3. dana pokusnog perioda. Mehanizme ovih promjena potrebno je dalje ispitati, a temeljem dosadašnjih spoznaja razlog ovakvih promjena u CD26 deficijentnih životinja može biti nedostatak katalitičke aktivnosti DPP IV/CD26 u kombinaciji s značajnijim pomakom MCP-1 iz seruma u debelo crijevo.

Promjene na sistemske i lokalnoj razini ukazuju na ulogu DPP IV/CD26 u modulaciji imunskog odgovora tijekom razvoja kolitisa i cijeljenja upalom oštećene sluznice. Nadalje, ovi rezultati usmjeravaju ka daljnjim istraživanjima uloge DPP IV/CD26 na proliferaciju, aktivaciji i izražaj upalnih medijatora i stanica tijekom imunološkog odgovora.

## 6. ZAKLJUČAK

Iz rezultata dobivenih ovim istraživanjem proizlaze sljedeći zaključci:

1. Pokazane promjene parametara na lokalnoj i sistemske razini potvrđuju da je model DSS potaknutog kolitisa uspostavljen u obje ispitivane skupine miševa.
2. Utvrđeni povećan izražaj MCP-1 na proteinskoj razini u upalno promijenjenom tkivu debeloga crijeva u CD26<sup>-/-</sup> životinja ukazuju na ulogu DPP IV/CD26 proteina u procesu aktivacije upalnih stanica te potencijalno ostalih čimbenika upale.
3. Uslijed nedostataka DPP IV/CD26 molekule izražaj mRNA MCP-1 proteina se značajno mijenja tijekom razvoja kolitisa te stoga možemo zaključiti da ova molekula utječe na izražaj MCP-1 na razini gena.
4. Budući da DPP IV/CD26 ima ulogu u procesu usmjeravanja ključnih upalnih stanica humanog obrambenog sustava prema mjestu oštećenja, rezultati dobiveni ovim istraživanjem otvaraju mogućnosti za nova istraživanja uloge DPP IV/CD26 u procesu modulacije imunološkog odgovora.

## LITERATURA

1. Bank U, Bohr UR, Reinhold D, Lendeckel U, Ansorge S, Malfertheiner P, i sur. Inflammatory bowel diseases: multiple benefits from therapy with dipeptidyl- and alanyl-aminopeptidase inhibitors. *Front Biosci.* 2008;13:3699-713
2. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine.* 2009;361(21):2066-78
3. Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol.* 2000;35(3):154-67
4. Lakatos PL. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World journal of gastroenterology : WJG.* 2006;12(38):6102-8.
5. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D, *Imunologija, sedmo, obnovljeno i dopunjeno izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2010.*
6. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(7):521-33
7. Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija (dvanaesto izdanje), Medicinska naklada Zagreb, Zagreb, 2012.*
8. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2002;122(1):44-54.
9. Mizoguchi A. Animal models of inflammatory bowel disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012;105:263-320.

10. Mariangela De Robertis, Emanuela Massi, i sur. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies: *J Carcinog.* 2011
11. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Exp Anim.* 2000;49:9–15.141
12. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990;98:694-702
13. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Exp Anim* 2000;49:9-15.
14. Venkatraman A1, Ramakrishna BS, Pulimood AB, Patra S, Murthy S. Increased permeability in dextran sulphate colitis in rats: time course of development and effect of butyrate. *Scand J Gastroenterol.* 2000;35(10):1053-9.
15. Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res* 2007;140:12-9.
16. Benoit Chassaing, Jesse D. Aitken i sur., Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice *Curr Protoc Immunol.* 2014;104: Unit–15.25.
17. Ni J, Chen SF, Hollander D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut* 1996;39:234-41.
18. Ni J, Chen SF, Hollander D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut* 1996;39:234-41; Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14338-43.



19. Puente XS, Sanchez LM, Overall CM, Lopez-Otin C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet.* 2003;4(7):544-58.
20. Gorrell MD. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clin Sci (Lond).* 2005;108(4):277-92.
21. Ansorge S, Nordhoff K, Bank U, Heimburg A, Julius H, Breyer D, et al. Novel aspects of cellular action of dipeptidyl peptidase IV/CD26. *Biological chemistry.* 2011;392(3):153-68.
22. 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;40(3):209-94.
23. 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;313(2):223-9.
24. Murray PJ, Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol.* 2011;89(4):557-63.
25. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13:453-61.
26. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of immunology.* 2000;164(12):6166-73.
27. Cochran BH, Reffel AC i sur. *Cell* 33:939-947
28. Kurihara T, Warr G i sur. *J Exp Med* 186:1757-1762
29. Deshmane Satish L, Kremelev Sergey i sur. *Journal of interferon and cytokine research* 29 2009 313-326

30. Melgarejoa E, Ángel Medinaa, Sánchez-Jiméneza F, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1: A key mediator in inflammatory processes, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009;41: 998–1001
31. Metode u molekularnoj biologiji ur. Andreja Abramović Ristov, Institut Ruđer Bošković, Zagreb 2007.
32. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 2015;72:4-15
33. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 2002;29: 23–39.
34. Van Hinsbergh VW, Engelse MA, Quax PH. Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:716-28.
35. Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology*. 2001;54(3):249-64.; 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;40(3):209-94
36. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*. 2009;361(21):2066-78
37. 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

38. Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunology*. 2012;5:354–366.
39. Bain CC, Mowat AM. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol Rev*. 2014;260(1):102-17.
40. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of immunology*. 2000;164(12):6166-73.
41. Detel D, Pugel EP, Pucar LB, Buljevic S, Varljen J. Development and resolution of colitis in mice with target deletion of dipeptidyl peptidase IV. *Exp Physiol*. 2012;97(4):486-96
42. 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;59(6):804-12

## 7. DODACI

### 7.1. POPIS SLIKA

|  |    |
|--|----|
| Slika 1: Prikaz mehanizma djelovanja natrijeva dekstran sulfata (DSS) na sluznicu crijeva....  | 10 |
| Slika 2: Shematski prikaz strukture MCP-1.....   | 20 |
| Slika 3: Signalni put MCP-1 molekule.....  | 22 |
| Slika 4: Čimbenici i patološka stanja koja utječu<br>na transkripcijski izražaj MCP-1 .....  | 23 |
| Slika 5: Vrste ELISA metode.....   | 26 |
| Slika 6: Prikaz PCR procesa .....  | 30 |
| Slika 7: Sistemske promjene tijekom razvoja kolitisa<br>i oporavka u C57BL/6 i CD26 deficijntnim (CD26 <sup>-/-</sup> ) miševima .....                           | 40 |
| Slika 8: Rektalno krvarenje u akutnoj fazi kolitisa.....   | 41 |
| Slika 9: Makroskopske promjene debelog crijeva tijekom razvoja<br>kolitisa u CD26 <sup>-/-</sup> miševa.....   | 42 |
| Slika 10: Patohistološke promjene stijenke debeloga crijeva u C57BL/6 i CD26 <sup>-/-</sup> miševa<br>uslijed djelovanja natrijevog dekstran sulfata (DSS) ..... | 44 |
| Slika 11: Koncentracija MCP-1 tijekom razvoja kolitisa u serumu C57BL/6 (A) i CD26 <sup>-/-</sup> (B)<br>miševa .....  | 46 |

|   |    |
|---|----|
| Slika 12: Koncentracija MCP-1 tijekom razvoja kolitisa u debelome crijevu C57BL/6 (A) i C<br>CD26 <sup>-/-</sup> (B) miševa .....                                       | 48 |
| Slika 13: Usporedba koncentracija MCP-1 u serumu (A) i debelome crijevu (B) pokusnih<br>životinja s DSS-kolitisom i kontrolne skupine.....                              | 50 |
| Slika 14: Transkripcijska aktivnost MCP-1 gena u debelome crijevu C57BL/6 (A) i CD26 <sup>-/-</sup><br>(B) i miševa u fazi razvoja i oporavka te kontrolne skupine..... | 52 |
| Slika 15: Usporedba transkripcijske aktivnosti gena MCP-1 između C57BL/6 i CD26 <sup>-/-</sup><br>miševima u debelome crijevu .....                                     | 53 |

## **7.2. POPIS TABLICA**

Tablica 1: Prikaz intestinalnih i ekstraintestinalnih komplikacija upalne

bolesti crijeva (UBC) ..... 6

Tablica 2: Prikaz djelovanja DPP IV/CD26 molekule ..... 13

Tablica 3: Prikaz djelovanja opsoninskih i ne-opsoninskih receptora..... 15

Tablica 4: Kriteriji za izračunavanje indeksa aktivnosti bolesti.....34

## ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Vana Vučetić

Datum rođenja: 25.11.1993.

Mjesto rođenja: Rijeka, RH

Državljanstvo: Hrvatsko

Narodnost: Hrvatica

Adresa: Portić 20, Rijeka

Školovanje:

2000. – 2008. Osnovna škola „Donja Vežica“ Rijeka

2008. – 2011. Prva sušačka hrvatska gimnazija u Rijeci

2012. – 2015. Medicinski fakultet Rijeka – Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva

2015. – 2017. Medicinski fakultet Rijeka - Diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva