

Neuroimunomodulacijska svojstva dipeptidil-peptidaze IV u modelu upalne bolesti crijeva u miša

Batičić, Lara

Doctoral thesis / Disertacija

2010

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:188:809561>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Lara Batičić

NEUROIMUNOMODULACIJSKA SVOJSTVA DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE IV
U MODELU UPALNE BOLESTI CRIJEVA U MIŠA

Doktorski rad

Rijeka, 2010.

Mentor rada: Prof.dr.sc. Jadranka Varljen

Komentor rada: Prof.dr.sc. Natalia Kučić

Doktorski rad obranjen je dana _____ na Medicinskom fakultetu
Sveučilišta u Rijeci, pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Ivana Marić
2. Prof.dr.sc. Marko Duvnjak
3. Prof.dr.sc. Robert Domitrović
4. Prof.dr.sc. Jadranka Varljen
5. Prof.dr.sc. Natalia Kučić

Rad sadrži 220 stranica, 92 slike, 9 tablica i 233 literaturnih navoda.

UDK 616.34-002:616-021.2:577.15(043)

Rad je najvećim dijelom izrađen na Zavodu za kemiju i biokemiju, u suradnji sa Zavodom za histologiju i embriologiju, Zavodom za molekularnu medicinu i biotehnologiju, Zavodom za mikrobiologiju i parazitologiju, Zavodom za anatomiju te Zavodom za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Istraživanja su provedena u okviru znanstveno-istraživačkog projekta financiranog od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske; projekt broj 062-0061245-0213 pod nazivom „Uloga dipeptidil-peptidaze IV (CD26/DPP IV) u kroničnim bolestima“, čiji je glavni istraživač prof.dr.sc. Jadranka Varljen.

Zahvala

„I najdulje putovanje započinje prvim korakom...”

...napisala mi je kao posvetu u jednoj od knjiga koje mi je poklonila moja mentorica,

cijenjena prof.dr.sc. Jadranka Varljen.

Iskreno Vam hvala, draga Profesorice, što ste mi uvijek bila podrška i poticaj na svakom

koraku ovog puta;

od srca hvala na pomoći, savjetima i hrabrenjima te na velikom uloženom trudu.

Hvala Vam na povjerenju koje mi ukazujete već dugi niz godina i što ste od prvog dana

vjerovala u mene.

U nastajanju ovog rada pomogla mi je i komentorica, cijenjena prof.dr.sc. Natalia Kučić.

Puno hvala na prijedlogu da nađemo poveznicu biokemije i neuroimunomodulacije, na

svim korisnim savjetima pri uspostavi novih metoda istraživanja i tumačenju dobivenih

rezultata.

Veliko hvala mojim dragim kolegicama i prijateljicama, dr.sc. Dijani Detel i Sunčici

Ostojić, dipl.ing. na dragocjenoj pomoći u izvođenju brojnih eksperimenata, hvala na

podršci i ugodnom zajedničkom radu. Hvala vam što ste uvijek bile tu kad je zatrebalo i

činjenici da smo zaista skladan tim.

*Iskreno se zahvaljujem predstojnici Zavoda za kemiju i biokemiju,
cijenjenoj prof.dr.sc. Čedomili Milin na ukazanom povjerenju tijekom svih ovih godina.
Hvala od srca zaista svim članovima Zavoda za kemiju i biokemiju na pomoći i podršci.
Imam sreću biti u ugodnoj i prijateljskoj radnoj sredini, hvala vam na tome.*

*Dragocjenu pomoć u histološkim istraživanjima pružila mi je
prof.dr.sc. Ester Pernjak Pugel.*

*Iskreno se zahvaljujem na vremenu koje je posvetila ovom radu te strpljenju i predanošću
kojom je učinila brojne histološke analize.*

*Veliko hvala cijenjenoj prof.dr.sc. Ivani Marić na iskrenoj pomoći
te korisnim savjetima u prvim koracima uspostave TNBS modela kolitisa.*

*Zahvalna sam predstojnicima zavoda Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci koji su
omogućili da dio eksperimentalnog rada dovršim u njihovim prostorijama: prof.dr.sc.*

*Siniši Volareviću, predstojniku Zavoda za molekularnu medicinu i biotehnologiju;
prof.dr.sc. Stipanu Jonjiću, predstojniku Zavoda za histologiju i embriologiju; prof.dr.sc.*

*Maji Abram, predstojnici Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju
i prof.dr.sc. Dragici Bobinac, predstojnici Zavoda za anatomiju.*

Veliko hvala svim djelatnicima navedenih zavoda na susretljivosti i suradnji.

Hvala svim kolegicama sa Zavoda za molekularnu medicinu i biotehnologiju na zaista velikoj pomoći. Posebno hvala doc.dr.sc. Kristini Grabušić na dragocjenim savjetima, iskrenoj pomoći i što je prijatelj.

Hvala poštovanoj gospođi Sonji Župan koja me naučila specifične histološke tehnike te na pomoći oko pripreme parafinskih preparata tkiva.

Hvala dragoj gospođi Ivani Crevar koja je s osobitom pažnjom njegovala pokusne životinje.

Zahvaljujem se svim djelatnicima vivarija Medicinskog fakulteta na susretljivosti.

Od srca hvala dragoj gospođi Bosiljki Licul, dipl.ing.bibl., voditeljici knjižnice Medicinskog fakulteta u Rijeci na velikodušnoj pomoći i dobroti.

U nastajanju ovog rada, kao i u mom životu, pomogli su mi mnogi moji dobri prijatelji i dragi ljudi.

Iskreno se zahvaljujem svima koji ste bili uz mene i radovali se uspjesima te tješili me u teškim trenucima.

Najveća hvala mojoj obitelji i zaručniku.

Zbog vas nisam posustala.

Mojoj obitelji i zaručniku

Sažetak

Neuroimunomodulacijska svojstva dipeptidil-peptidaze IV u modelu upalne bolesti crijeva u miša

Uvod. Upalne bolesti crijeva grupa su kroničnih autoimunih bolesti gastrointestinalnog sustava nedovoljno poznate etiopatologije. Dosadašnja istraživanja ukazuju na povezanost dipeptidil-peptidaze IV (DPP IV/CD26) i molekularnih mehanizama uključenih u procese nastanka i cijeljenja upale. Pokazano je da ova molekula ima vrlo važnu ulogu u razgradnji neuroimunoendokrinih medijatora uključenih u održavanje integriteta sluznice, kao i nastanak upalnih promjena.

Cilj istraživanja. Ovo se istraživanje temelji na pretpostavci da DPP IV/CD26 ima značajnu neuroimunomodulacijsku ulogu, obzirom da je biološka aktivnost mnogih neuropeptida i interleukina pod izravnim utjecajem ove molekule. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati povezanost DPP IV/CD26 i Crohnove bolesti, praćenjem profila medijatora neuroimunološkog odgovora tijekom nastanka i cijeljenja kemijski induciranog kolitisa u CD26 deficijentnom i divljem tipu miša.

Materijal i metode. Model Crohnove bolesti u miša induciran je rektalnom, intraluminalnom aplikacijom etanolne otopine trinitrobenzensulfonske kiseline (TNBS). Kako bi ispitali *in vivo* učinke DPP IV/CD26 u razvoju i cijeljenju upalnih promjena, kolitis je izazvan u CD26 deficijentnom (CD26^{-/-}) te divljem tipu miša soja C57BL/6, istog spola i dobi. Kontrolne skupine predstavljale su životinje odgovarajućeg soja kojima je pod istim uvjetima rektalno aplicirana sterilna fiziološka otopina, odnosno otopina etanola. Razvoj, intenzitet i cijeljenje kolitisa praćeno je u različitim vremenskim intervalima temeljem kliničkih i histoloških parametara na sistemske i lokalnoj razini, u oba soja pokusnih životinja. Stupanj oštećenja debelog crijeva pratio se određivanjem makroskopskih promjena, patohistološkom analizom, određivanjem mikroskopskog indeksa oštećenja te

histomorfometrijskom analizom parafinskih tkivnih rezova. Aktivnost DPP IV/CD26 u C57BL/6 soja miša te aktivnost DPP IV/CD26-sličnih enzima u CD26^{-/-} životinja u serumu, mozgu i debelom crijevu određivana je spektrofotometrijski. Proteinski izražaj DPP IV/CD26 u mozgu i debelom crijevu C57BL/6 životinja određivan je tehnikom *Western blot*. Sistemske (serumske) i lokalne (u ekstraktima mozga i debelog crijeva) koncentracije neuropeptida Y (NPY) i vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP) određivane su specifičnim imunoenzimskim testovima (ELISA), a njihov proteinski izražaj u mozgu i debelom crijevu tehnikom *Western blot*. Koncentracije proupalnog interleukina-6 i protuupalnog interleukina-10 u cirkulaciji te u ekstraktima navedenih tkiva također su određivane specifičnim imunoenzimskim testovima (ELISA).

Rezultati. Tijekom razvoja kemijski induciranog TNBS-kolitisa u C57BL/6 i CD26^{-/-} soju životinja dolazi do kliničke manifestacije bolesti, statistički značajnih promjena tjelesne mase, mase jetre i slezene, makroskopskih, patohistoloških i histomorfometrijskih promjena debelog crijeva uz značajan porast mikroskopskog indeksa oštećenja, čime je potvrđena uspostava modela kolitisa. Upalne promjene u obliku ulceracija u CD26^{-/-} životinja bile su lokalizirane na površinski sloj, uz određeni broj žarišnih transmuralnih promjena. Za razliku od CD26^{-/-}, kod C57BL/6 životinja prisutna je difuzna upala koja zahvaća cijelu cirkumferenciju crijeva.

Kod ciljanih imunobiokemijskih parametara (enzimske aktivnosti, koncentracije neuropeptida, koncentracije interleukina) utvrđene su statistički značajne promjene i na sistemske i na lokalnoj razini u oba soja pokusnih životinja kojima je induciran kolitis u odnosu na kontrolne skupine, ali i između ispitivanih sojeva životinja. Aktivnost DPP IV u C57BL/6 životinja statistički je značajno snižena u serumu, mozgu i debelom crijevu životinja kojima je induciran kolitis, u odnosu na kontrolnu skupinu.

U akutnoj fazi kolitisa, u CD26^{-/-} životinjama utvrđene su statistički značajne razlike u promjenama koncentracija NPY-a i VIP-a te IL-6 i IL-10 u cirkulaciji i na lokalnoj razini (u

mozgu i debelom crijevu), u odnosu na skupine C57BL/6 životinja. Koncentracije protuupalnih medijatora IL-10 i VIP-a u CD26^{-/-} životinja statistički su značajno više i sistemski i lokalno, dok C57BL/6 životinje sadrže veće koncentracije NPY-a u mozgu i debelom crijevu.

Zaključak. TNBS-kolitis (engl. *Crohn-like colitis*) uspostavljen je u oba soja miša, što je potvrđeno statistički značajnim promjenama kliničkih i histoloških parametara na lokalnoj i sistemske razini, s odgovarajućim razlikama u patohistološkim upalnim promjenama. Tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u CD26^{-/-} životinja dolazi do statistički značajnih promjena sistemskih i tkivnih koncentracija NPY-a, VIP-a, IL-6 i IL-10 u odnosu na C57BL/6 životinje. Dobiveni rezultati ukazuju da se upalne promjene na razini debelog crijeva reflektiraju promjenama ispitivanih imunobiokemijskih parametara u mozgu. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da DPP IV/CD26 posjeduje i neuroimunomodulacijska svojstva tijekom razvoja i cijeljenja upalne bolesti crijeva u miša.

Ključne riječi:

Crohnova bolest; Dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV/CD26); Interleukin-6, Interleukin 10; Molekula CD26; Upalne bolesti crijeva; Pokusni model kolitisa; Neuropeptid Y; Vazoaktivni intestinalni peptid.

Abstract

Neuroimmunomodulative Properties of Dipeptidyl Peptidase IV in a Model of Inflammatory Bowel Disease in Mice

Introduction. Inflammatory bowel diseases represent a group of chronic autoimmune diseases of the gastrointestinal tract which exact etiopathogenesis is unknown. Previous studies suggested an association between dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) and molecular mechanisms involved in the process of intestinal inflammation. It has been shown that this molecule plays an important role in the breakdown of neuroimmunoendocrine mediators involved in maintaining the integrity of intestinal mucosa and the occurrence of inflammatory events.

Objectives. This research is based on the hypothesis that DPP IV/CD26 possesses an important neuroimmunomodulative role, given that the biological activity of many neuropeptides and interleukins is directly influenced by this molecule. The aim of this study was to investigate the causative connections between DPP IV/CD26 and Crohn's disease, by monitoring the profile of mediators involved in the neuroimmune responses during emergence and course of chemically induced colitis in CD26 deficient and wild type mice.

Materials and methods. The model of Crohn's disease in mice was induced by rectal, intraluminal application of trinitrobenzensulfonic acid (TNBS) ethanol solution. In order to examine the *in vivo* properties of DPP IV/CD26 in the development and healing of inflammation, colitis was induced in CD26 deficient (CD26^{-/-}) and wild type mouse strain C57BL/6, of same gender and age. The control group was represented by the appropriate animal strain which has been rectally applied, under same conditions, sterile physiological solution or ethanol solution. Colitis development, intensity and healing were followed at different time intervals based on clinical and histological parameters at the systemic and local levels in both strains of experimental animals. The degree of

colonic mucosa damage was assessed by evaluation of macroscopic changes, histopathological analysis, microscopic indices of damage, and histomorphometric analysis of paraffin tissue sections at different time intervals during the development and healing of inflammatory changes. DPP IV/CD26 activity in C57BL/6 mouse strain and the activity of DPP IV/CD26-like enzymes in CD26 deficient animals in serum, brain and large intestine were determined spectrophotometrically. Protein expression of DPP IV/CD26 in brain and colon of C57BL/6 mice was determined by Western blot technique. Systemic (serum) and local (in brain and colon protein extracts) concentrations of neuropeptide Y (NPY) and vasoactive intestinal peptide (VIP) were determined by specific immunoenzymatic tests (ELISA), and their protein expressions by Western blot technique. Concentrations of the proinflammatory interleukin 6 (IL-6) and anti-inflammatory interleukin 10 (IL-10) in circulation and in brain and colon tissue extracts were also determined by specific immunoenzymatic tests (ELISA).

Results. The development of chemically induced colitis in C57BL/6 and CD26 deficient mice leads to clinical manifestations of the disease, statistically significant changes in body weight, liver and spleen weights, macroscopic and histological changes in the colon, which confirms the establishment of a model of colitis. During the development and healing of colitis, CD26 molecule deficiency resulted in histological changes in the manifestation of inflammatory process: in CD26 deficient animals inflammatory changes were mainly localized, with transmural inflammatory changes, while in C57BL/6 animals a diffuse inflammation that affects the whole intestinal circumference could be found.

Targeted immunochemical parameters (enzyme activities, concentrations of neuropeptides, interleukins concentrations) resulted in statistically significant changes at the systemic and local levels in both strains of experimental animals, in mice with induced colitis compared to controls, but also between mice strains. DPP IV activity in C57BL/6 animals was statistically significantly decreased in serum, brain and colon in

animals with induced colitis, compared to the control group. In the acute phase of colitis, in CD26^{-/-} animals, statistically significant differences in changes in concentrations of NPY and VIP and IL-6 and IL-10 in circulation and at the local level (in brain and colon) were found, compared to C57BL/6 animals. Concentrations of anti-inflammatory mediators IL-10 and VIP were statistically significantly higher in serum and at local levels in CD26^{-/-} animals, while C57BL/6 animals had higher concentrations of NPY in brain and colon.

Conclusion. The TNBS-colitis (Crohn-like colitis) has been established in both mouse strains, as confirmed by statistically significant changes in clinical and histological parameters at local and systemic level, with corresponding differences in histological inflammatory changes. During the development and healing of colitis in CD26^{-/-} animals, significant changes in systemic and tissue concentrations of NPY, VIP, IL-6 and IL-10 occurred, compared to C57BL/6 animals. The results obtained in this study indicate that inflammatory changes in immunobiochemical parameters at the level of the colon reflect in changes of those parameters in the brain. The results of this study indicate that DPP IV/CD26 possesses also neuroimmunomodulative properties during development and healing of inflammatory bowel disease in mice.

Key words:

Crohn's disease, Dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV/CD26); CD26 molecule; Interleukin-6; Interleukin-10; Neuropeptide Y; Vasoactive intestinal peptide; Inflammatory bowel diseases; Experimental colitis.

Sadržaj:

1. Uvod i pregled područja istraživanja

1.1. Upalne bolesti crijeva

1.1.1. Definicija

1.1.2. Crohnova bolest

1.1.2.1. Opis bolesti

1.1.3. Povijesni osvrt

1.1.4. Epidemiologija upalnih bolesti crijeva

1.1.5. Etiologija i čimbenici rizika

1.1.5.1. Genetska predispozicija

1.1.5.2. Poremećaji imunoregulacijskih mehanizama

1.1.5.3. Izloženost infekcijama

1.1.5.4. Zapadnjački način života

1.1.5.5. Utjecaj prehrane

1.1.5.6. Pušenje

1.1.5.7. Ostali čimbenici rizika

1.1.6. Dijagnostičke pretrage

1.1.7. Terapija upalnih bolesti crijeva

1.1.8. Pokusni modeli upalnih bolesti crijeva

1.1.8.1. Model Crohnove bolesti u miša

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

1.2.1. Kronologija znanstvenih saznanja

1.2.2. Lokalizacija DPP IV/CD26

1.2.3. Molekularna obilježja DPP IV/CD26

- 1.2.4. Strukturna obilježja DPP IV/CD26
- 1.2.5. Solubilna DPP IV/CD26
- 1.2.6. Aktivno središte DPP IV/CD26
- 1.2.7. Specifičnost prema supstratima
- 1.2.8. Funkcije DPP IV/CD26
 - 1.2.8.1. Prijenos signala u stanicu
- 1.2.9. Obitelj DPP IV gena
- 1.2.10. Klinička značajnost i terapijska primjena
- 1.2.11. Metabolički učinci inhibicije DPP IV/CD26
- 1.3. Crijevno-mozgovna os
 - 1.3.1. Crijevno-mozgovni peptidi
 - 1.3.1.1. Neuropeptid Y (NPY)
 - 1.3.1.1.1. Molekularna i strukturna svojstva
 - 1.3.1.1.2. Biološka značajnost
 - 1.3.1.2. Vazoaktivni intestinalni peptid (VIP)
 - 1.3.1.2.1. Molekularna i strukturna svojstva
 - 1.3.1.2.2. Biološka značajnost
 - 1.3.2. Interleukini
 - 1.3.2.1. Interleukin 6 (IL-6)
 - 1.3.2.2. Interleukin 10 (IL-10)

2. Ciljevi istraživanja

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

- 3.1.1. Kemikalije i reagensi
- 3.1.2. Laboratorijske životinje
 - 3.1.2.1. Etički aspekti istraživanja na pokusnim životinjama

3.2. Metode

3.2.1. Uspostava modela Crohnove bolesti u miša

3.2.1.1. Postupak anesteziranja pokusnih životinja

3.2.1.2. Postupak izazivanja kolitisa

3.2.2. Plan pokusa

3.2.2.1. Procjena uspostave kolitisa

3.2.3. Dobivanje mišjeg seruma

3.2.4. Uzorkovanje organa pokusnih životinja

3.2.5. Makroskopske promjene

3.2.6. Priprema preparata za histološke analize

3.2.6.1. Silanizacija predmetnih mikroskopskih stakalaca

3.2.6.2. Priprema parafinskih preparata uzoraka tkiva

3.2.6.3. Hematoksilin-eozin bojanje preparata tkiva

3.2.7. Određivanje stupnja oštećenja sluznice crijeva

3.2.8. Histomorfometrijska analiza

3.2.9. Izolacija proteina iz uzoraka tkiva pokusnih životinja

3.2.9.1. Izolacija proteina mozga i debelog crijeva u octenoj kiselini

3.2.9.2. Izolacija proteina mozga i debelog crijeva u TRIS-HCl puferu

3.2.9.3. Izolacija proteina iz uzoraka tkiva za analizu

tehtnikom *Western blot*

3.2.10. Izolacija sluznice debelog crijeva

3.2.11. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

3.2.12. Određivanje enzimске aktivnosti DPP IV/CD26

i DPP IV/CD26-sličnih enzima

3.2.12.1. Izračun enzimске aktivnosti

3.2.13. Imunoenzimski testovi (ELISA)

3.2.13.1. Specifični imunoenzimski test za utvrđivanje

koncentracije neuropeptida Y

3.2.13.1.1. Načelo djelovanja

3.2.13.1.2. Sadržaj kompleta imunoenzimskog testa

3.2.13.1.3. Analitički postupci imunoenzimskog testa

3.2.13.2. Specifični imunoenzimski test za utvrđivanje koncentracije

vazoaktivnog intestinalnog peptida

3.2.13.3. Specifični imunoenzimski test za utvrđivanje

koncentracije interleukina-6

3.2.13.3.1. Načelo djelovanja

3.2.13.3.2. Sadržaj kompleta imunoenzimskog testa

3.2.13.3.3. Analitički postupci imunoenzimskog testa

3.2.13.4. Specifični imunoenzimski test za utvrđivanje

koncentracije interleukina-10

3.2.13.4.1. Sadržaj kompleta imunoenzimskog testa

3.2.14. *Western blot* tehnika

3.2.14.1. Elektroforetsko razdvajanje proteina

3.2.14.1.1. Priprema gelova za elektroforetsko razdvajanje proteina

3.2.14.1.2. Priprema razdvajajućeg gela za elektroforezu

3.2.14.1.3. Priprema sabijajućeg gela za elektroforezu

3.2.14.1.4. Priprema uzoraka za nanošenje na gel za elektroforetsko
razdvajanje proteina

3.2.14.1.5. Proces elektroforetskog razdvajanja proteina

3.2.14.1.6. Proces prijenosa proteina na membranu

3.2.14.1.7. Vezivanje specifičnih primarnih i sekundarnih protutijela

3.2.14.1.8. Detekcija fotoluminiscentnog signala postupkom

kemiluminiscencije

3.3. Statistička obrada podataka

4. Rezultati

4.1. Obilježja pokusnog modela kolitisa

4.1.1. Procjena uspostave, razvoja i cijeljenja kolitisa

4.1.1.1. Promjena tjelesne mase i mase organa pokusnih životinja

4.1.1.2. Makroskopske promjene debelog crijeva

4.1.1.3. Patohistološke promjene debelog crijeva

4.1.1.4. Histomorfometrijska analiza parafinskih tkivnih rezova

4.2. Specifična imunobiokemijska istraživanja

4.2.1. Rezultati istraživanja na sistemskoj razini

4.2.1.1. Biokemijske analize enzimske aktivnosti DPP IV/CD26 i

DPP IV/CD26- sličnih enzima tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa

4.2.1.1.1. Aktivnosti serumske DPP IV/CD26 u C57BL/6 miševa

4.2.1.1.2. Aktivnosti DPP IV/CD26-sličnih enzima u serumu
CD26 deficijentnih miševa

4.2.1.2. Koncentracije neuropeptida u serumu pokusnih životinja

4.2.1.2.1. Serumske koncentracije neuropeptida Y

4.2.1.2.2. Serumske koncentracije vazoaktivnog
intestinalnog peptida

4.2.1.3. Koncentracije interleukina u serumu pokusnih životinja

4.2.1.3.1. Serumske koncentracije interleukina-6

4.2.1.3.2. Serumske koncentracije interleukina-10

4.2.2. Rezultati istraživanja na lokalnoj razini

4.2.2.1. Imunobiokemijska istraživanja u mozgu

4.2.2.1.1. Enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u mozgu

- 4.2.2.1.2. Enzimsko aktivnost DPP IV/CD26-sličnih enzima u mozgu
- 4.2.2.1.3. Proteinski izražaj molekule CD26 u mozgu
- 4.2.2.1.4. Koncentracije neuropeptida u mozgu
 - 4.2.2.1.4.1. Koncentracije neuropeptida Y
 - 4.2.2.1.4.2. Proteinski izražaj neuropeptida Y
 - 4.2.2.1.4.3. Koncentracije vazoaktivnog intestinalnog peptida
 - 4.2.2.1.4.4. Proteinski izražaj vazoaktivnog intestinalnog peptida
- 4.2.2.1.5. Koncentracije interleukina u mozgu
 - 4.2.2.1.5.1. Koncentracije interleukina-6
 - 4.2.2.1.5.2. Koncentracije interleukina-10
- 4.2.2.2. Imunobiokemijska istraživanja u debelom crijevu
 - 4.2.2.2.1. Enzimsko aktivnost DPP IV/CD26 u debelom crijevu
 - 4.2.2.2.2. Enzimsko aktivnost DPP IV/CD26-sličnih enzima u debelom crijevu
 - 4.2.2.2.3. Proteinski izražaj molekule CD26 u debelom crijevu
 - 4.2.2.2.4. Koncentracije neuropeptida u debelom crijevu
 - 4.2.2.2.4.1. Koncentracije neuropeptida Y
 - 4.2.2.2.4.2. Proteinski izražaj neuropeptida Y
 - 4.2.2.2.4.3. Koncentracije vazoaktivnog intestinalnog peptida
 - 4.2.2.2.4.4. Proteinski izražaj vazoaktivnog intestinalnog peptida
 - 4.2.2.2.5. Koncentracije interleukina u debelom crijevu
 - 4.2.2.2.5.1. Koncentracije interleukina-6
 - 4.2.2.2.5.2. Koncentracije interleukina-10

5. Rasprava

6. Zaključci

7. Literatura

Prilog: Kratice aminokiselina

Životopis

1. Uvod i pregled područja istraživanja

1. Uvod i pregled područja istraživanja

1.1. Upalne bolesti crijeva

1.1.1. Definicija

Upalne bolesti crijeva (UBC), *engl. Inflammatory bowel diseases – IBD*, grupa su kroničnih autoimunih bolesti gastrointestinalnog sustava nedovoljno poznate etiologije. Tijek bolesti je nepredvidiv, s čestim izmjenama faza kliničkih pogoršanja (relaps) i remisije bolesti. Klinički su obilježene opetovanim upalama različitih dijelova probavnog sustava, ponajviše tankog i debelog crijeva, a često popraćene brojnim izvancrijevnim manifestacijama (1). Pretpostavlja se da upalne bolesti crijeva nastaju kod genetski predisponiranih pojedinaca kao neadekvatan imunosni odgovor na određene antigene iz hrane ili pak mikrobiološke agense, pod utjecajem čimbenika okoliša (2). U ovisnosti o zahvaćenom odsječku probavnog sustava, razlikuju se dva najvažnija patomorfološka oblika UBC: Crohnova bolest (CB) i ulcerozni kolitis (UK). Glavne razlike između CB i UK su njihova lokalizacija, priroda upalnih promjena, imunopatološke osnove te patogeneza. Međutim, zbog sličnosti u manifestaciji kliničke slike, odnosno čestih preklapanja simptoma, i pojedinih patoloških procesa koji uzrokuju upalu u gastrointestinalnom sustavu, vjeruje se zapravo da su Crohnova bolest i ulcerozni kolitis u biti dvije krajnosti jedne te iste bolesti. U prilog ovoj teoriji govori i činjenica da se manifestacije u 10-15% oboljelih, zbog nemogućnosti jasne klasifikacije u jedan od oblika upalnih bolesti crijeva, opisuju kao nedeterminirani kolitis (3).

Crohnova bolest (CB) može zahvatiti bilo koji dio probavnog sustava, od ustiju do anusa. Najčešće zahvaća tanko crijevo, debelo crijevo ili pak oba, ponajviše terminalni ileum (završni dio tankog crijeva) i sve dijelove kolona. Bolest napreduje postupno i širi se u dublje slojeve stijenki crijeva, s karakterističnim područjima zdrave sluznice između područja zahvaćenih upalnim promjenama i granulomatoznim lezijama

(4). S imunosnog stajališta, Crohnova bolest predstavlja bolest posredovanu citokinima Th1 i Th17 imunosnog odgovora (5-7).

Ulcerozni kolitis (UC) upalna je bolest karakterizirana proljevima i rektalnim krvarenjem, kroničnog tijeka, s remisijama i egzacerbacijama. Upala je ograničena na sluznicu debelog crijeva a manifestira se kontinuiranim upalnim područjima, bez segmenata zdravog tkiva (8). Gotovo uvijek zahvaća rektum, no može se proširiti i na ostale dijelove debelog crijeva. Za razliku od Crohnove bolesti, ulcerozni kolitis bolest je koju karakterizira atipičan Th2 imunosni odgovor (9, 10).

Dosadašnja istraživanja nisu rezultirala pronalaskom jedinstvenog patognomoničnog testa koji bi potvrdio dijagnozu ulceroznog kolitisa ili Crohnove bolesti. Stoga diferencijalna dijagnoza ovih dvaju entiteta upalnih bolesti crijeva mnogokad predstavlja značajnu poteškoću (11).

1.1.2. Crohnova bolest

Obzirom da se ovo istraživanje temelji na životinjskom modelu Crohnu-sličnog kolitisa, slijedi sažet opis ovog entiteta. Crohnova bolest (lat. *Morbus Crohn*) upalna je bolest crijeva koja se može pojaviti u bilo kojem dijelu gastrointestinalnog sustava, od ustiju do anusa, s najvećom pojavnosću u ileocekalnoj regiji. Područja koja su zahvaćena upalnim promjenama karakterističnim za ovo oboljenje shematski su prikazana na slici 1.

Slika 1. Karakteristična područja zahvaćena upalnim procesima u Crohnovoj bolesti

Ileokolitis najčešći je oblik bolesti a zahvaća donji dio tankog crijeva (ileum) i debelo crijevo (kolon). Ileitis zahvaća samo ileum dok gastroduodenalna Crohnova bolest uzrokuje upalne promjene u želucu i početnom dijelu tankog crijeva, duodenumu. Jejunoileitis uzrokuje upalne procese u gornjoj polovici tankog crijeva (jejunumu), dok granulomatozni Crohnov kolitis zahvaća samo debelo crijevo. Sinonimi Crohnove bolesti su i regionalni enteritis, ileitis te granulomatozni ileokolitis.

Upalne promjene u Crohnovoj bolesti, za razliku od ulceroznog kolitisa, zahvaćaju sve slojeve stijenki crijeva. Transmuralna upala popraćena je i prisutnošću granulomatoznih lezija. Karakteristična su područja zdrave sluznice koja se pojavljuju između područja zahvaćenima upalnim promjenama (4).

1.1.2.1. Opis bolesti

Klinička slika Crohnove bolesti vezana je uz specifičnost upalnih promjena koje se mogu nalaziti na različitim segmentima probavnog sustava a upala se širi i na okolne limfne čvorove. Obzirom na mogućnost lokalizacije u bilo kojem dijelu probavnog kanala, klinička slika je raznolikija nego kod ulceroznog kolitisa (11). Najčešći simptomi Crohnove bolesti jesu abdominalna bol, gubitak apetita i gubitak tjelesne težine te povišena tjelesna temperatura. Proljevaste stolice mogu se javiti u početnoj fazi, ovisno o lokalizaciji bolesti, ali češće su posljedica kroničnih promjena koje dovode do smanjena apsorptivnog kapaciteta, razvoja sindroma kratkog crijeva te aktivne sekrecije vode i elektrolita uz smanjenu mogućnost njihove adekvatne apsorpcije.

Niz intestinalnih komplikacija Crohnove bolesti proizlazi iz transmuralnosti upale koja dovodi do suženja crijeva i fistuliranja kroz stijenku crijeva što rezultira bolovima u trbuhu. Bol je često odraz opstruktivnih promjena, najčešće u završnom dijelu tankog crijeva (12). Opstrukcija je u početku prolaznog karaktera zbog edema i spazma

stijenke, a nakon toga postaje trajna zbog nastalih suženja, što uzrokuje opstipaciju, a može dovesti i do ileusa. Među intestinalnim komplikacijama nalazimo i fibrostenotičke ili upalne striktуре, fistule i intraabdominalne apscese. U 50-60% oboljelih javljaju se granulomatozne promjene. Nastanak fistula vrlo je čest pa se smatra jednom od karakteristika bolesti. Fistule mogu biti enteroenteralne (između vijuga crijeva), enterokutane (širiti se između crijeva i kože), prodirati u susjedne organe koji se nalaze u području crijeva (rektovaginalni ili enterovezikalni oblik fistula) ili se manifestirati kao perianalna bolest s mogućnošću otvaranja fistuloznih kanala u perianalnom području (4). U oboljelih od Crohnove bolesti kod kojih upalne promjene zahvaćaju tanko crijevo, osobito jejunum, česta je malapsorpcija (11).

Izvancrijevne manifestacije česta su pojava kod oboljelih od upalnih bolesti crijeva, a javljaju se gotovo kod svih entiteta bolesti. Anemija je česta komplikacija bolesti, a nastaje zbog različitih razloga, poput gubitka krvi, kao nuspojava medikamentozne i kirurške terapije ili nedostatka prijeko potrebnih supstrata. Leukocitoza, trombocitoza i sklonost nastanku tromboembolijskih komplikacija nastaju kao odraz kronične upale. Često se opisuju blaga oštećenja jetre, a pojava žučnih kamenaca znatno je učestalija negoli u prosječnoj populaciji. Koštano-zglobne promjene nisu rijetke, a češće se vežu uz upalne promjene debelog crijeva. Uglavnom je riječ o artralgijama, migratornom artritisu i sakroileitisu. Promjene kvalitete i gustoće kosti također se često nalaze, a osteoporoza nije samo jedna od komplikacija bolesti, već i česta komplikacija primjene medikamentozne terapije, ponajviše kortikosteroida. Oftalmološke patološke manifestacije uključuju uveitis, retinitis, episkleritis i keratitis. Među kožnih promjenama mogu se javiti nodozni eritem i urtikarije. Moguća komplikacija je i aftozni stomatitis koji se ponekad zamjenjuje s upalnim promjenama Crohnove bolesti u samoj usnoj šupljini. Infekcije mokraćnog sustava i nastanak bubrežnih

kamenaca odraz su komplikacija same bolesti. Oboljeli od Crohnove bolesti često su pothranjeni. Uz smanjen indeks tjelesne mase i hipoalbuminemije, česta je hipovitaminoza (osobito vitamina D i vitamina B₁₂) te oligoelemenata. Pojava karcinoma probavnog sustava u bolesnika s Crohnovom bolešću veća je nego u zdrave populacije. Najčešći su to karcinomi tankog crijeva (na mjestu zahvaćenom bolešću) i kolorektalni karcinom (11, 13). Ukoliko se bolest pojavi u dječjoj dobi, u otprilike 40% oboljelih pojavljuje se i zastoj u rastu te zakašnjeli pubertet (14).

1.1.3. Povijesni osvrt

Klinički opisi akutnih i kroničnih proljeva, s ili bez sadržaja krvi, nalaze se već u vrlo starim spisima, čak i prije nekoliko tisuća godina. Vjeruje se da su najvjerojatnije bili posljedica akutnih bakterijskih infekcija. Međutim, analize materijala umrlih rijetko su se obavljale prije 16. stoljeća. Postale su uobičajena praksa u 18. stoljeću, a rutinski su se počele obavljati u određenim bolnicama u 19. stoljeću kada su postale dostupne i mikrobiološke i histološke analize (15).

Najstarija saznanja o Crohnovoj bolesti i ulceroznom kolitisu opisuju ih kao jedinstvenu bolest koja zahvaća crijeva, a kao zasebni entiteti jasno se opisuju zadnjih stotinjak godina. No usprkos velikom napretku medicinske znanosti, još uvijek je u mnogim slučajevima teško povući granicu i postaviti točnu dijagnozu (1).

Među prvim zabilješkama opisa simptoma Crohnove bolesti nalazimo zapise njemačkog kirurga Wilhelma Fabrya, poznatog i kao Guilhelmus Fabricius Hildanus, koji datiraju iz 17. stoljeća, godine 1623. Prvi opširniji opisi UBC potječu iz 18. stoljeća, kada je 1761. Morgagni opisao upalne promjene u crijevu koje bi u današnje doba bile karakterizirane kao Crohnova bolest. Uslijedio je opis ileokolitisa godine 1769. (16).

U 19. stoljeću postajalo je sve učestalije mišljenje o postojanju nezaraznih uzroka ulceracija i upala debelog crijeva. Nakon što je Koch 1882. identificirao mikroorganizam koji uzrokuje tuberkulozu, postalo je jasno da pojedinci boluju od bolesti vrlo sličnoj crijevnoj tuberkulozi, ali nisu zaraženi bacilom tuberkuloze. Ulcerozni je kolitis prepoznat kao entitet različit od bacilarne dizenterije godine 1859. Opisao ga je britanski liječnik Sir Samuel Wilks iz „Guy's hospital” bolnice u Londonu. Godine 1909. Hawkins je iznio detaljan opis bolesti i njezina prirodnog tijeka (15, 17).

Škotski kirurg Dalziel opisao je godine 1913. devet slučajeva jejunitisa, ileitisa i kolitisa. Tek je pedesetih godina dvadesetog stoljeća uočeno da Crohnova bolest može zahvatiti i kolon, iako su Moschcowitz i Wilensky već 1923. opisali granulomatozni kolitis. Burril B. Crohn *i sur.* opisali su ovu bolest 1932., vjerujući da patološke promjene zahvaćaju samo terminalni ileum. Zbog toga su ovu bolest nazvali *ileitis terminalis*. Nakon što je uočeno da mogu biti zahvaćena i segmentalna područja tankog crijeva proksimalno od terminalnog ileuma, naziv je promijenjen u *enteritis regionalis* (18). Daljnjih su godina upalna žarišta bolesti uočena u tankom i debelom crijevu, jednjaku, želucu, duodenumu, crvuljku, a pronađene su i oralne lezije (19). Godine 1960. bolest je jasno definirana kao oboljenje čije se upalne promjene mogu prostirati duž cijelog probavnog kanala. Naposljetku je Crohnova bolest dobila svoj današnji naziv po B.B. Crohnu (15).

1.1.4. Epidemiologija upalnih bolesti crijeva

Incidencija i prevalencija upalnih bolesti crijeva u svijetu te u Republici Hrvatskoj zadnjih desetljeća rastu, na što ukazuju brojna recentna epidemiološka istraživanja (20). Incidencija upalnih bolesti crijeva u svijetu kreće se od 1,6 do čak 24,5 na 100000 stanovnika za UK te od 0,9 do 9,2 na 100.000 stanovnika za CB (21). U Hrvatskoj

incidencija UK iznosi 4,3 na 100000 stanovnika, dok incidencija CB iznosi 7,0 na 100000 stanovnika (22). Bolest se može javiti u svim životnim dobima, najčešće u mlađih odraslih (od 15. do 40. godine života). U starijoj životnoj dobi također se može javiti UBC, što upućuje na bimodalnu raspodjelu bolesti. U trećine bolesnika UBC počinje prije dvadesete godine života, dok je početak bolesti prije desete godine života rijedak. UBC se javlja češće u adolescenata nego u mlađe djece, a bolesnici s početkom bolesti prije desete godine života predstavljaju rijetkost. Godišnja incidencija u bolesnika mlađih od dvadeset godina kreće se od 4,8 do 6,8 na 100000, a prevalencija od 17,9 do 30,7 na 100000 djece, s jasnom tendencijom porasta broja oboljelih (14).

Obzirom na porast incidencije UBC te činjenici da zahvaća sve dobne skupine i oba spola, bolest predstavlja značajan problem javnog zdravstva današnjice. Bolest je jasno povezana s urbanim načinom života, razvijenijim zemljama i teorijom tzv. „pretjerane higijene” a češća je u regijama sjevernih zemljopisnih širina (23).

1.1.5. Etiologija i čimbenici rizika

Unatoč brojnim kliničkim i temeljnim medicinskim istraživanjima, etiologija upalnih bolesti crijeva, kao i čimbenici koji dovode do nastanka pojedinog patomorfološkog oblika, do danas nisu sasvim poznati. Postoji nekoliko čimbenika rizika za koje je dokazana uzročno-posljedična povezanost s upalnim bolestima crijeva (24). Kako je zasigurno riječ o multifaktorijalnoj bolesti, ne može se sa sigurnošću utvrditi koji je od čimbenika rizika presudan u nastanku i razvoju upale u gastrointestinalnom sustavu. Međutim, bolest u najvećem broju slučajeva nastaje kao neadekvatan, odnosno pretjerani imunosni odgovor na određene bakterijske antigene ili pak antigene iz hrane, kod genetski predisponiranih pojedinaca, pod utjecajem čimbenika okoliša (25).

Među najvažnijim čimbenicima rizika za nastanak upalnih bolesti crijeva ističu se genetska predispozicija, imunoregulacijske nepravilnosti, čimbenici ranog djetinjstva (rani prekid dojenja, cjepiva, dječje zarazne bolesti), izloženost infekcijama u dječjoj i odrasloj dobi (infekcije crijevnim parazitima i mikroorganizmima, virus ospica, virus rubeole), prehrana, životne navike (osobito pušenje) te tzv. zapadnjački način života (nazvan još i „vesternizacija“) (2, 24).

Slika 2. Ispreplitanje etioloških čimbenika upalnih bolesti crijeva

1.1.5.1. Genetska predispozicija

Važnu kariku u nastanku upalnih procesa u gastrointestinalnom sustavu predstavlja genetska predispozicija (26). Profil bolesti je multigeniski pa se stoga ne može za etiopatogenezu okriviti jedinstveni gen. Vjeruje se da su CB i UK heterogene poligenske bolesti koje zapravo predstavljaju dvije krajnosti jedne te iste bolesti a dijele i neka, no ne sva, područja genske susceptibilnosti (27). Najvjerojatnije je fenotip UBC determiniran s nekoliko faktora, uključujući i interakciju među alelima, kao i utjecaj ostalih gena i čimbenika okoliša. Posljedično tome, prisutnost jednog mutiranog gena ne znači da će sa sigurnošću doći do razvoja UBC, niti prejudicira pojedinca kod kojeg će doći do razvoja bolesti (2, 28).

Pojavnost UBC unutar iste obitelji iznosi 20 do 30%. Postoji povećana prevalencija UBC među rođacima prvog i drugog koljena. U obiteljima gdje postoji visoka stopa pojavnosti UBC, 75% bolesnika obolijevaju od istog oblika bolesti. Nadalje, uočena je veća pojava ostalih genski uvjetovanih bolesti kod oboljelih od UBC. Osim

toga, rizik od obolijevanja viši je u određenim etničkim skupinama, poput židovske populacije, što također sve govori u prilog genetskoj komponenti bolesti (29).

Istraživanja vezana uz nasljedna oboljenja pokazala su veću stupanj obolijevanja u monozigotnih blizanaca u odnosu na dizigotne, i za CB i za UK. Međutim, pokazano je da je stopa pojavnosti bolesti u blizanaca veća za CB, što je dovelo do zaključka jačeg utjecaja genskih komponenti kod ovog oblika UBC (27). Saznanja dobivena istraživanjima provedenima na blizancima ukazala su na činjenicu da UBC ne slijede karakteristično Mendelovo pravilo nasljeđivanja, već su kompleksnog poligenetskog podrijetla (30).

Identificirano je nekoliko gena za koje je utvrđeno postojanje značajne povezanosti s nastankom UBC. Osobito se ističu kromosomi broj 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 19 te kromosom X (31, 32).

Slika 3. Geni povezani s patogenezo upalnih bolesti crijeva

(prilagođeno prema (32))

(kromosomske regije dokazano povezane s patogenezo upalnih bolesti crijeva
označene su crvenim krugovima dok su sivim krugovima označene potencijalne regije)

Jedan od gena najjasnije povezanih s patogenezo UBC je *IBD-1*, koji predstavlja područje susceptibilnosti na pericentromerijskoj regiji kromosoma 16 (30). Detaljnijim analizama utvrđena je nukleotid-vezujuća oligomerizacijska domena 2 (engl. *nucleotide-binding oligomerization domain 2, NOD2*), odnosno gen koji kodira sekvencu odgovarajućeg NOD2 proteina. NOD2 poznat je i kao CARD15 (od engl. *caspase*

activation and recruitment domain 15). Predstavlja polimorfan gen čiji je produkt uključen u regulaciju imunskih zbivanja te prvi je otkriveni gen s utvrđenom jasnom uzročno-posljedičnom vezom s UBC (33). Utvrđeno je preko 60 mutacija ovog gena među kojima su 3 neposredno povezana s razvojem CB (34). Procjenjuje se da je defekt NOD2 gena prisutan u 17 do 27% oboljelih od CB (33), međutim nije sasvim jasan mehanizam koji povezuje mutacije ovog gena i UBC (2).

1.1.5.2. Poremećaji imunoregulacijskih mehanizama

Fiziološka povezanost između komenzalnih bakterija u crijevu i organizma domaćina je simbiotska (28). UBC karakterizirane su imunoregulacijskim nepravilnostima mukoze, najvjerojatnije genetski predodređenih, za koje se pretpostavlja povezanost s bakterijskim antigenima prisutnima u crijevu (35). U zdravom epitelu crijeva, postoji tolerancija na prisutnost potencijalno proupalnih komponenata luminalnih bakterija. Razlog tomu može biti i jedinstveni fenotip makrofaga prisutnih u crijevu. Naime, manje od 10% makrofaga koji se nalaze u intestinalnoj *lamini propriji* izražavaju molekulu TREM-1 (engl. *triggering the receptor expressed on myeloid cells*). Ova je molekula inače izražena na površini neutrofila, monocita i makrofaga koji sudjeluju u pojačavanju upalnog odgovora putem povećavanja izlučivanja proupalnih citokina. Nepostojanje, odnosno vrlo nizak izražaj TREM-1 na površini intestinalnih makrofaga, predstavlja mehanizam koji potencijalno sprječava pretjerani imunski odgovor na bakterijske antigene prisutne u crijevu (36).

Postoji nekoliko teorija koje djelomično daju mogući odgovor na problematiku poremećaja imunoregulacije u crijevu: disfunkcija imunskog odgovora organizma prema uobičajenim sadržajima lumena crijeva, infekcija specifičnim patogenom i/ili

poremećaj u propusnosti mukozne barijere odnosno povećan protok luminalnih antigena u unutarnje slojeve stijenki crijeva.

Disfunkcija imunosnog odgovora organizma prema uobičajenim sadržajima lumena crijeva čini se najvjerojatnijim lokalnim patološkim mehanizmom koji dovodi do nastanka ranih događaja povezanih s razvojem upalnih promjena u UBC. Pretpostavlja se da, u zdravom organizmu, izloženost komenzalnim bakterijama utišava izražaj proupalnih gena i sprječava aktivaciju imunosnog odgovora usmjerenog na veliko mnoštvo prisutnih bakterijskih antigena, kao i antigena podrijetlom iz hrane (37). Kod oboljelih od UBC ne postoji ova tolerancija imunosnog sustava na antigene prisutne u crijevu, već izloženost luminalnoj mikroflori dovodi do pretjerane aktivacije imunosnog sustava organizma, osobito imunosnih stanica prisutnih u mukozi crijeva, što dovodi do kroničnog, destruktivnog upalnog procesa (11).

Pokazano je da laboratorijske životinje čuvane u specifičnim sterilnim uvjetima ne mogu razviti UBC, dok isti sojevi laboratorijskih životinja u uobičajenim uvjetima, dakle uz prisustvo komenzalnih bakterija, razvijaju UBC putem induciranog modela bolesti (38). Čak i infekcijom laboratorijskih životinja (koje su čuvane u specifičnim sterilnim uvjetima) jednim ili nekoliko bakterijskim sojevima, nakon indukcije bolesti ubrzo dolazi do razvoja upalnih promjena u crijevu (39). Nadalje, pokazano je postojanje različitih imunoregulacijskih odgovora na jedan te isti bakterijski soj. Npr. izloženost IL-10-deficijentnog soja miša bakterijskom soju *Cacteroides vulgatus*, uzrokuje manje upalne promjene, dok ista bakterija u transgeničnom modelu humanih leukocita uzrokuje vrlo izražene upalne promjene (40, 41). Stoga, može se zaključiti da su u oboljelih od UBC različiti bakterijski sojevi uključeni u nastanak upalnih promjena kod različitih pojedinaca (2, 39, 42).

Infekcija specifičnim patogenom koja dovodi do nastanka UBC zasad nije sa sigurnošću utvrđena, no postoje indikacije da određene patogene bakterije, poput *Mycobacterium paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes* i *Helicobacter hepaticus* (11) mogu biti uključene u patogenezu UBC. Nekoliko objavljenih znanstvenih članaka povezuje CB te preboljele ospice u ranoj životnoj dobi (31). Veća incidencija CB u zimskom periodu također indicira povezanost bolesti s određenim patogenim mikroorganizmima (43).

Nedostatna funkcija crijevnog epitela u oboljelih od UBC dokazano je povezana s povećanom permeabilnošću epitela crijeva, odnosno povećanom propusnošću crijevnog epitela za različite antigene, što dovodi do neprestane stimulacije imunskog sustava mukoze. Vjeruje se da je to primaran defekt sluznice crijeva prisutan u oboljelih od UBC (11).

Kod ljudi, površina crijeva iznosi od 150 do 200 kvadratnih metara, što predstavlja ogromnu površinu svakodnevno izloženu različitim antigenima, bilo bakterijskim bilo iz hrane. Lumen crijeva obično sadrži približno 10^{14} mikroorganizama, pripadnika više od petstotinjak dosad poznatih bakterijskih vrsta (44). Zdrav epitel crijeva s čvrstim poveznicama među stanicama predstavlja učinkovitu barijeru protiv dopiranja luminalnih mikroorganizama i različitih antigena u dublje slojeve crijeva. Isto tako, intestinalne epitelne stanice razvile su kontrolne mehanizme koji ograničavaju prekomjernu aktivaciju lokalnog imunskog sustava organizma.

Međutim, ukoliko zbog promjene u propusnosti crijevnog epitela dođe do prodiranja bakterijskih produkata i/ili antigena u unutrašnjost crijeva, dolazi do izravnog kontakta s imunskim stanicama, što će dovesti do klasičnog adaptivnog (stečenog, odnosno specifičnog) imunskog odgovora (28). Nakon toga doći će do lučenja proupalnih citokina, što će ponovno stimulirati novačenje dodatnih stanica u slojevima

crijeva. Navedeni mehanizam obuhvaća citokine koji sudjeluju u smanjivanju čvrstih veza između endotelних stanica crijeva, što naposljetku olakšava nakupljanje neutrofila iz periferne cirkulacije u mukozi crijeva (37).

Istraživanja koja uključuju životinjske modele UBC ukazala su na tendenciju razvoja snažnih upalnih procesa upravo u područjima crijeva gdje postoje poremećaji propusnosti crijeva (30). Bakterije iz lumena crijeva zatim dodatno pojačavaju defekt poremećaja propusnosti crijeva, što naposljetku predstavlja začarani krug koji rezultira opetovanim upalnim procesima gastrointestinalnog trakta (43).

1.1.5.3. Izloženost infekcijama

Brojna epidemiološka istraživanja definirala su UBC kao „bolest prekomjerne čistoće“. Za razliku od ostalih poligenskih, imunološki posredovanih bolesti poput astme, multiple skleroze i reumatoidnog artritisa, UBC pokazuje obrnuto proporcionalnu povezanost sa stupnjem čistoće. Naime, niži stupanj čistoće, osobito u ranijoj životnoj dobi, čini se protektivnim u etiopatogenezi UBC (45). (Ne)izloženost infekcijama u djetinjstvu kao posljedica prenapučenosti, također je, izgleda, čimbenik rizika za razvoj UBC u kasnijoj životnoj dobi. Naime, djeca koja odrastaju u višim socioekonomskim standardima imaju veću predispoziciju razvoja UBC. Ova se pojavnost tumači činjenicom da poboljšana ili pak pretjerana higijena utječe na mikrobiološku floru općenito, a time i na luminalne bakterije, što naprosto dovodi do smanjene izloženosti određenim kritičnim bakterijskim sojevima, te razvoja netolerancije prema istima (42, 46).

1.1.5.4. Zapadnjački način života

Područja s najvećom prevalencijom oboljelih od UBC jesu razvijene zemlje, poput Sjedinjenih Američkih Država, Ujedinjenog Kraljevstva i skandinavskih zemalja (47). Veća incidencija i prevalencija UBC zapažene u industrijaliziranim zemljama te izraziti porast broja novooboljelih u dvadesetom stoljeću govore u prilog teoriji utjecaja okolišnih čimbenika na pojavnost bolesti (13). Isto tako, zabilježen je veći broj oboljelih u gradskim u odnosu na ruralne sredine, a postoji i varijacija incidencije i prevalencije na relaciji sjever-jug. Zanimljivost je pak porast incidencije u zemljama južnih regija, poput Azije. Vjeruje se da su ove pojave zapravo posljedica tzv. „vesternizacije“, odnosno usvajanja zapadnjačkog načina života, poput promjena u prehrambenim navikama, pušenja, izloženosti sunčevim zrakama, smanjenog boravka na svježem zraku, zagađenju okoliša te industrijalizacije (48).

Također jedan od aspekata zapadnjačkog načina života te čimbenika koji može doprinijeti pojavnosti UBC čini se i zanimanje pojedinca (2). Veći postotak oboljevanja i smrtnosti od UBC zapažen je kod zaposlenika koji obavljaju stresne poslove i imaju zanimanja koja iziskuju veću psihičku napetost, osobito one sjedilačkog tipa. S druge strane, nešto manja stopa pobolijevanja od UBC zabilježena je kod zaposlenika koji se bave poljoprivrednim zanimanjima i obavljaju poslove koji su obilježeni boravkom na otvorenom prostoru (49, 50). Navedene činjenice dovele su do zaključka da su boravak na svježem zraku i tjelesna aktivnost na neki način protektivne kod UBC dok su boravak u zatvorenim prostorima te povećana psihička opterećenja čimbenici koji doprinose razvoju UBC. Nezaposlenost te depresija povezana s nepovoljnim socioekonomskim statusom također su, čini se, čimbenici koji mogu doprinijeti razvoju UBC (51).

1.1.5.5. Utjecaj prehrane

Teorija o postojanju određenih antigena iz hrane (ali i bakterijskih), koji mogu potaknuti kaskadu imunosnih reakcija koje naposljetku dovode do upalnih promjena u gastrointestinalnom traktu je općeprihvaćena, međutim ne postoje točna saznanja o kojim je antigenima riječ (52). Istraživanja vezana uz prehranu i etiopatogenezu UBC općenito su nedorečena, a često i nekoherentna. Međutim, kvaliteta prehrane nedvojbeno je čimbenik koji utječe na razvoj i tijek UBC (53). Nekvalitetna, tzv. brza prehrana, temeljena na namirnicama s visokim sadržajem zasićenih masnih kiselina i rafiniranih ugljikohidrata, prema objavljenim istraživanjima može povećati rizik obolijevanja od UBC za čak tri do četiri puta (54). S druge strane, namirnice s visokim sadržajem višestrukonezasićenih masnih kiselina, osobito omega-3, kao što su eikozapentaenska i dokozaheksaenska kiselina, poput plave morske ribe, mogu djelovati preventivno, ali i djelomično kurativno kod oboljelih od UBC i drugih kroničnih bolesti (55).

1.1.5.6. Pušenje

Među svim čimbenicima okoliša potencijalno involviranim u etiopatogenezu UBC, najevidentniji dokazi postoje za utjecaj pušenja (56). Povezanost pušenja duhanskih proizvoda i patogeneze UBC je kompleksna, no brojna su istraživanja potvrdila istu činjenicu: pušenje je protektivan faktor kod oboljelih od UK, dok je s druge strane čimbenik rizika i doprinosi nastajanju i egzacerbaciji CB (57). Ovi su utjecaji čini se ovisni o količini duhanskog dima koji se aktivno ili pasivno unose u organizam, a rezultati su koherentni u različitim zemljopisnim područjima (58). Paradoksalno, osobe koje su prestale pušiti imaju 1,7 puta veći rizik od razvoja UK od osoba koje nikada nisu pušile duhanske proizvode. Isto tako, bivši pušači češće bivaju hospitalizirani od aktivnih

pušača, a vjerojatnost da će biti podvrgnuti kolektomiji dvostruko je veća kod oboljelih koji nikada nisu bili aktivni pušači (59).

1.1.5.8. Ostali čimbenici rizika

Ostali čimbenici rizika potencijalno povezani s patogeneom UBC jesu činjenica je li osoba dojena u novorođenačkoj dobi, cijepljenja i oboljenja u ranom djetinjstvu, korištenje farmaceutskih pripravaka (ponajviše antibiotika, oralnih kontraceptiva i nesteroidnih protuupalnih lijekova), prethodna apendektomija, infekcije crijevnim parazitima, stres te ostali čimbenici vezani uz okoliš i način života pojedinca (24). Međutim, rezultati istraživanja na ovom području su proturječna, često i kontroverzna. Iako postoji povezanost čimbenika rizika s patogeneom UBC, još uvijek nije definirana njihova točna uzročno-posljedična povezanost (60).

1.1.6. Dijagnostičke pretrage

Dijagnostički postupci koji služe u rutinskoj dijagnostici upalnih bolesti crijeva obuhvaćaju laboratorijske, endoskopske i radiološke pretrage, te patohistološke analize biopsijskih ili kirurških uzoraka (11, 37).

Laboratorijske pretrage osnovni su dijagnostički postupak. U aktivnoj fazi bolesti nalazimo tipične pokazatelje upalnih promjena: ubranu sedimentaciju eritrocita i povišene vrijednosti C-reaktivnog proteina, a često nalazimo i povišene vrijednosti fibrinogena. Biokemijskim pretragama u akutnoj se fazi bolesti često uočavaju hipoalbuminemija i povišene vrijednosti aktivnosti jetrenih enzima.

Pri dijagnosticiranju upalne bolesti crijeva nužno je dodatno učiniti i endoskopske pretrage probavne cijevi (kolonoskopija, ezofagoduodenoskopija, enteroskopija, odnosno endoskopija kapsulom), u cilju procjene proširenosti bolesti. Kod Crohnove je

bolesti doseg rektoskopije odnosno rektosigmoidoskopije ograničen pa je najčešće potrebno, zbog prirode proširenosti upalnih promjena, učiniti potpunu kolonoskopiju i ileoskopiju. Endoskopski uočljive promjene u Crohnovoj bolesti su u pravilu diskontinuirane (engl. *skip lesions*), od blagih aftoznih promjena do dubokih ulceracija i fisura, s područjima zdravog tkiva između upalno zahvaćenih područja tkiva. U kasnijoj se fazi bolesti mogu javiti i pseudopolipozne promjene, stenoze i fistulacije crijeva.

Kod teških je oblika bolesti nužno učiniti i **radiološke pretrage** abdomena, odnosno native snimke kojima se isključuje ili potvrđuje prisutnost toksičnog megakolona, ileus ili perforacije crijeva. Irigografija je korisna u cilju procjene proširenosti bolesti i otkrivanja komplikacija poput striktura ili karcinoznih promjena. U cilju evaluacije promjena u tankom crijevu primjenjuje se pasaža tankog crijeva ili enterokliza. Korisni dijagnostički postupci jesu i pregled ultrazvukom, kompjutorizirana tomografija (CT) te magnetska rezonancija (MR).

Patohistološke analize također su važna karika u dijagnostičkom algoritmu bolesti i doprinose razlikovanju patomorfoloških oblika upalnih bolesti crijeva.

Moderne scintigrafske metode nuklearne medicine poput scintigrafije crijeva obilježenim leukocitima ili antileukocitnim protutijelima nadopunjavaju navedene dijagnostičke pretrage (11).

Postoji nekoliko parametara za utvrđivanje jačine i aktivnosti upalnih bolesti crijeva, a među najuvrježenijima nalazimo klasifikaciju po Truelove i Wittsu (61) koji ulcerozni kolitis dijeli na blagu i tešku bolest te *CDAI*-karakterizaciju, odnosno indeks aktivnosti Crohnove bolesti (engl. *Crohn's disease activity index*) (62) koji Crohnovu bolest klasificira u tri stupnja jačine bolesti.

Na žalost, još uvijek ne postoji pouzdan razlikovni biljeg za diferencijalnu dijagnozu Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa. Do danas nije otkriven parametar koji bi

bio specifičan za jedan ili drugi entitet upalnih bolesti crijeva. Predloženo je nekoliko seroloških biljega, poput perinuklearnih antineutrofilnih citoplazmatskih protutijela (engl. *perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies*, pANCA) te protutijela na *Saccharomyces cerevisiae* (engl. *anti-Saccharomyces cerevisiae antibody*, ASCA). Protutijela pANCA mogu se utvrditi u velikoj većini, čak do 80% oboljelih od ulceroznog kolitisa. S druge strane, prisutna su u manje od 10% oboljelih od Crohnove bolesti. Protutijela na *Saccharomyces cerevisiae* češće se pojavljuju u oboljelih od Crohnove bolesti, u oko 60% bolesnika, no mogu se javiti i u oboljelih od ulceroznog kolitisa koji su rezistentni na terapiju. Međutim, čak i kombinacija ova dva testa, usprkos visokoj osjetljivosti, nema dovoljnu specifičnost za diferencijalnu dijagnozu, ali predstavlja doprinos uspostavljanju konačne dijagnoze, uz kombinaciju ostalih dostupnih dijagnostičkih postupaka (63).

Obzirom na često preklapanje kliničkih karakteristika različitih entiteta upalnih bolesti crijeva, vrlo je važno što je moguće točnije odrediti fenotip već pri inicijalnoj prezentaciji bolesti. Isto tako, važno je razlikovati i pravilno diferencijalno dijagnosticirati druga moguća oboljenja koja se manifestiraju slično kao upalne bolesti crijeva (infekcije mikroorganizmima i parazitima, vaskularne bolesti, maligne bolesti, ostale bolesti koje uzrokuju bol u trbuhu i/ili proljev, poput divertikulitisa, celijakije, apendicitisa i sl.).

1.1.7. Terapija upalnih bolesti crijeva

Lijekovi koji se klasično upotrebljavaju u liječenju upalnih bolesti crijeva jesu aminosalicilati, kortikosteroidi, imunomodulatori, antibiotici, a u novije vrijeme i biološka terapija (11, 64, 65). Pojedina skupina lijekova ima svoje prednosti i nedostatke, a njihova je upotreba često popraćena raznim nuspojavama (66).

Aminosalicilati su već godinama prva linija terapije kod oboljelih od upalnih bolesti crijeva. Aminosalicilati poput mesazalina (5-ASA) imaju protuupalno djelovanje putem inhibicije produkcije proupalnih citokina i ostalih proupalnih medijatora. Potrebna je pravilna primjena farmakološki odgovarajućeg oblika ovog lijeka kako bi stigao do mjesta zahvaćenih upalnim promjenama, osobito ukoliko je riječ o distalnim dijelovima crijeva. Lijekovi koji sadržavaju 5-ASA u obliku azo-konjugata jesu sulfasalazin (5-ASA+sulfapiridin), olsalazin (5-ASA dimer) i balsalazid (5-ASA + inertni aminobenzoil-alanin). Nadalje, lijekovi koji imaju odgođeno otpuštanje mesazalina jesu formulacije poput Salofalka, Claversala, Asacola i Pentase a uzimaju se *per os*. Rektalna aplikacija 5-ASA u obliku supozitorija i klizmi omogućava visoku koncentraciju lijeka na mjestu upalnih promjena kod distalno zahvaćenih dijelova crijeva. Nuspojave su ovisne o dozi lijeka i javljaju se u 10-45% bolesnika. Aminosalicilati nisu djelotvorni kao terapija održavanja nakon remisije inducirane lijekovima kod oboljelih od Crohnove bolesti (67).

Kortikosteroidi su snažni protuupalni lijekovi koji svoje djelovanje ostvaruju inhibicijom velikog broja reakcija koje dovode do nastanka upalnih procesa. Kod primjene u oboljelih od upalnih bolesti crijeva pomažu u smanjenju upale u gastrointestinalnom sustavu (68). Klasični oblici kortikosteroida uključuju sistemske pripravke (oralni oblici – prednizon, prednizolon, metilprednizolon i intravenski oblici – hidrokortizon i metilprednizolon) te topičke lijekove (supozitoriji, pjene i klizme). Obzirom da su nuspojave korištenja sustavnih kortikosteroida relativno česte (akne, edemi, intolerancija glukoze a kasnije i katarakta, osteoporoza, miopatija i dr.), razvijeni su nesistemijski kortikosteroidi koji imaju znatno manje nuspojava, poput budesonida (69).

Imunomodulatori, poput azatioprina (AZA) i 6-merkaptopurina (6-MP) pripadaju skupini tiopurina. Upotrebljavaju se u liječenju upalnih bolesti crijeva te održavanju stabilne remisije bolesti (70). Nažalost, iako su ovi lijekovi najbolja opcija za bolesnike

ovisne o kortikosteroidima ili pak rezistentne na njih, opisano je da se u 28% oboljelih razvija neka od nuspojava, pa je neophodno stalno kliničko i laboratorijsko praćenje bolesnika (69).

Među antibioticima koji se primjenjuju u liječenju upalnih bolesti crijeva nalazimo metronidazol i ciprofloksacin, koji su indicirani za liječenje septičkih komplikacija. Preporuča ih se koristiti i kod bolesnika s refrakternom bolešću kod kojih nije moguća kirurška intervencija. Najvažnija nuspojava metronidazola je moguća ireverzibilna periferna neuropatija koja se pojavljuje uz dugotrajnu primjenu ovog lijeka. Ciprofloksacin je bolje podnošljiv, ali je uz istovremenu dugotrajnu primjenu u kombinaciji s kortikosteroidima moguć razvoj tendinitisa i ruptura Ahilove tetive (70).

Zadnje desetljeće uslijed saznanja dobivenima istraživanjima na području temeljnih medicinskih znanosti, ponajviše uz prepoznavanje kaskada imunskih reakcija ali i razjašnjavanje dijela genske podloge bolesti dovelo je do razvoja različitih lijekova koji su usmjereni upravo na ove komponente (71). U prvom redu to su antagonisti čimbenika tumorske nekroze α (TNF- α), poput infliksimaba, adalimumaba, etanercepta, onercepta, zatim inhibitora selektivnih adhezijskih molekula poput natalizumaba, fontolizumaba, protu-interleukin-12 protutijelo, protutijelo na receptor interleukina-6, visilizumab i sl. (70). Najvažniji je među njima i za sada jedini registrirani i klinički primjenjiv biološko-terapijski agens infliksimab. Infliksimab (IFX) kimerično je monoklonsko protutijelo usmjereno na TNF- α sa snažnim protuupalnim potencijalom temeljenim na apoptozi upalnih stanica. Učinkovit je u liječenju aktivnog oblika Crohnove bolesti, a pokazao se prilično učinkovitim i u liječenju oblika ulceroznog kolitisa rezistentnog na standardnu terapiju. Lijek je moguće primjenjivati i pri pojavi kliničkih simptoma relapsa. Terapija infliksimabom rezultira smanjenjem broja komplikacija, hospitalizacija i kirurških zahvata kod oboljelih od Crohnove bolesti (69). Moguće

nuspojave uporabe ovog lijeka jesu razvoj protutijela na infliksimab te razvoj oportunističkih infekcija. Recentna evidencija registriranih nuspojava ne opisuje veći rizik od razvoja malignih bolesti u oboljelih koji primaju terapiju infliksimaba (72).

Istraživanja ranih molekularnih događaja vezanih uz razvoj upalnih bolesti crijeva svakim danom dovode do akumulacije novih saznanja etiopatogeneze ovih bolesti ali i otvaraju nove vidike i mogućnosti novih terapijskih agensa. Međutim, potrebne su godine istraživanja *in vitro* i *in vivo* na životinjskim modelima bolesti, a kasnije i u kontroliranim kliničkim studijama kako bi od začetne ideje dobili učinkoviti lijek, prihvatljivog spektra mogućih nuspojava.

1.1.8. Pokusni modeli upalnih bolesti crijeva

Kako je kod upalnih bolesti crijeva zasigurno riječ o kompleksnim, multifaktorijskim bolestima, pitanju etiopatogeneze pokušalo se pristupiti na mnogim razinama. Međutim, unatoč opsežnim kliničkim, histološkim, endoskopskim, biokemijskim, mikrobiološkim, imunološkim i epidemiološkim istraživanjima, etiologija i patogeneza upalnih bolesti crijeva, kao i mehanizmi koji dovode do pojedinog patomorfološkog oblika bolesti, još uvijek ostaju nepoznanica (73-77). Cjelokupna slika bez sumnje je vrlo složena, no mnogi su „komadići mozaika“ ipak posloženi brojnim imunobiokemijskim istraživanjima, gdje su zasigurno vrlo značajan doprinos imali pokusni modeli bolesti.

Dosad je razvijeno nekoliko različitih modela kolitisa u miša. Pokusni modeli rezultiraju kliničkim simptomima, histopatološkim i imunopatološkim promjenama koje uvelike nalikuju humanim upalnim bolestima crijeva te zbog toga omogućuju proučavanje ranih događanja vezanih uz nastanak, razvoj i cijeljenje upalnih procesa (78). Najuvrženiji kemijski modeli kolitisa u miša jesu *DSS-kolitis* (kolitis izazvan

oralnom primjenom natrijevog dekstran sulfata, model ulceroznog kolitisa); *oxazolone-kolitis* (kolitis izazvan rektalnom primjenom oksazolona otopljenog u etanolu, također model ulceroznog kolitisa) te kolitis izazvan rektalnom primjenom trinitrobenzensulfonske kiseline otopljene u etanolu, TNBS-kolitis, engl. *Crohn-like colitis*). Značajni su i genetski modeli kolitisa, poput IL-10 deficijentnih miševa te kolitis u miša dobiven transferom limfocita T (79).

1.1.8.1. Model Crohnove bolesti u miša

Model trinitrobenzensulfonskom kiselinom induciranog kolitisa u miša (TNBS-kolitis, model Crohnove bolesti u miša, engl. *Crohn-like colitis in mice*) predstavlja pokusni model upalne bolesti crijeva pri čemu dolazi do oštećenja epitelnih stanica, ulceracija i transmuralne upale koja je uglavnom lokalizirana u području distalnog dijela kolona. Rektalna primjena otopine trinitrobenzensulfonske kiseline u etanolu uzrokuje primarno Th1 oblik imunskog odgovora, koji je specifičan za Crohnovu bolest u ljudi (80). Zbog velike sličnosti kliničkih, histoloških i imunoloških karakteristika kod ljudi te reproducibilnosti u životinja, predstavlja pogodan pokusni model za proučavanje ranih događanja vezanih uz nastanak, razvoj i cijeljenje Crohnove bolesti (78, 80).

2,4,6-trinitrobenzensulfonska kiselina (TNBS, pikrilsulfonska kiselina) spoj je kemijske formule $C_6H_3N_3O_9S$, čija je relativna molekulska masa $M_r=293.17$. Kemijska struktura ove molekule prikazana je na slici 4.

Slika 4. Kemijska struktura 2,4,6-trinitrobenzensulfonske kiseline

Svaki životinjski model upalnih bolesti crijeva ima svoje specifičnosti i pogodan je za proučavanje određenog segmenta bolesti, a dobrog ili lošeg modela nema. Idealan

životinjski model bolesti bio bi životinjski model u kojem se bolest pojavljuje spontano ili pak bolest biva potaknuta određenim agensima ili genetskom manipulacijom, a klinička slika, imunosni mehanizmi i geni koji određuju predispoziciju za razvoj upale identični onim humanim. Nadalje, životinjski model mora biti relativno jednostavno izvediv, upalne promjene moraju biti reproducibilne, postupci ekonomski prihvatljivi, vodeći računa i o etičkim aspektima sprječavanja nepotrebnih patnji kod pokusnih životinja. Životinjski su modeli bolesti nedvojbeno snažan alat za upoznavanje etiopatogeneze upalnih bolesti crijeva, ali i putokaz za razvoj novih dijagnostičkih i terapijskih strategija (78).

Dosadašnja su istraživanja, uključujući i ona koja uključuju bolesnike te istraživanja provedena koristeći životinjske modele upalnih bolesti crijeva, ukazala da proteaze imaju važnu, ali još uvijek nedovoljno jasnu ulogu u patogenezi ovih bolesti (81, 82). Pokazano je da peptidaze stanične površine imaju presudnu ulogu u razgradnji medijatora uključenih u održavanje integriteta sluznice kao i nastanak upalnih promjena (83, 84). Među njima nalazi se i **dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV), odnosno molekula CD26** (DPP IV/CD26; EC 3.4.14.5) (85). Pokazane su promijenjene vrijednosti aktivnosti i izražaja DPP IV/CD26 kod oboljelih od upalnih bolesti crijeva, koje koreliraju s jačinom i aktivnošću bolesti (86-88). Međutim, uloga ove molekule u patogenezi UBC, kao i drugim kroničnim upalnim bolestima, ostaje nerazjašnjena (89).

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

Obilježje membranski vezanih peptidaza je posjedovanje specifičnog profila izražaja u pojedinim tkivima, vrstama stanica ili pak staničnim dijelovima, što odražava funkciju svake pojedine stanice. Kod nekih je membranski vezanih proteaza pronađen i topljivi analog koji se može locirati intra i ekstracelularno, uključujući i biološke tekućine poput seruma, urina, sline, sjemene i amnionske tekućine (90).

Tipičan predstavnik membranski vezanih proteaza je dipeptidil-peptidaza IV odnosno molekula CD26 (DPP IV/CD26), koju nalazimo izraženu na površini brojnih stanica tkiva različitih organa, ali i u cirkulaciji na sistemske i lokalnoj razini. Specifičnost ove molekule jest mogućnost katalitičke razgradnje odnosno cijepanja dipeptida s N-terminalnog dijela lanca biološki značajnih supstrata koji na pretposljednem mjestu u primarnoj strukturi odnosno sekvenciji aminokiselina sadrže prolin ili alanin (91).

Dugi niz godina vjerovalo se da je glavna funkcija DPP IV/CD26 u razgradnji konačnih metabolita u procesu probave. Pripisivala joj se jedinstvena uloga u metabolizmu polipeptida s visokim sadržajem prolina. Brojnim daljnjim istraživanjima utvrđena je njezina važna uloga i u imunosnom odgovoru organizma (92). Nakon dobivenih saznanja o biološkim učincima značajnih bioaktivnih molekula, supstrata DPP IV/CD26, te mogućnosti njihove aktivacije odnosno inaktivacije, što dovodi do modulacije neuroimunobiokemijskog odgovora organizma, istraživanja vezana uz ovu molekulu eksponencijalno su rasla (93).

1.2.1. Kronologija znanstvenih saznanja

Prvi opis dipeptidil-peptidaze IV (DPP IV/CD26) zabilježen je 1966. u znanstveno-istraživačkom radu Hopsu-Havua i Glennera (94) koji su u homogenatu jetre štakora otkrili enzim sa svojstvom otpuštanja naftilamina iz Gly-Pro-2-naftilamida. Zbog navedenog su svojstva ovaj enzim nazvali *glicil-prolin naftilamidaza*. Godine 1977. otkrivena je funkcija vezivanja neodređenog proteina s adenozin-deaminazom (ADA) te je stoga nazvan „adenozin deaminaza vezujući protein” (engl. *Adenosin deaminase binding or complexing protein*, ADAbp, ADAcp). Tek je 1993. utvrđeno da je riječ o kompleksu DPP IV-ADA (95).

Godine 1977. prvi je put dokazana aktivnost DPP IV na limfocitima periferne krvi (96). Jedanaest godina kasnije otkriveno je da je DPP IV identična leukocitnom površinskom antigenu CD26, nakon čega je nekoliko monoklonskih protutijela koja prepoznaju DPP IV grupirano pod nazivom „CD26“. Godinu dana kasnije utvrđeno je da se DPP IV sastoji od dvije jednake podjedinice, od kojih svaka sadrži svoje aktivno središte (97).

Ova je molekula godine 1985. karakterizirana kao receptor za kolagen i fibronektin (98). Obzirom da je slijed aminokiselina Gly-Pro učestala u kolagenu, pretpostavilo se da ima značajnu metaboličku ulogu u biokemijskim procesima u kojima je involviran kolagen. Međutim, kako je ustanovljeno da DPP IV/CD26 nema sposobnost cijepanja Pro-Pro i Pro-Hyp veza koji ponajviše slijede Gly-Pro sekvence u kolagenu, točna fiziološka uloga ovog enzima dugo je ostajala nepoznata (99).

Daljnjim istraživanjima ove molekule cjelokupna cDNA humane CD26 prvi je put objavljena 1992. godine (100). Godine 2001. pokazana je sposobnost izravnog vezivanja CD26 na citoplazmatsku domenu tirozinske fosfataze, odnosno molekule CD45 (101). Današnja saznanja opisuju molekulu CD26 kao transmembranski glikoprotein s funkcijom serinske proteaze te ujedno i jedinstven hematopoetski diferencijacijski antigen. Pripada velikoj obitelji prolil-oligopeptidaza (POP) koja uz skupinu DPP IV gena sadrži i prolil-endoropeptidazu (PEP; EC 3.4.21.26) i acil-aminoacil-peptidnu hidrolazu (ACPH; EC 3.4.19.1). Međutim, DPP IV/CD26 jedini je član ove obitelji čiji je izražaj pronađen na leukocitima (102). Daljnjim je istraživanjima dokazano da dijeli mnoga zajednička strukturna i regulacijska svojstva s molekulom CD10 (neutralnom endopeptidazom), molekulom CD13 (aminopeptidazom N) te molekulom BP-1/6C3 (aminopeptidazom A) (103).

Istraživanja provedena posljednja tri desetljeća ukazala su na široki spektar područja djelovanja i funkcionalnih osobitosti DPP IV/CD26 u biokemijskim, imunosnim i neuroendokrinim međudjelovanjima. U mnogim slučajevima, učinci ne moraju nužno biti vezani samo uz katalitičko djelovanje ove molekule već uz brojne, dosad još uvijek nedostavno poznate, mogućnosti djelovanja na području stanične adhezije, međustanične komunikacije te prijenosa signala u stanicu (104).

1.2.2. Lokalizacija DPP IV/CD26

Molekula CD26 konstitutivno je izražena na brojnim stanicama različitih tkiva i organa poput probavnog, živčanog, spolnog i ostalih organskih sustava. Imunohistokemijskim analizama DPP IV/CD26 dokazana je gotovo u svim endotelnim stanicama kapilara različitih organa i tkiva (104). Humana DPP IV/CD26 relativno je ubikvitarna molekula, osobito izražena na zrelim timocitima, aktiviranim limfocitima T, B, NK-stanicama i makrofazima. Molekula CD26 izražena je na *in vivo* i *in vitro* aktiviranim CD4⁺ i CD8⁺ humanim limfocitima T (105). Otprilike 56% CD4⁺ i 35% CD8⁺ stanica limfocita periferne krvi, 74-81% CD4⁺ te 12-19% CD8⁺ limfocita T aktiviranih pomoću fitohemaglutinina izražava CD26 (106). Izražena je i na mirujućim limfocitima T u znatno manjem postotku, ali njezin izražaj raste 5 do 10 puta nakon stimulacije određenim antigenima (poput anti-CD3) i interleukinom 2 (IL-2) (91, 107). Najveća razina izražaja molekule CD26 pronađena je na imunosnim stanicama koje izražavaju aktivacijske biljege poput CD25, CD71, CD45RO te CD29 (108).

Izražaj molekule CD26 na limfocitima B je vrlo nizak, no također raste nakon stimulacije mitogenima ili proteinima *Staphylococcus aureus* (109). Poput limfocita T i B, i NK-stanice izražavaju CD26 u niskoj razini, ali se izražaj može povećati za oko 30% stimulacijom s IL-2. Utvrđeno je da 10% CD16⁺ svježe izoliranih NK-stanica izražavaju

molekulu CD26 (110). Utvrđen je izražaj molekule CD26 i na klonovima stanica s NK-aktivnošću te subpopulacijama NK-stanica pacijenata nakon transplantacije koštane srži (111, 112). Podaci dobiveni korištenjem inhibitora DPP IV/CD26 ukazuju na činjenicu da je molekula CD26 uključena u regulaciju proliferacije NK-stanica, ali ne i u njihovu citotoksičnu ulogu (113).

1.2.3. Molekularna obilježja DPP IV/CD26

Gen koji kodira humanu DPP IV/CD26 lociran je na dužem kraku drugog kromosoma (2q24.3). Dužina mu iznosi približno 70 kb. Sadrži 26 egzona, čija se veličina prostire od 45 b do 1,4 kb (114). Karakteristično je da se na 5' kraju ne nalaze ni TATA kutija ni CAAT kutija, no područje veličine oko 300 parova baza koje iznimno obiluje citozinom i gvaninom (oko 72%) sadrži potencijalna vezna mjesta za nekoliko transkripcijskih faktora, poput NFκB, AP2 i Sp1 (114, 115).

Gen koji kodira mišju DPP IV/CD26 prostire se na više od 90 kb. Sadrži također 26 egzona čija se veličina kreće od 100 b pa sve do više od 20 kb (116). DPP IV/CD26 podrijetlom iz miša ne dijeli značajnu sličnost u sekvenciji s ostalim pripadnicima serinskih proteaza (poput kimotripsina i subtilisina) ali sadrži visoko konzerviranu domenu dužine približno 200 aminokiselina koja je specifična za nekoliko nekonvencionalnih serinskih hidrolaza (117).

Molekula DPP IV/CD26 humanog podrijetla klasificira se kao integralni transmembranski protein tipa II. Relativna molekulska masa dimera iznosi oko 240 000, a sastavljena je od dva jednaka dimera relativne molekulske mase 120 000. Sadrži ukupno 766 aminokiselina (u štakora 767) što je ustanovljeno sekvencioniranjem cDNA (118). Od ukupnog broja aminokiselina, 22 (VLLGLLGAAALVTIITVPVVLL) otpadaju na transmembransku hidrofobnu domenu, na koju se nastavlja kratak intracelularni,

hidrofilni ostatak sastavljen od svega šest aminokiselina (MKTPWK) na N-terminalnom kraju proteinskog lanca. Preostalih 738 aminokiselinskih ostataka sadrže devet potencijalnih glikozilacijskih mjesta. Shematska struktura humane DPP IV/CD26 prikazana je na slici 5.

Slika 5. Shematska struktura DPP IV/CD26

(prilagođeno prema (119))

1.2.4 Strukturna obilježja DPP IV/CD26

Transmembranski glikoprotein DPP IV/CD26 u organizmu se nalazi ponajviše u obliku dimera sastavljenog od dvije jedinice monomera od kojih svaka sadrži dvije podjedinice:

- 1.) alfa-beta hidrolaznu domenu, koja obuhvaća aminokiselinske ostatke od 501 do 766 te
- 2.) beta-propelernu domenu koja se prostire od 59. do 497. aminokiselinskog ostatka molekule DPP IV/CD26.

Ove podjedinice zajedno čine udubinu dužine od 30 do 45 Å u promjeru. Beta-propelerna domena dobila je naziv prema specifičnom izgledu koji podsjeća na brodski propeler (slika 6).

DPP IV/CD26 posjeduje devet potencijalnih mjesta za glikozilaciju koji se nalaze najvećim dijelom na beta-propelernoj domeni, u blizini područja dimerizacije (120).

Slika 6. Shematski prikaz dimerne strukture DPP IV/CD26

Kristalna struktura DPP IV/CD26 pomogla je u rasvjetljavanju funkcionalne uloge dimerizacije DPP IV/CD26. Naime, pokazano je da dimerizacija nije neophodna za oblikovanje aktivnog središta. S druge strane, dimerizacija i tetramerizacija utječu na ostale komponente, uključujući supstrate proteolize te vezivanje adenozin-deaminaze a najvjerojatnije i mogućnost međustanične komunikacije. Osim toga, dimerizacija DPP IV/CD26 pojačava afinitet receptora prema ligandu što može biti od iznimne važnosti u procesima prijenosa signala u stanicu (120).

Osim dimerizacije, detaljnijim istraživanjima otkrivena je i sposobnost oligomerizacije membranski vezane i solubilne DPP IV/CD26. Zbog geometrijske specifičnosti, tetramerizacija na površini stanice zahtjeva membranski vezan i solubilni oblik DPP IV/CD26, lociranih na površini dviju različitih stanica, kao što je prikazano na slici 7.

DPP IV/CD26 može na ovaj način sudjelovati i u međustaničnoj komunikaciji. Pretpostavlja se da DPP IV/CD26 modulira kontakt između dviju stanica u procesu međusobne komunikacije putem tetramerizacije dvaju DPP IV/CD26 dimera prisutnih na njihovoj površini. Važnu ulogu u ovom procesu može imati i solubilni oblik ove molekule, obzirom da može interferirati u vezivanju membranski vezanih oblika.

Slika 7. Shematski prikaz tetramerne strukture DPP IV/CD26 (prilagođeno prema (120))

1.2.5. Solubilna DPP IV/CD26

Osim u membranski vezanom obliku na površini različitih stanica, DPP IV/CD26 prisutna je u solubilnom (topljivom) obliku u cirkulaciji u serumu, slini, urinu, sinovijalnoj tekućini, sjemenoj i amnionskoj tekućini, te ostalim biološkim tekućinama. Podrijetlo solubilne DPP IV/CD26 nije sa sigurnošću utvrđeno, ali pretpostavlja se da potječe s

površine stanica koje su u doticaju s krvlju. Vjeruje se da postoji proteolitički mehanizam koji doprinosi otpuštanju membranski vezane DPP IV/CD26 u cirkulaciju, no zasad nije poznat (121).

Solubilna DPP IV/CD26 pleiotropna je molekula koja zadržava identična proteolitička svojstva poput membranski vezane. Razlikuju se u nedostatku 22 aminokiseline transmembranskog dijela te 6 aminokiselina unutarstaničnog dijela cjelovite DPP IV/CD26 (122).

1.2.6. Aktivno središte DPP IV/CD26

Aktivno središte DPP IV/CD26 čini katalitička formacija serin (aminokiselinski ostatak 630), asparaginska kiselina (aminokiselinski ostatak 708) te histidin (aminokiselinski ostatak 740). Osim toga, tirozinski ostatak (547) hidrolazne domene neophodan je za katalitičku aktivnost ovog enzima a kinetička istraživanja pokazala su i da sudjeluje u stabilizaciji intermedijernih oblika supstrata. Nadalje, dvije glutaminske kiseline, Glu205 i Glu206 sudjeluju u stvaranju međumolekulskih elektrostatskih veza s N-terminalnim dijelom supstrata, što ostavlja mjesta samo za dvije aminokiseline prije no što peptid doprije do aktivnog mjesta. Ovaj mehanizam objašnjava dipeptidilnu katalitičku aktivnost DPP IV/CD26 (123).

Beta-propelerna domena prekriva aktivno središte te stoga djelomično ograničava pristup supstratima, što omogućuje i djelomičnu regulaciju biološke aktivnosti ovog enzima. Postoje dva glavna puta do aktivnog središta molekule DPP IV/CD26:

- 1.) kroz prolaz beta propelerne domene te
- 2.) kroz bočni prolaz širine 14 – 15 Å (124).

Oba su prolaza ovalnih dimenzija. Udaljenost od površine DPP IV/CD26 do aktivnog središta iznosi 20 Å od bočnog prolaza te 37 Å od beta-propelerne domene.

Nakon razgradnje supstrata, nastali produkti napuštaju aktivno mjesto, a da pritom put ulaska i izlaska ne moraju biti jednaki (120).

1.2.7. Specifičnost prema supstratima

Mnoge biološki aktivne molekule poput citokina, kemokina, hormona, neuropeptida i faktora rasta sadrže evolucijski očuvani prolin na pretposljednem mjestu polipeptidnog lanca (125). Ovakva struktura omogućuje im relativno visoku mogućnost regulacije njihovog biološkog djelovanja te postojanost u zaštiti razgradnje od strane enzima koji ne posjeduju prolin-specifičnu peptidaznu aktivnost (126). Međutim, upravo ih ovakva struktura čini pogodnim supstratima za katalitičko djelovanje DPP IV/CD26 (99).

Pokazano je da su peptidi manje molekulske mase vrlo dobri supstrati DPP IV/CD26. Porastom broja aminokiselina u primarnoj strukturi polipeptidnog lanca, smanjuje se i mogućnost dopiranja do aktivnog središta, a time i mogućnost njihove katalitičke razgradnje od strane DPP IV/CD26 (84).

Tablica 1 prikazuje popis i karakteristike značajnih regulacijskih peptida, supstrata DPP IV/CD26 u sisavaca.

Tablica 1. Popis i karakteristike značajnih regulacijskih peptida,
supstrata DPP IV/CD26 u sisavaca
(prilagođeno prema (99, 127), nadopunjeno i ažurirano)

Supstrat DPP IV/CD26	N- -terminalni kraj lanca	Broj amino- kiselina	Uspješnost katalize ^a	Biološki učinak	Referenca br.
Xaa-Pro-peptidi					
Neuropeptid Y, NPY	YP-S...	36	+++	Inaktivacija za Y1 receptor	(128, 129)
Peptid YY, PYY	YP-I...	36	+++	Inaktivacija za Y1 receptor	(129)
Enterostatin	VP-DP-R	5	++	Inaktivacija	(130)
Beta-kazomorfin	YP-F...	7	+++	Inaktivacija	(131)
Interleukin-6 (humani)	VP-PG-E...	184	++	Inaktivacija	(127, 132)
Interleukin-6 (mišji)	FP-TS-Q...	187	++	Inaktivacija	(127, 132)
Interleukin-10 (humani)	SP-G	160	++	Inaktivacija	(127, 132)
Propeptid tripsinogena	FP-T...	8	+	Nije sasvim poznat, aktivacija?	(131)
Bradikinin	RP-P...	9	Nije sasvim poznata	Nije sasvim poznat	(133)
Supstancija P	RP-KP-Q...	11	++	Nije sasvim poznat	(133, 134)
Gastrin-oslobađajući peptid	VP-LP-A...	27	+	Nije sasvim poznat	(131)

Endomorfín-2	YP-FF-NH ₂	4	++	Inaktivacija	(135)
Tyr-melanostatin	YP-LG-NH ₂	4	++	Inaktivacija	(131)
Aprotinin	RP-D...	58	+	Nije sasvim poznat	(131)
RANTES^b	SP-Y...	68	+	Inaktivacija za CCR-1 i CCR-3 receptore	(136, 137)
Granulocitni kemotaktični protein-2, GCP-2	GP-V...	73	+	Nije sasvim poznat	(137)
SDF-1-α^c	KP-V...	68	+	Inaktivacija za CXCR4 receptor	(136, 138)
SDF-1-β^c	KP-V...	72	+	Inaktivacija za CXCR4 receptor	(138)
Kemokin deriviran s makrofaga, MDC	GP-YG-A...	69	+	Inaktivacija za CCR4 receptor	(139)
Monocitni kemotaktični protein 1, MCP-1	QP-DA-...	76	Nije sasvim poznata	Nije sasvim poznat	(137)
Monocitni kemotaktični protein 2, MCP-2	QP-DS...	76	+	Inaktivacija	(136)
Monocitni kemotaktični protein 3, MCP-3	QP-VG...	73	Nije sasvim poznata	Nije sasvim poznat	(137)
Eotaksin	GP-A...	74	+	Inaktivacija za	(125, 136,

				CCR3 receptor	140)
Interferon-γ-inducibilni protein 10, IP-10	VP-L...	77	+	Nije sasvim poznat	(127)
Inzulinu-sličan čimbenik rasta 1	GP-E...	70	Nije sasvim poznata	Nije sasvim poznat	(99)
Prokolipaza	VP-DP-R...	101	+	Nije sasvim poznat, aktivacija?	(131)
Interleukin-2	AP-T...	133	Nije sasvim poznata	Nije sasvim poznat	(127, 131)
Interleukin-1-β	AP-V...	153	Nije sasvim poznata	Nije sasvim poznat	(126)
α_1-mikroglobulin	GP-VP-T	168	Nije sasvim poznata	Nije sasvim poznat	(131)
Prolaktin	LP-I...	198	+	Nije sasvim poznat	(127, 131)
Tripsinogen	FP-T	231	+	Nije sasvim poznat, aktivacija?	(131)
Korionski gonadotropin	AP-D... (α -lanac)	243	+	Nije sasvim poznat	(131)
Xaa-Ala-peptidi					
Peptid histidin-metionin	HA-E...	27	++	Inaktivacija	(141)
Čimbenik oslobađanja hormona rasta-(1-29)	YA-D...	29	++	Inaktivacija	(142)

Čimbenik oslobađanja hormona rasta-(1-44)	YA-D...	44	++	Inaktivacija	(141)
Glukagonu-sličan peptid-1, GLP-1	HA-E...	30	++	Inaktivacija	(141)
Glukagonu-sličan peptid-2, GLP-2	HA-E...	34	++	Inaktivacija	(143)
Gastrični inhibicijski peptid, GIP	YA-E...	42	++	Inaktivacija	(141)
Xaa-Ser-peptidi					
Vazoaktivni intestinalni peptid, VIP	HS-DA-VF...	28	++	Inaktivacija za VPAC1 receptor	(128)
Interleukin-10 (mišji)	MS-RG-Q...	160	++	Inaktivacija	(127, 132)

^a relativne konstante katalize – zaključak prema podacima dostupnima u literaturi:

+, dobra; ++, vrlo dobra; +++, izvrsna konstanta katalize

^b RANTES, od engl. *regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*

^c SDF, od engl. *stromal cell-derived factor*

Važnost DPP IV/CD26 u fiziološkim i patološkim procesima očituje se kroz cjelokupnost djelovanja ove multifunkcionalne molekule, koja ima modulacijsku aktivnost na različitim razinama bioloških međudjelovanja.

Osim DPP IV/CD26, specifičnost prema sličnim supstratima pokazuju još neke prolin/alanin-specifične endo i egzopeptidaze, a njihove su molekularne i biokemijske karakteristike navedene u tablici 2.

Tablica 2. Karakteristike prolin/alanin-specifičnih endo i egzopeptidaza u sisavaca
(prilagođeno prema (99))

Proteaza	Duljina ostatka pocijepanog lanca	Relativna molekulska masa (Mr)		Optimalni pH	Oblik u organizmu
		Nativna molekula	Podjedinica		
Dipeptidil- peptidaza IV (DPP IV/CD26) EC 3.4.14.5 ^a	3-80	220 000	110 000	8,0	Membranski, solubilni
X-Pro- aminopeptidaza EC 3.4.11.9	3-40	270 000	90 000	7-8	Membranski, solubilni
Prolil- aminopeptidaza EC 3.4.11.5/1 ^b	2-30	300 000	54 000	7-8,5	Solubilni
Prolil- oligopeptidaza EC 3.4.21.26	4-30	81 000	81 000	7,5 – 8	Solubilni
Membranska Pro-X	2-7	240 000	135 000	8	Membranski

karboksipeptidaza EC 3.4.17.16					
Lizosomalna prolil- karboksipeptidaza EC 3.4.16.2	≥ 3	200 000	25 000	4,5-5,5	Solubilni
Pro-X-dipeptidaza EC 3.4.13.8	2	300 000	300 000	8-9	Solubilni
X-Pro-dipeptidaza EC 3.4.13.9	2	108 000	54 000	7,5	Solubilni

^abakterijska Xaa-Pro-dipeptidil-peptidaza EC 3.4.14.11 katalizira sličnu reakciju poput životinjske odnosno humane DPP IV EC 3.4.14.5, ali ne pripada istoj skupini serinskih proteaza

^bprolil-aminopeptidaza podrijetlom iz sisavaca identična je leucil-aminopeptidazi EC 3.4.11.1

1.2.8. Funkcije DPP IV/CD26

Uvriježena su četiri područja djelovanja DPP IV/CD26 gdje, prema dosadašnjim saznanjima, ova molekula ostvaruje svoju biološku ulogu:

- 1.) Proteoliza – u svojstvu serinske proteaze DPP IV/CD26 sudjeluje u hidrolitičkoj razgradnji pojedinih biološki aktivnih peptida, a samim time u njihovoj aktivaciji i inaktivaciji. Na ovaj način može utjecati na modulaciju neuroimunobiokemijskog odgovora organizma u fiziološkim i patološkim procesima (91).
- 2.) Uloga u međustaničnoj komunikaciji, komunikaciji između stanice i izvanstaničnog matriksa te međudjelovanja stanične površine i virusnih komponenti. DPP IV/CD26 opisuje se i kao kolagen i fibronektin-vezujući protein (144), zatim kao koreceptor za HIV-1 u međudjelovanju s adenzin-deaminazom (145), te važan čimbenik metastaziranja tumora (146).

-
- 3.) Prijenos signala u stanicu – pokazano je da DPP IV/CD26 ima ulogu koreceptora u kaskadnim reakcijama prijenosa specifičnih signala kroz membranu (92).
 - 4.) Kompleksni neuroimunobiokemijski mehanizmi, zasad još uvijek nedostavno poznati – rezultati objavljenih istraživanja ukazuju na uključenost DPP IV/CD26 u mehanizme stanične proliferacije i diferencijacije (147), programirane stanične smrti odnosno apoptoze te složene mehanizme aktivacije limfocita T *in vitro* i *in vivo*, osobito u autoimunim procesima (147, 148). Utvrđena je uključenost DPP IV/CD26 u neuroimunoendokrine procese što otvara put novim istraživanjima i terapijskim mogućnostima (149).

Zbog svoje kompleksnosti u djelovanju te izrazite multifunkcionalnosti, DPP IV/CD26 i obitelj DPP IV-gena predstavljaju iznimno važno i značajno područje u brojnim istraživanjima, kako temeljnim tako i kliničko-farmaceutskim.

1.2.8.1. Prijenos signala u stanicu

Molekula DPP IV/CD26 prva je membranski vezana peptidaza za koju je utvrđena uloga u procesu prijenosa signala u stanicu. Ovaj transmembranski glikoprotein sadrži kratku citoplazmatsku domenu, bez uobičajenih signalnih motiva (92, 104). Međutim, vjeruje se da su upravo taj kratki transmembranski dio i unutarstanični dio uključeni u kaskadne reakcije prijenosa signala u stanicu. Različite grupe istraživača opisale su uključenost DPP IV/CD26 u regulaciju diferencijacije i rasta limfocita T, kao i njihove aktivacije (110, 150, 151).

Važna komponenta prijenosa signala u stanicu putem molekule CD26 jest i agregacija s adenzin-deaminazom. Adenzin-deaminaza (ADA; EC 3.5.4.4) enzim je uključen u metabolizam purina. Katalizira hidrolitičku deaminaciju adenozina ili 2'-

deoksiadenozina u inozin ili 2'-deoksiinozin i amonijak. Kongenitalni defekti ADA-e uzrokuju tešku kombiniranu imunodeficienciju, karakteriziranu nedostatkom funkcionalnih limfocita T i B (152). ADA se dugi niz godina svrstavala u citosolne enzime, no kako je njezin izražaj pronađen na površini mnogih stanica, danas se smatra ektoenzimom.

Obzirom na kratku citosolnu domenu molekule CD26, potrebna joj je molekula s kojom se može povezati u cilju efikasne provodnje signala (153). Pokazano je da upravo interakcija DPP IV/CD26 i ADA-e rezultira kostimulacijskim signalima kod limfocita T. Asocijacija CD26-ADA na površini limfocita T može imati kostimulacijsku ulogu prilikom aktivacije T-staničnog CD3 antigen-receptora (152). Rezultati provedenih istraživanja pokazali su da prilikom povećane koncentracije ADA-e dolazi do povećanog lučenja interferona gama (IFN- γ), čimbenika tumorske nekroze alfa (TNF- α), te interleukina-6 (IL-6) dok nema značajnijeg učinka na interleukine 2 i 10 (IL-2 i IL-10) (153).

Slika 8. Prikaz strukture molekule CD26 (A) u kompleksu s adenzin-deaminazom (B)
(prilagođeno prema (154))

Osim u slučaju povezivanja s ADA-om, Ishii *i sur.* (101) pokazali su da se signalizacija putem molekule CD26 djelomično odvija i putem asocijacije s tirozinskom fosfatazom odnosno molekulom CD45. Poznato je da je molekula CD45 involvirana u aktivaciju limfocita T te stoga kompleks CD26-CD45 predstavlja kariku u nizu signalnih kaskada uključenih u imunosni odgovor.

1.2.9. Obitelj DPP IV gena

Prolin-selektivne dipeptidil-peptidaze skupina su serinskih proteaza koje sudjeluju u regulaciji različitih biokemijskih procesa putem hidrolize N-terminalnih dipeptida s polipeptidnih i proteinskih lanaca koji sadrže aminokiselinu prolin na pretposljednem mjestu (155). Obitelj DPP IV gena čine DPP IV/CD26, protein aktivacije fibroblasta (FAP), DPP8 i DPP9, te DPL1 i DPL2, koji nemaju enzimatsku ulogu. Nazivaju se još i „homolozi aktivnosti i strukture dipeptidil-peptidaze IV“, engl. *Dipeptidyl peptidase IV activity and structure homologues* (DASH) zbog slične enzimске aktivnosti i/ili strukturne podudarnosti te visoke homologije na razini DNA i aminokiselina (90). Preklapanje specifičnosti prema supstratima te određenih komponenti strukture ukazuje na njihovu važnost u smislu kooperacije, interakcije s ostalim biološki važnim molekulama, kao i evolucijske očuvanosti (121).

Protein aktivacije fibroblasta alfa (FAP- α , sepraza) dijeli oko 50% sličnosti u sekvenciji s DPP IV i sadrži gotovo identičan broj (760) aminokiselina. Gen koji kodira ovaj protein nalazi se u neposrednoj blizini gena za DPP IV (2q24.3). Poput DPP IV, enzimska aktivnost FAP- α ovisna je o dimerizaciji (156). Osim što ima DPP IV-sličnu aktivnost, FAP- α ima endopeptidaznu sposobnost cijepanja denaturiranog kolagena tipa I i III, zbog čega mu se pripisuje mogućnost regulacije izvanstaničnog matriksa tumorskog mikrokoliša (157). Međutim, za razliku od DPP IV, FAP- α izražen je na relativno ograničenom broju tkiva, i to onima koja ulaze u procese remodeliranja i regeneracije, poput određenih stanica jetre i embrionalnih mezenhimalnih stanica. Izražen je na više od 90% stanica humanih epitelnih karcinoma, poput karcinoma pankreasa, dojki, pluća i kolona (121, 158). FAP- α deficijentni miševi normalnog su fenotipa što se tiče tjelesne težine, težine organa, histoloških karakteristika glavnih organa kao i hematoloških osobina (159).

DPP8 i DPP9 ubikvitarno su izraženi enzimi s dipeptidil-peptidaznom aktivnošću sličnoj DPP IV. Dije 26% aminokiselinske homolognosti s DPP IV i FAP- α , a međusobno su 61% homologni (160). DPP8 i DPP9 solubilni su citoplazmatski proteini za razliku od DPP IV/CD26 i FAP- α . Izražaj glasničke RNA DPP8 i DPP9 pokazuje široku distribuciju u humanim tkivima s najvećom koncentracijom u testisima i posteljici za DPP8 te u skeletnim mišićima, srcu, jetri i leukocitima periferne krvi za DPP9. Izražaj DPP8 i DPP9 u miša pronađen je u kolonu, mozgu, koži i timusu (161).

DPL1 i DPL2 članovi su DPP IV obitelji bez enzimatskih svojstava zbog nedostatka triptofana i nukleofilnog serinskog ostatka potrebnih za katalitičko djelovanje. Izraženi su u mozgu i organima endokrinog sustava. DPL1 se prvotno nazivao DPPX i DPP6. Dosadašnja saznanja o njihovim funkcijama su nedostatna, no vjeruje se da je DPL1 važan u organogenezi. Poznato je da nedostatak DPL1 gena u miša uzrokuje letalan ishod u homozigotnih embrija dok u heterozigota uzrokuje defekt pigmentacije (107).

Tablica 3 prikazuje karakteristike članova obitelji humanih DPP IV-gena. Obzirom na dokazane učinke u mnogim biološkim procesima u organizmu, od kojih je zasigurno veliki broj još uvijek nepoznanica, ovo je vrlo aktualno područje znanstvenih istraživanja.

Tablica 3. Karakteristike članova obitelji humanih DPP IV-gena

(prilagođeno prema (122))

Svojstvo	DPP IV	FAP	DP8	DP9
Hidroliza X-Gly-Pro	✓	Slabo	✓	✓
Hidroliza X-Ala-Pro	✓	✓	✓	✓
Hidroliza X-Arg-Pro	✓	✓	Slabo	Slabo
Razgradnja kemokina	✓	NP	NP	NP

Želatinazna aktivnost (kolagen tipa I)	×	✓	×	×
Dimerni oblik	✓	✓	×	×
Vezivanje adenoazin- deaminaze	✓	×	×	×
Izražaj mRNA u tkivima odraslih osoba	Ubikvitarno	Ubikvitarno	Ubikvitarno	Ubikvitarno
Izražaj proteina u tkivima odraslih osoba	Ubikvitarno	Serum, gušterača	NP	NP
Izražaj proteina na aktiviranim fibroblastima	✓	✓	NP	NP
Izražaj na fetalnim mezenhimalnim stanicama	✓	✓	NP	NP
Izražaj na aktiviranim ltvim stanicama jetre	×	✓	NP	NP
Izražaj na limfocitima	✓	×	✓	✓

Legenda: ✓, DA; ×, NE; NP, nije sasvim poznato

Slika 9 shematski prikazuje strukturu proteina pripadnika DPP IV obitelji. Vidljiva je strukturna povezanost pojedinih članova, naznačena su glikozilacijska mjesta te domene zaslužne za enzimsku aktivnost.

Slika 9: Shematski prikaz proteina obitelji DPP IV

(Prilagođeno prema (122))

1.2.10. Klinička značajnost i terapijska primjena

Mogućnost specifične katalitičke razgradnje ciljnih biološki aktivnih supstrata, kao i uključenost u imunomodulacijske procese čine DPP IV/CD26 molekulom od velikog značaja u kliničkom smislu, kao i potencijalnim, a ponegdje već i potvrđenim kandidatom za terapijsku primjenu (162-164).

Dosadašnja su istraživanja ukazala na izmijenjene vrijednosti aktivnosti i izražaja DPP IV/CD26 u različitim oboljenjima, poput upalnih bolesti crijeva, reumatoidnih oboljenja, neuroloških bolesti, karcinoma, metaboličkih oboljenja i mnogih drugih (164). Međutim, uloga ove molekule u fiziološkim i patološkim međudjelovanjima do danas nije potpuno razjašnjena.

Pokazano je da stupanj sniženja serumske aktivnosti DPP IV/CD26 korelira s jačinom i aktivnošću bolesti i kod Crohnove bolesti i kod ulceroznog kolitisa te se stoga potencijalno može koristiti u kliničke svrhe kao neinvazivan i ekonomski prihvatljiv biljeg aktivnosti i jačine ovih bolesti. Međutim, unatoč različitoj imunosnoj pozadini pojedinog entiteta upalnih bolesti crijeva, serumska aktivnost DPP IV/CD26 nije se pokazala dobrim biljegom za dijagnostičko razlikovanje Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa (86).

Područje koje je zasigurno najistraženije u smislu terapijske primjene modulacije aktivnosti DPP IV/CD26 jest *diabetes mellitus* tipa 2 (165). Naime, određeni inhibitori aktivnosti DPP IV/CD26 poput *sitagliptina*, *saksagliptina* i *vildagliptina* već su u kliničkoj primjeni u terapiji dijabetesa u smislu sprječavanja razgradnje supstrata, ponajviše inkretina, koji sudjeluju u održavanju koncentracije glukoze u krvi stalnim i pomažu u glikemijskoj kontroli (166, 167).

Potencijal terapijske primjene inhibitora DPP IV/CD26 kao i njegova klinička značajnost zaista su veliki, a rasvjetljavanje uloge ove molekule u različitim fiziološkim i patološkim procesima presudno i u tom smislu (168).

1.2.11. Metabolički učinci inhibicije DPP IV/CD26

Prvotna ideja o inhibiciji aktivnosti DPP IV/CD26 u cilju terapije dijabetesa tipa 2 nastala je iz saznanja mogućnosti katalitičke razgradnje inkretinskog hormona, glukagonu sličnog peptida 1 (GLP-1). GLP-1 predstavlja gastrointestinalni inkretinski hormon koji se u cirkulaciju otpušta postprandijalno i potiče lučenje inzulina stimulirano glukozom. Osim toga, ima cijeli niz drugih djelovanja u metaboličkom smislu, od odgađanja pražnjenja želuca, do inhibicije lučenja glukagona, a sveukupnost njegovog djelovanja doprinosi osjećaju sitosti. Nadalje, GLP-1 utječe na beta stanice gušterače potičući njihovu neogenezu i inhibirajući njihovu apoptozu te potiče biosintezu inzulina što ga čini izvrsnim kandidatom u terapiji dijabetesa, što je kliničkim istraživanjima i potvrđeno (169). Osim GLP-1, značajan inkretinski hormon je i inzulinotropni peptid ovisan o glukози (engl. *glucose-dependent insulintropic peptide*, GIP) te niz ostalih hormona koji sudjeluju u održavanju homeostaze glukoze. Vjeruje se da sinergistično djelovanje GIP-a i GLP-1 uzrokuje čak otprilike 60-70% postprandijalnog lučenja inzulina (170). Međutim, biološki poluživot ovih inkretina vrlo je kratak (svega 1-2 minute za GLP-1 te 7 minuta za GIP), jer podliježu katalitičkoj razgradnji od strane enzimskog djelovanja DPP IV/CD26 što dovodi do njihove inaktivacije (169). Stoga je cijeli niz istraživanja doveo do razvoja inhibitora DPP IV/CD26, u cilju poboljšanja metaboličke kontrole i očuvanja homeostaze glukoze u oboljelih od dijabetesa tipa 2 (167).

Slika 10 prikazuje metaboličke učinke inhibicije DPP IV/CD26. Sprječavanjem razgradnje supstrata involviranih u očuvanje homeostaze glukoze u krvi, putem smanjenja apetita, usporavanja pražnjenja želuca, poticanja lučenja inzulina te inhibicije lučenja glukagona, postiže se pozitivan terapijski učinak kod oboljelih od dijabetesa tipa 2 (122).

Slika 10. Metabolički učinci inhibicije DPP IV/CD26 (prilagođeno prema ((122))

Dosadašnje zapažene nuspojave korištenja inhibitora DPP IV/CD26 relativno su benigne a ponajviše se ističe mogućnost nastajanja hipoglikemije i posljedičnog hipoglikemijskog šoka. Najozbiljnija moguća nuspojava terapije inhibitorima DPP IV/CD26 uključuje alergijske reakcije koje mogu biti i kobne. Korištenje inhibitora DPP IV/CD26 nije indicirano u oboljelih od dijabetesa tipa 1 (167).

1.3. Crijevno-mozgovna os

Vrlo aktivno područje istraživanja posljednjih nekoliko godina jest dvosmjerna povezanost mozga i probavnog sustava. Novija znanstvena saznanja ukazuju na važnu poveznicu imunosnog, živčanog i probavnog sustava. Upravo zbog isprepletenosti ovih sustava uveden je i termin crijevno-mozgovna os (engl. *gut-brain axis*), koja ukazuje na njihovu međuovisnost u održavanju homeostaze, kako probavnog sustava, tako i cjelokupnog organizma (171).

Posljednjih godina dobivena su saznanja o neuroimunomodulaciji kao vrlo značajnoj karici u autoimunosti i nastanku upale te činjenici da neurogena upala može biti uključena u patogenezu upalnih bolesti crijeva (172). Pokazano je da imunosne stanice luče neuropeptide i neuroendokrine hormone, te da neuroendokrine stanice luče određene citokine (173). Osim toga, ukazano je na uzročno-posljedičnu vezu neuroendokrinih medijatora i citokina te njihov, zasad još uvijek nedovoljno razjašnjen, učinak na imunosni odgovor organizma (172, 173).

Slika 11. Shematski prikaz komponenti crijevno-mozgovne osi

1.3.1. Crijevno-mozgovni peptidi

U početku se ideja o mogućnosti da neuroni posjeduju svojstva endokrinih stanica, uključujući i mogućnost lučenja biološki aktivnih peptida činila prilično revolucionarnom (174). Kada je Scharrer u svom znanstvenom članku „*Neurosecretion - comparative and evolutionary aspects*“ (175) sažeo dotadašnje spoznaje i predložio nove mogućnosti, mnogi znanstvenici nisu bili naklonjeni takvim razmišljanjima.

Današnja saznanja opisuju crijevno-mozgovne peptide kao posrednike komunikacije središnjeg i enteričkog živčanog sustava, ali i neuroimunomodulacijske medijatore. Ovo istraživanje fokusirano je na dva značajna neuropeptida, neuropeptid Y (NPY) i vazoaktivni intestinalni peptid (VIP).

1.3.1.1. Neuropeptid Y (NPY)

Prva saznanja iz literature o neuropeptidu Y (NPY) potječu iz 1982. kada su Tatemoto i sur. (176, 177) objavili primarnu sekvenciju aminokiselina NPY-a u mozgu. Utvrdili su da dijeli visoki stupanj homologije u sekvenciji aminokiselina s peptidom YY (PYY) (70%) i polipeptidom pankreasa (PP) (50%) i stoga ih svrstali u novootkrivenu obitelj peptida. Uslijedila su daljnja istraživanja strukture ovih peptida podrijetlom iz ostalih tkiva i vrsta živih bića. NPY jedan je od evolucijski najočuvanijih neuroendokrinih peptida u živih organizama (178). Slijed aminokiselina u primarnoj strukturi NPY razlikuje se u svega dvije aminokiseline između pojedinih (samo nekih) vrsta. Kao primjer može se izložiti čak 92% identičnosti slijeda aminokiselina između ribe *Torpedo marmorata* i sisavaca, koji su evolucijski odijeljeni više od 400 milijuna godina. Visoki stupanj konzerviranosti NPY tijekom evolucije upućivao je na vrlo važnu biološku funkciju ovog peptida, što ga čini područjem osobitog znanstvenog interesa (179, 180).

1.3.1.1.1. Molekularna i strukturna svojstva

NPY neuropeptid je relativne molekulske mase 4.7 kDa, sastavljen od 36 aminokiselina (178), slijedeće sekvencije: Tyr - Pro - Ser - Lys - Pro - Asp - Asn - Pro - Gly - Glu - Asp - Ala - Pro - Ala - Glu - Asp - Met - Ala - Arg - Tyr - Tyr - Ser - Ala - Leu - Arg - His - Tyr - Ile - Asn - Leu - Ile - Thr - Arg - Gln - Arg - Tyr. Ime mu potječe od jednoslovne skraćenice aminokiseline tirozin (Y), zbog pet tirozinskih ostataka kojih sadrži u svojoj strukturi.

Humani gen koji kodira NPY nalazi se na sedmom kromosomu, lokus 7p15.1 (178, 180). Transkript RNA NPY-a sadrži četiri egzona ukupne dužine 551 parova baza. Egzon 1 (86 parova baza) sadrži 5'-UTR (engl. *untranslated region*). Egzon 2 (188 parova baza) kodira signalni peptid i najveći dio zrele sekvencije NPY; na njega se nastavlja egzon 3, dužine 82 parova baza, te naposljetku egzon 4 (21 + 174 parova baza) koji uključuje 3'-UTR.

Kodirajuća sekvenca (291 parova baza) NPY gena sintetizira pre-pro NPY, peptidni prekursor sastavljen od 97 aminokiselinskih ostataka (ukupne molekulske mase 10.8 kDa). Cijepanjem ovog pre-pro NPY nakon 28. aminokiselinskog ostatka rezultira u nastajanju pro-NPY koji sadrži 69 aminokiselinskih ostataka. Pro-NPY podliježe katalitičkom djelovanju prokonvertaza (PC)1/3 i/ili PC2 na pozicijama Lys³⁸-Arg³⁹. Nakon daljnjeg enzimskog djelovanja karboksipeptidaza, iz rezultirajućeg NPY₁₋₃₇ djelovanjem peptidil-glicin-amidirajuće monooksigenaze nastaje biološki aktivan peptid NPY₁₋₃₆. Ovaj je korak ključan za biološku aktivnost ovog neuropeptida (178). Zreli NPY može nadalje biti metaboliziran katalitičkim djelovanjem dipeptidil-peptidaze IV (DPP IV/CD26), što rezultira nastajanjem NPY₃₋₃₆ te djelovanjem aminopeptidaze P, što pak rezultira nastajanjem NPY₂₋₃₆ (149, 178).

Tercijarna struktura NPY karakterizirana je trodimenzionalnom strukturom koja se naziva PP-navoj. Trodimenzionalna struktura sintetskog humanog NPY u vodenoj otopini pri pH 3.2 i 37°C određena je dvodimenzionalnom ^1H NMR spektroskopijom istraživanjem Monksa *i sur.* (181). Utvrđeno je da aminokiselinski ostaci 13-36 tvore amfipatsku alfa-uzvojnica. Posljednjih 10 N-terminalnih aminokiselinskih ostataka ne tvore definiranu geometrijsku strukturu poput alfa-uzvojnice no postoje odreženi elementi simetrije i lokalne strukturalne organiziranosti. Najmanje jedan od tri N-terminalnih prolina može se nalaziti u *cis*- i *trans*- konfiguraciji.

Shematska struktura NPY dobivena navedenim istraživanjima prikazana je na slici 12.

Slika 12. Shematski prikaz tercijarne strukture NPY (181)

1.3.1.1.2. Biološka značajnost

Biološka funkcija NPY-a raznolika je i dotiče se različitih područja neuroimunobiokemijskih interakcija. NPY ima važnu ulogu u metabolizmu, naime jedan je od najsnažnijih poznatih oreksogenih čimbenika i u tom je smislu najviše i istraživan. Koncentracije NPY-a izmijenjene su u odnosu na fiziološke vrijednosti u svim stanjima koja uključuju poremećaje energetske homeostaze i metabolizma, poput anoreksije i bulimije te dijabetesa (178). Među utvrđene učinke NPY-a spadaju i smanjena termogeneza, anti-konvulzivno djelovanje, anksiolitičko djelovanje, involviranost u procese nocicepcije, utjecaj na regulaciju krvnog tlaka te modulacija kognitivnih funkcija (182). Osobito je važna, i u ovom istraživanju proučavana, njegova potencijalna involviranost u upalne procese kod patogeneze upalnih bolesti crijeva (183).

NPY ostvaruje svoje biološke učinke putem pet zasad poznatih i opisanih receptora u sisavaca, Y1, Y2, Y4, Y5 i Y6. Prvi izolirani receptor NPY-a bio je Y1, a dosadašnja saznanja pripisuju mu i najveći biološki značaj. Pojedini receptori različito su uključeni u određene fiziološke i patološke procese, od kojih zasigurno brojni još uvijek nisu ni otkriveni (178). Sadašnja saznanja o potencijalnim fiziološkim ulogama receptora NPY-a prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Potencijalna uloga receptora NPY-a u fiziološkim procesima

Fiziološki proces	Uključeni receptor(i)
Regulacija krvnog tlaka	Y1, Y2
Uzimanje hrane	Y1, Y2, Y4, Y5
Regulacija moždanih valova	Y1, Y2, Y5
Anksioznost	Y1, Y2, Y5
Regulacija okoštavanja	Y2
Regulacija lučenja luteinizirajućeg hormona	Y1
Osjetljivost na bol	Y1, Y2
Depresija	Y1, Y2
Regulacija motiliteta crijeva	Y2, Y4
Angiogeneza	Y1, Y2

Katalitičkim djelovanjem DPP IV/CD26 NPY gubi svoj afinitet za Y1 receptor, čime se onemogućuje njihovo povezivanje i sprječava daljnja biološka aktivnost (184).

1.3.1.2. Vazoaktivni intestinalni peptid (VIP)

Izolacija i purifikacija vazoaktivnog intestinalnog peptida zabilježena je 1970. kada su Said i Mutt (185), istražujući visoku incidenciju sistemske hipotenzije u oboljelih od plućnih bolesti željeli identificirati supstancu zaslužnu za snižavanje krvnog tlaka. Pritom su izolirali polipeptid iz svinjskog crijeva, organa koji potječe iz istog zametnog listića poput pluća te ga u objavljenom znanstvenom članku nazvali „polipeptid s rasprostranjenom biološkom aktivnošću“. Naziv „intestinalni“ zapravo je povijesnog značaja, a vezan je uz prvi opis VIP-a u ekstraktu intestinalne mukoze (186). Današnja saznanja opisuju VIP kao neuropeptid a moguće i kao citokin, prisutan ne samo u gastrointestinalnom već i u živčanom, endokrinom i imunom sustavu (187).

VIP pripada glukagon-sekretin obitelji peptida, koja uz njega sadrži još pet strukturno povezanih peptida: glukagon, sekretin, o glukozu ovisan inzulinotropni peptid, peptidni hormon s N-terminalnim histidinom te C-terminalnim izoleucinom (PHI-27) i čimbenik oslobađanja hormona rasta (188).

1.3.1.2.1. Molekularna i strukturna svojstva

Vazoaktivni intestinalni peptid u svojoj primarnoj strukturi sadrži 28 aminokiselina, slijedeće sekvencije: His - Ser - Asp - Ala - Val - Phe - Thr - Asp - Asn - Tyr - Thr - Arg - Leu - Arg - Lys - Gln - Met - Ala - Val - Lys - Lys - Tyr - Leu - Asn - Ser - Ile - Leu - Asn. Dijeli 68% sličnosti s PACAP-om (engl. *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*) u primarnoj strukturi, odnosno sekvenciji aminokiselina.

Humani gen koji kodira VIP nalazi se na šestom kromosomu, kromosomska regija 6q24. Cjeloviti gen prostire se na 8837 parova baza te sadrži ukupno šest introna i sedam egzona, od kojih svaki kodira zasebnu funkcionalnu domenu proteinskog prekursora, odnosno njezinu mRNA. Egzon 1 (duljine 165 parova baza) sastoji se od 5'-

UTR regije mRNA, egzon 2 (duljine 117 parova baza) kodira signalni peptid, egzon 3 (duljine 123 parova baza) kodira N-terminalni peptid, egzon 4 (duljine 105 parova baza) kodira PHM, egzon 5 (duljine 132 parova baza) kodira VIP, egzon 6 (duljine 89 parova baza) kodira C-terminalni peptid, dok se egzon 7 (duljine 723 parova baza) sastoji od 3'-UTR regije mRNA (189).

Zreli, biološki aktivan oblik VIP-a se sintetizira iz prekursorne molekule (prepro-VIP), koji također sadrži domenu PHM/PHI. Prepro-VIP sadrži ukupno 170 aminokiselina, a metabolizira se u endoplazmatskoj mrežici što rezultira molekulom pro-VIP-a. Pro-VIP sadrži pak 148 aminokiselina i podliježe katalitičkom djelovanju prohormonske konvertaze pri čemu nastaju VIP-GKR (prepro-VIP₁₂₅₋₁₅₅) i PHM-GKR (prepro-VIP₈₁₋₁₁₀). VIP-GKR i PHM-GKR nakon čega enzimskim djelovanjem karboksipeptidaze-B i sličnih enzima prelaze u VIP-G i PHM-G, iz kojih naposljetku nastaju VIP i PHM (189).

Shematska struktura VIP-a u interakciji s njegovim hVPAC1-receptorom prikazana je na slici 13.

Slika 13. Shematski prikaz strukture vazoaktivnog intestinalnog peptida (označeno ljubičastom bojom) u interakciji sa specifičnim hVCAP-1 receptorom (190)

1.3.1.2.2. Biološka značajnost

VIP je opsežno rasprostranjen u središnjem i perifernom živčanom sustavu, a luče ga i imunosne stanice (189). Ima vrlo snažne učinke u okviru fizioloških i patoloških procesa, obzirom da posjeduje modulacijske učinke na značajan broj bioloških funkcija u neurološkom, endokrinom i imunosnom sustavu (189, 190). Svoju biološku ulogu ostvaruje putem zasad tri prepoznata i opisana receptora: VPAC₁, VPAC₂ i PAC₁R (191).

Široka rasprostranjenost VIP-a u organizmu povezana je sa širokim spektrom njegovih bioloških učinaka. VIP je involviran u veliki broj izuzetno važnih fizioloških procesa, poput regulacije imunosnih i neuroendokrinih procesa, vazodilatacije, bronhodilatacije, regulacije hiperglikemije, opuštanja glatkog mišićja, poticanje rasta, hormonske regulacije, analgezije, regulacije hipertermije, ima ulogu u kognitivnim procesima, metabolizmu kostiju te izražava učinke na sekrecijske procese u gastrointestinalnom sustavu, kao i regulaciju motiliteta crijeva (189).

Pokazana je uključenost VIP-a i u patogenezi upalnih bolesti crijeva. Jedna od najvažnijih osobina VIP-a je njegova modulacijska uloga u upalnim procesima. Vjeruje se da VIP ima protuupalno djelovanje koje se očituje kroz sprječavanje lučenja proupalnih i istovremeno poticanje lučenja protuupalnih faktora, i lokalno i sistemski. Dosadašnja su istraživanja utvrdila izmijenjene vrijednosti koncentracije VIP-a u biopstatima pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva (192). U crijevu VIP sprječava lučenje TNF- α , IL-2 i IFN- γ od strane Th1 autoreaktivnih stanica. Istovremeno, potiče regulacijske limfocite T na lučenje protuupalnih faktora IL-10 i TGF- β (193). Ove mu svojstvenosti pripisuju ulogu potencijalnog kandidata u smislu terapije upalnih bolesti crijeva (194).

1.3.2. Interleukini

Interleukini su skupina citokina koji imaju posredničku ulogu u komunikaciji između različitih vrsta limfatičkih stanica. Predstavljaju skupinu proteinskih hormona koji reguliraju efektorsku fazu imunosti, odnosno imunosni odgovor neposredno nakon prepoznavanja antigena od strane imunosnog sustava. U zdravim organizmima prisutni su u vrlo niskim koncentracijama, no tijekom efektorske faze imunosti (prirođene i specifične) izlučuju se u većim pa i vrlo visokim koncentracijama. Premda su strukturno i

genetski definirani, većina njihove funkcije u fiziološkim i patološkim procesima ipak nije potpuno jasna, ponajviše zbog nedostatnih spoznaja o svim mogućim unutarstaničnim i vanstaničnim učincima (195).

Sintetiziraju ih različite stanice, a ciljne su im stanice raspoređene po cijelom organizmu. Djeluju sinergistički; često redundantno a mnogokad imaju mnogostruka djelovanja na iste tipove stanica, u ovisnosti o koncentraciji. Osim toga, pojedini interleukin utječe na sintezu drugog, odnosno ostalih interleukina zbog povratne sprege. Poput ostalih polipeptidnih hormona, interleukini svoje djelovanje započinju vezivanjem na receptor ciljne stanice, a ono može biti autokrino, parakrino ili endokrino (196).

Ovaj rad obuhvaća istraživanja vezana uz interleukin-6 (IL-6) te interleukin 10 (IL-10), pa će dalje biti riječi o njima.

1.3.2.1. Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 je glukoprotein relativne molekulske mase 21-26 kDa koji u svojoj primarnoj sekvenci sadrži 184 aminokiselina. Član je obitelji citokina koja uključuje još i IL-11, odnosno LIF (od engl. *Leukemia Inhibiting Factor*), CNTF (od engl. *Ciliary Neurotrophic Factor*) i OSM (od engl. *Oncostatin M*). Gen koji kodira humani IL-6 nalazi se na kromosomu broj 7, lokus p21. U fiziološkim uvjetima stanice ne luče značajnije količine IL-6 no kod većeg broja tumora gen koji kodira IL-6 konstitutivno je aktivan. IL-6 pronađen je kao produkt limfocita T koji inducira zadnji korak u prijetvorbi limfocita B u plazma stanice koje nakon toga luče protutijela. Osim toga, luče ga i monociti, makrofazi, aktivirani CD4⁺ limfociti T i fibroblasti (197).

Slika 14. Shematski prikaz trodimenzionalne strukture interleukina-6

Uloga IL-6 je važna u specifičnoj staničnoj imunosti. IL-6 ima nadalje ulogu u proizvodnji proteina akutne faze u stanicama jetre, razvoju neurona, sazrijevanju megakariocita, aktivaciji osteoklasta te u rastu tumora. Ima vrlo značajnu ulogu u procesima nastanka upale i u traumama (npr. kod opekotina i ostalih oštećenja tkiva), gdje stimulira imunosni odgovor te naposljetku dovodi do nastanka upale (197). IL-6 involviran je u patogenezu mnogih autoimunih i upalnih bolesti, poput reumatoidnog artritisa i multiplog mijeloma, a što je osobito važno za ovo istraživanje, uključen je u patogenezu upalnih bolesti crijeva (198, 199).

Funkcionalni receptor IL-6 sastoji se od dva lanca; IL-6R u užem smislu te signalno-provodnog lanca IL-6ST (engl. *Interleukin-6 signal transducer*), koji se naziva još i gp130. Vezivanje IL-6 za IL-6R uzrokuje homodimerizaciju gp130, što izaziva aktivaciju signalnih molekula poput Jak1, Jak2 i Tyk2, što dovodi do cijele kaskade reakcija u signalnim putovima (196).

1.3.2.2. Interleukin 10 (IL-10)

Humani IL-10 protein je relativne molekulske mase 18 kDa, nije glikozilirani i javlja se u obliku nekovalentno povezanog homodimera. Pripada obitelji citokina u koju još ubrajamo i IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26 te IL-28/29. IL-10 receptor, koji se sastoji od dva lanca (R1 i R2) odgovoran je za biološko djelovanje IL-10. IL-10 uglavnom luče aktivirani CD4⁺ limfociti (Th₂ imunskog odgovora), citotoksične CD8⁺ stanice, zrele dendritičke stanice tipa 2, monociti/makrofazi, mast-stanice i keratinociti. Regulacijski limfociti T luče samo IL-10. Isto tako, luče ga i limfociti B u kasnijim fazama aktivacije. IL-10 pospješuje razvoj Th2-CD4⁺ limfocita, a inhibira razvoj Th1 subpopulacije limfocita T (40).

Slika 15. Shematski prikaz trodimenzionalne strukture interleukina-10

Funkcija IL-10 većinom je inhibicijske naravi a posjeduje pleiotropne učinke u imunoregulaciji i upalnim procesima. Biološka funkcija IL-10 uključuje smanjenje lučenja proupalnih citokina poput IL-6 i TNF- α . Istraživanja na životinjskim modelima deficijencije IL-10 potvrdila su njegovu esencijalnu ulogu u imunoregulaciji događaja u gastrointestinalnom traktu, ponajviše u smislu očuvanja imunosne tolerancije. Štoviše, IL-10 deficijentni miševi spontano razvijaju Crohnu-sličan kolitis što govori o njegovom izuzetnom značaju u ovoj bolesti (200). Pokazano je da oboljeli od Crohnove bolesti imaju nižu koncentraciju IL-10 u cirkulaciji. Uočeno je da u životinja kojima je induciran Crohnu-sličan kolitis, genska terapija IL-10 smanjuje kliničke simptome bolesti i pospješuje oporavak oboljelih životinja (201). Temeljem istraživanja na životinjskim modelima bolesti i pozitivnih rezultata korelacije IL-10 i smanjenja simptoma bolesti, uznapredovala su i klinička ispitivanja terapijske uporabe IL-10 lučenog od strane transgeničnih bakterija u oboljelih od Crohnove bolesti (202).

2. Ciljevi istraživanja

2. Ciljevi istraživanja

Ovo se istraživanje temelji na pretpostavci da dipeptidil-peptidaza IV, odnosno molekula CD26 (DPP IV/CD26) ima značajnu neuroimunomodulacijsku ulogu, obzirom da je biološka aktivnost mnogih neuropeptida i interleukina pod izravnim utjecajem ove molekule. Pretpostavljamo da je profil medijatora neuroimunskog odgovora izmijenjen u upalnim bolestima crijeva te da u tim procesima važnu ulogu ima DPP IV/CD26.

Svrha predloženog istraživanja je ispitati povezanost dipeptidil-peptidaze IV odnosno molekule CD26 (DPP IV/CD26) i Crohnove bolesti, praćenjem profila medijatora neuroimunskog odgovora tijekom nastanka i tijeka bolesti.

Kako bismo ispitali ulogu DPP IV/CD26 u patogenezi upalnih bolesti crijeva odnosno Crohnove bolesti, postavili smo sljedeće ciljeve:

1. Odrediti je li i na koji način molekula CD26, odnosno dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV/CD26) uključena u patogenezu Crohnove bolesti uspostavom pokusnog modela kolitisa (TNBS-kolitis, *Crohn-like colitis*) izazvanog u divljem tipu (C57BL/6) i CD26 deficijentnom (CD26^{-/-}) mišu;
2. Ispitati utječe li i na koji način nedostatak molekule CD26, odnosno dipeptidil-peptidaze IV (DPP IV/CD26) na biološku aktivnost njezinih supstrata, neuropeptida VIP i NPY te interleukina, IL-6 i IL-10;
3. Utvrditi na koji način neuropeptidi, NPY i VIP te interleukini, IL-6 i IL-10 sudjeluju u lokalnim i sistemskim neuroimunskim učincima uključenim u razvoj i tijek Crohnove bolesti u divljem tipu (C57BL/6) i CD26 deficijentnom (CD26^{-/-}) mišu.

Pretpostavljamo da je DPP IV/CD26 putem svojih enzimskih i kostimulacijskih učinaka uključena u modulaciju imunskih mehanizama koje vode k razvoju ove bolesti.

Njezina bi potencijalna uloga mogla biti dvojaka; *prvo*: moguće je da proteolitičkim djelovanjem sudjeluje u aktivaciji i inaktivaciji specifičnih supstrata, biološki važnih neuro- i imunopeptida, za koje je poznato da sudjeluju u procesima upale i regeneracije sluznice crijeva odnosno mehanizama održavanja ravnoteže upalnih i protuupalnih procesa; *drugo*: pretpostavljamo da DPP IV/CD26 kao kostimulacijska molekula sudjeluje u regulaciji i modulaciji imunosnog odgovora.

3. Materijal i metode

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

3.1.1. Kemikalije i reagensi

Za potrebe analitičkih postupaka u provedenom su istraživanju korištene sljedeće kemikalije i reagensi:

Aceton (CH_3COCH_3), *Kemika*

Akrilamid PAGE ($\text{CH}_2\text{:CHCONH}_2$), *Amersham Biosciences*

Albumin goveđeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*, BSA), *Sigma*

Amonijev persulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$), *Amersham Biosciences*

Coomasie Brilliant Blue G-250, *Acros Organics*

Eozin, *Shandon Inc.*

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

Fiksativ fotosenzibilnih filmova, REF 528-5937, *Kodak*

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

Glicin ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), *Amersham Biosciences*

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

Hematoksilin, *Shandon Inc.*

Izosan®-G-V, *Veterina d.o.o.*

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

Kalcijev-klorid (CaCl_2), *Kemika*

Ksilol (C_8H_{10}), *Kemika*

Manitol ($\text{C}_6\text{H}_8(\text{OH})_6$), *Kemika*

Medij za montiranje – Entellan, *Merck*

Merkaptoetanol ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), *Amersham Biosciences*

Metanol (CH₃OH), *Kemika*

Mlijeko u prahu (*Blotto non-fat dry milk*), *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*

N,N,N',N'-tetrametil-etilen-diamin, TEMED, *Amersham Biosciences*

Narketan[®] 10, injekcijska otopina, *Vetoquinol*

Natrijev-dodecil-sulfat, SDS (C₁₂H₂₅OSO₃Na), *Amersham Biosciences*

Natrijev-hidroksid (NaOH), *Kemika*

Octena kiselina (CH₃COOH), *Kemika*

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

Parafin, *Shandon Inc.*

Ponceau S (C₂₂H₁₂N₄Na₄O₁₃S₄), *USB Corporation*

Proteinski biljeg *Fermentas Life Sciences PageRuler™*, *Fermentas*

Proteinski biljeg *Kaleidoscope Prestained Standards*, *BIO-RAD*

Razvijač, komplet otopina za razvijanje fotosenzibilnih filmova, REF HT536, *Agfa*

RIPA Lysis Buffer (*Radioimmunoprecipitation buffer*), pufer za liziranje i izolaciju proteina tkiva 1x, s inhibitorima fosfataza i proteaza, sc-24948, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*

Supstrat za detekciju fotoluminiscentnog signala, *Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents*, RPN2132, *GE Healthcare*

3',3'',5',5''-tetrabromo-fenolsulfonftalein (Bromofenolno modriilo, C₁₉H₁₀Br₄O₅S), *Amersham Biosciences*

Tris(hidroksimetil)-aminometan (NH₂C(CH₂OH)₃), *Amersham Biosciences*

2,4,6-trinitrobenzensulfonska kiselina (TNBS, pikrilsulfonska kiselina, C₆H₃N₃O₉S), *Sigma-Aldrich Life Sciences*

Tween 20 (polietoksietilen-sorbitan monolaureat), *Amersham Biosciences*

Xylapan[®], injekcijska otopina, *Vetoquinol*

Protutijela

U istraživanjima provedenima u ovom radu korištena su sljedeća protutijela:

Primarno zečje poliklonsko protu-NPY protutijelo, NPY (FL-97): sc-28943, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*

Primarno zečje poliklonsko protu-VIP protutijelo, VIP (H-95): sc-20727, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*

Primarno zečje poliklonsko protu-CD26 protutijelo, CD26 (H-270): sc-9153, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*

Primarno mišje monoklonsko protu- β -aktin protutijelo, MAB1501, *Chemicon International*

Sekundarno mišje protu-zečje protutijelo konjugirano s peroksidazom hrena (*horseradish peroxidase*, HRP) (IgG-HRP), sc-2357, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*

Sekundarno kozje protu-mišje protutijelo konjugirano s peroksidazom hrena (*horseradish peroxidase*, HRP) (IgG-HRP), sc-2005, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*

Uređaji

Tijekom provođenja analitičkih postupaka u izvedbi ovog istraživanja korišteni su sljedeći instrumenti i uređaji:

Analitička vaga, *Mettler toledo*

Aparat za dobivanje ultra čiste vode, *TKA MicroPure*

Automatske pipete, *Eppendorf*

Centrifuga LC-320, *Tehnica*

Centriguga ROTINA 420R, *Hettich Zentrifugen*

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

Destilator vode, *TKA Pacific*

Digitalna kamera (C-3030), *Olympus*

Digitalni fotoaparat, *Olympus*

Digitalna vaga, *Mettler toledo*

Histokinet, *MSE*

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

Mikrocentrifuga, *Beckman*

Mikrotom (HM340 E), *Laica*

Optički digitalni skener, *Canon solutions*

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

Sustav za elektroforetsko razdvajanje proteina, *BIO-RAD*

Sustav za polu-suhi transfer proteina (*Western blot*), *BIO-RAD*

Svjetlosni mikroskop (BX 40); *Olympus B201*

Tresilica s inkubatorom temperature, *unimax 1010, Heidolph*

Ultracentrifuga, *Beckman*

UV/VIS spektrofotometar, *Carry 2, Varian*

Vodena kupelj, *Koettermann*

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

Puferi i otopine reagensa

Za potrebe znanstvenih istraživanja obuhvaćenih ovim radom pripremljeni su sljedeći puferi i otopine reagensa:

Otopina 2,4,6-trinitrobenzensulfonske kiseline u etanolu

U ovom je istraživanju za uspostavu pokusnog modela kolitisa korištena 5% -tna vodena otopina TNBS-a (w/v). Na sobnoj je temperaturi tekućeg agregatnog stanja, žarko žute boje, a čuva se na temperaturi od +2 do +8°C. Otopina 5%-tne TNSB-a u

50%-nom etanolu dobivena je na način da se jednaki volumeni izvorne otopine TNBS-a i 50%-tnog etanola (dobivenog razrjeđivanjem destiliranom vodom iz apsolutnog alkohola) pomiješaju u jednakim omjerima. Otopina TNBS-a u etanolu pripremana je neposredno prije rektalne aplikacije pokusnim životinjama.

Tris-HCl pufer (1 M, pH=8,0)

Za pripremu otopine 1 M Tris-HCl pufera (pH=8,0) potrebno je prethodno pripremiti otopinu 1 M Tris-a koja se dobiva otapanjem 1,2114 g krute Tris baze u 10 mL destilirane vode. Ukupno 4,305 mL 1 M pripremljene otopine Tris-a pomiješa se s 2,5 mL 1M HCl i nadopuni do 50 mL destiliranom vodom. Dobivenoj otopini izmjeri se pH pomoću digitalnog pH-metra a ukoliko odstupa od 8,0, pH se podešava s otopinom HCl-a, destilirane vode ili eventualno otopinom NaOH. Dobiveni pufer pohranjuje se na +4°C i koristi se za homogenizaciju uzoraka tkiva prilikom ekstrakcije proteina te za određivanje aktivnosti DPP IV/CD26.

Acetatni pufer (pH=4,5)

Ukupno 6,5 mL 1M etanske kiseline pomiješa se s ukupno 2,5 mL otopine 1 M NaOH te nadopuni destiliranom vodom do 50 mL. Dobivenoj otopini izmjeri se pH pomoću digitalnog pH-metra, a ukoliko odstupa od 4,5 pH podesi se otopinom NaOH, destilirane vode ili eventualno otopinom HCl-a. Dobiveni pufer pohranjuje se na +4°C i koristi se za zaustavljanje katalitičke reakcije pri određivanju aktivnosti DPP IV/CD26.

Supstrat za određivanje katalitičkog djelovanja DPP IV/CD26 i DPP IV/CD26-sličnih enzima

Supstrat za određivanje katalitičkog djelovanja DPP IV/CD26 i DPP IV/CD26-sličnih enzima korišten u ovom istraživanju, glicin-prolin-p-nitroanilid (Gly-pro-p-NA), proizvođača *Sigma-Aldrich Life Sciences*, u izvornom pakiranju sadrži 25 mg i otapa se u 1901 μ L ultra čiste vode. Odnosno, 6,575 mg liofiliziranog Gly-pro-p-NA otapa se u 500 μ L ultra čiste vode. Dobivena otopina supstrata pohranjuje se na +4°C i koristi se za određivanje enzimske aktivnosti DPP IV/CD26 i DPP IV/CD26-sličnih enzima u serumu i homogenatima tkiva pokusnih životinja.

Tris-HCl pufer (1,5 M, pH=8,8)

Za pripremu 1,5 M Tris-HCl pufera (pH=8,8) ukupno 90,83 g krute Tris-baze otopi se u nešto manje od 500 mL ultra čiste vode, izmjeri se pH pomoću digitalnog pH-metra te ukoliko odstupa od 8,8, pH se podesi pomoću HCl odnosno NaOH, nadopuni ultra čistom vodom do 500 mL te ponovno provjeri pH. Dobiveni pufer pohranjuje se na +4°C, a koristi se za pripremu gelova za elektroforetsko razdvajanje proteina.

Tris-HCl pufer (0,5 M, pH=6,8)

Za pripremu 0,5 M Tris-HCl pufera (pH=6,8) ukupno 15,14 g krute Tris-baze otopi se u nešto manje od 250 mL ultra čiste vode te se dobivenoj otopini izmjeri pH pomoću digitalnog pH-metra. Ukoliko pH odstupa od 6,8, pH se podesi pomoću HCl odnosno NaOH, nadopuni ultra čistom vodom do 250 mL te ponovno provjeri pH. Dobiveni pufer pohranjuje se na +4°C a koristi se za pripremu gelova za elektroforetsko razdvajanje proteina.

Pufer za pripremu uzoraka za postupak elektroforeze

Peterostruko koncentrirani pufer za nanošenje uzoraka na gel za elektroforezu (engl. *Laemli loading buffer - Western blot loading buffer*) pripremljen je na sljedeći način: u 2 mL ultra čiste vode dodano je 5 mL glicerola, 1 g SDS-a, 5 mg bromfenolnog modrila te 3 mL 1 M Tris-HCl pufera pH=6,8. Smjesa je potom grijana na +100°C kroz 10 minuta. Dobivena otopina peterostruko koncentriranog pufera za nanošenje uzoraka na gel alikvotirana je te pohranjena na -20°C do uporabe.

Neposredno prije korištenja, u volumen 100 µL pripremljenog pufera dodaje se 5 µL merkaptotetanol. Obzirom da je dobiveni pufer za nanošenje uzoraka na gel za elektroforezu peterostruko koncentriran, razrjeđivan je u odgovarajućim omjerima, vodeći računa o koncentraciji ukupnih proteina u uzorku te o ukupnom volumenu konačne smjese za nanošenje na gel prilikom elektroforeze.

Ishodni pufer za elektroforezu i transfer proteina

Deseterostruko koncentrirani ishodni pufer za elektroforezu i transfer proteina u *Western blot* tehnici pripremljena je na sljedeći način: analitičkom vagom odvagano je 30,275 g Tris-baze te 144,13 g glicina, sastojci su otopljeni u 1 L ultra čiste vode a dobivena je matična otopina pohranjena na +4°C do korištenja.

Pufer za postupak elektroforetskog razdvajanja proteina

Pufer za postupak elektroforetskog razdvajanja proteina na gelu pripremljen je iz deseterostruko koncentriranog ishodnog pufera za elektroforezu i transfer (pripremljenog na prethodno opisani način) sljedećim postupkom: 50 mL otopine deseterostruko koncentriranog ishodnog pufera za elektroforezu i transfer i 5 mL 10%-tne otopine SDS-a pomiješane su i nadopunjene ultra čistom vodom do konačnog volumena 500 mL.

Volumen od 500 mL dostatan je za jedan postupak elektroforetskog razdvajanja proteina na gelu, a pripremljen je svjež na dan izvođenja tehnike uz prethodno hlađenje na +4°C.

Pufer za postupak prijenosa proteina na membranu

Pufer za postupak prijenosa proteina s gela na membranu pripremljen je iz deseterostruko koncentriranog ishodnog pufera za elektroforezu i transfer sljedećim postupkom: 50 mL otopine deseterostruko koncentriranog ishodnog pufera za elektroforezu i transfer i 100 mL metanola pomiješani su i nadopunjeni ultra čistom vodom do konačnog volumena 500 mL. Volumen od 500 mL dostatan je za dva postupka transfera proteina s gela na membranu. Pufer za postupak transfera proteina pripremljen je svjež na dan izvođenja tehnike uz prethodno hlađenje na +4°C.

Pufer za blokiranje nespecifičnih veznih mjesta (epitopa)

Pufer za blokiranje nespecifičnih veznih mjesta svjež je pripreman neposredno prije korištenja sljedećim postupkom: 2,5 g krutog nemasnog mlijeka u prahu pomiješano je s 250 µL Tris pufera (pH=7,5) te 1,5 mL 5 M otopine NaCl a zatim nadopunjeno destiliranom vodom do 50 mL. Dobivena koncentracija 5%-tnog mlijeka korištena je za blokiranje nespecifičnih veznih mjesta (epitopa).

Trisom puferirana fiziološka otopina (TBS)

Deseterostruko koncentrirana Trisom puferirana fiziološka otopina (TBS, engl. *Tris-buffered saline*) pripremljena je sljedećim postupkom: 24,22 g krute Tris-baze te 80,06 g krutog NaCl-a pomiješani su i otopljeni u oko 900 mL ultra čiste vode. Korištenjem digitalnog pH-metra, pH dobivene otopine postavljen je na 7,6 pomoću

koncentrirane HCl. Otopina je dopunjena do 1000 mL uz ponovnu provjeru pH te pohranjena na +4°C do korištenja.

Pufer za ispiranje (TBS-T)

Pufer za ispiranje (TBS-T, engl. *Tris-buffered saline-Tween*, odnosno Tween-trisom puferirana fiziološka otopina) pripremljena je neposredno prije upotrebe razrjeđivanjem 100 mL deseterostruko koncentrirane otopine TBS-a u 899 mL ultra čiste vode te dodatkom 1 mL izvorne otopine Tween 20. Dobiveni pufer za ispiranje korišten je istog dana provođenja tehnike *Western blot-a*.

Pufer za pripremu primarnih protutijela

Primarna protutijela za *Western blot* tehniku pripremana su u odgovarajućim optimalnim omjerima dobivenim prethodno provedenim pilot-pokusima koristeći otopinu 5%-tnog mlijeka pripremljenu na prethodno opisani način razrijeđenu s otopinom pufera za ispiranje (TBS-T-a) u omjeru 1:1.

Pufer za pripremu sekundarnih protutijela

Sekundarna protutijela za *Western blot* tehniku pripremana su u odgovarajućim optimalnim omjerima dobivenim prethodnim pilot-pokusima koristeći otopinu TBS-T-a svježe pripremljenu isti dan na prethodno opisan način.

Otopina za bojenje proteina prenesenih na membranu

Otopina za bojenje proteina prenesenih na membranu u *Western blot* tehnici pripremljena je otapanjem 0,500 g *Ponceau S* reagensa u 1,25 mL octene kiseline te dodatkom ultra čiste vode u konačnom volumenu od 250 mL. Dobivena smjesa potom je

miješana do postizanja homogenosti otopine, a zatim pohranjena na sobnoj temperaturi, uz zaštitu od izvora svjetlosti.

3.1.2. Laboratorijske životinje

Istraživanje je provedeno koristeći dva soja laboratorijskih miševa: divlji tip miša soja C57BL/6 (CD26^{+/+}), koji je ujedno i ishodan soj za drugu skupinu, miševe kojima je inaktiviran gen za molekulu CD26 (CD26^{-/-}, CD26 deficijentni miševi, C57BL/6 Jbom-ob). CD26 deficijentni miševi dobiveni su ljubaznošću dr. Didiera Margueta (Centre d'Immunologie de Marseille Luminy, Parc Scientifique de Luminy, Merseille Cedex, Francuska).

Pokusne životinje bile su istog spola (mužjaci) i dobi, starosti oko 10 (od 8 do 12) tjedana. Svaka je ispitivana skupina obuhvaćala 8-12 pokusnih životinja. Uzgajane su u središnjem uzgojnom centru Medicinskog fakulteta u Rijeci a nakon indukcije bolesti, odnosno aplikacije otopine TNBS-a, etanola ili fiziološke otopine, pokusne životinje su boravile u vivariju Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. Tijekom istraživanja pokusne životinje hranile su se standardnom laboratorijskom hranom (Standard diet GLP; Mucedola, Italija) i vodom *ad libitum* te boravile u standardnim kavezima za čuvanje laboratorijskih miševa uz prirodni ciklus izmjene svjetla i tame.

3.1.2.1. Etički aspekti istraživanja na pokusnim životinjama

Sva su istraživanja provedena na pokusnim životinjama provođena u skladu s važećim Zakonskim propisom (NN19/99), te Pravilnikom (NN176/04) Republike Hrvatske. Poštovana su temeljna etička i znanstvena načela o provođenju pokusa na pokusnim životinjama, uz izbjegavanje nepotrebnih pokusa i patnje pokusnih životinja.

Istraživanja su provedena u skladu s 3R načelima (1. engl. *replacement* – nadomještanje životinja, 2. engl. *reduction* – smanjenje broja životinja i 3. engl. *refinement* – oplemenjivanje postupaka).

Cjelokupno je istraživanje provedeno u sklopu znanstvenoistraživačkog projekta odobrenog i financiranog od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, pod nazivom „Uloga dipeptidil-peptidaze IV (CD26/DPP IV) u kroničnim bolestima“ (projekt br. 062-0061245-0213, voditelj projekta: prof.dr.sc. Jadranka Varljen). Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Rijeci odobrilo je postupke u provođenju znanstvenih istraživanja u cilju ostvarenja navedenog projekta.

3.2. Metode

3.2.1. Uspostava modela Crohnove bolesti u miša

Pokusni model kolitisa, odnosno model upalne bolesti crijeva (model Crohnove bolesti u miša, TNBS-kolitis, engl. *Crohn-like colitis*) induciran je u CD26^{+/+} i CD26^{-/-} skupinama anesteziranih laboratorijskih miševa rektalnom primjenom 5%-tne otopine TNBS-a otopljene u 50%-tnom etanolu. Navedena je koncentracija dobivena nakon provedenog pilot-pokusa te odabrana kao optimalna zbog najvećeg postotka postignutih upalnih promjena u kolonu pokusnih životinja a ujedno najmanje smrtnosti pokusnih životinja. Pilot-pokus obuhvatio je i sljedeće koncentracije TNBS-a u etanolu: 5% TNBS u apsolutnom etanolu, 5% TNBS u 70% etanolu, 5% TNBS u 50% etanolu, 5% TNBS u 30% etanolu, 2,5% TNBS u apsolutnom etanolu, 2,5% TNBS u 50% etanolu, 1,25% TNBS u apsolutnom etanolu te 1,25% TNBS u 50% etanolu.

3.2.1.1. Postupak anesteziranja pokusnih životinja

Sve su pokusne životinje iz pojedinih ispitivanih skupina uključene u ovo istraživanje anestezirane prije aplikacije otopine TNBS-a u etanolu, otopine etanola odnosno fiziološke otopine. Za anesteziju pokusnih životinja korištena je kombinacija anestetika koja se sastoji od otopine ksilapana (Xylapan[®], injekcijska otopina, *Vetoquinol*) te Narketana (Narketan[®] 10, injekcijska otopina, *Vetoquinol*). U tu svrhu, otopina ksilapana pripremljena je na način da se 2 mL izvorne otopine ksilapana pomiješa s 18 mL sterilnog PBS-a. Otopina narketana pripremljena je na način da se 2 mL izvorne otopine narketana pomiješa s 8 mL sterilnog PBS-a. Dobivene otopine alikvotirane su i pohranjene na -20°C. Neposredno prije postupka anesteziranja laboratorijskih životinja, pohranjeni alikvoti otopina ksilapana i narketana odmrznuti su i pomiješani u omjeru 1:1. Pojedina laboratorijska životinja anestezirana je intraperitonealnom aplikacijom 70 µL pripremljene kombinacije anestetika ksilapana i narketana pomoću inzulinske šprice.

Nakon provedenog postupka, laboratorijske životinje bile su u anesteziranom stanju približno dvadeset minuta u posebno grijanoj prostoriji. U ovom je razdoblju proveden postupak rektalne aplikacije otopine TNBS-a u etanolu, etanola, odnosno fiziološke otopine.

3.2.1.2. Postupak izazivanja kolitisa

U svrhu uspostave pokusnog modela kolitisa, klizma koja sadrži otopinu TNBS-a u 50%-tnom etanolu uvedena je u mišji kolon pomoću polipropilenskog katetera, u općoj anesteziji (80). Svakoj je laboratorijskoj životinji aplicirano 100 µL pripremljene otopine. Kontrolne skupine predstavljale su skupine CD26^{+/+} i CD26^{-/-} sojeva laboratorijskih

miševa kojima je pod istim uvjetima rektalno uveden jednaki volumen vodene otopine 50%-tnog etanola, odnosno fiziološke otopine.

Nakon aplikacije otopine TNBS-a u etanolu, otopine 50%-tnog etanola odnosno fiziološke otopine, životinje su držane u vertikalnom položaju kroz jednu minutu, kako bi se izbjeglo istjecanje aplicirane otopine iz kolona. Postupak rektalne aplikacije otopina prikazan je na slikama 16 i 17.

Slike 16 i 17. Aplikacija otopine TNBS-a u etanolu u anesteziranog miša

3.2.2. Plan pokusa

Kako bi se ispitale pretpostavke i ostvarili ciljevi ovog istraživanja, osmišljen je plan pokusa koji uključuje različite skupine pokusnih životinja oba soja kao i analitičke postupke. Oba su istraživana soja miša podijeljena u tri podskupine: pokusne skupine miševa kojima je aplicirana 5%-tna otopina TNBS-a u 50%-tnom etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis) te dvije kontrolne skupine. Prvu kontrolnu skupinu pojedinog soja laboratorijskih životinja predstavljaju miševi kojima je aplicirana vodena otopina 50%-tnog etanola a drugu kontrolnu skupinu predstavljaju miševi kojima je aplicirana fiziološka otopina. Svaka pojedina istraživana podskupina laboratorijskih životinja obuhvatila je najmanje osam miševa pojedinog soja.

Sve su laboratorijske životinje pojedinih istraživanih skupina žrtvovane cervikalnom dislokacijom, poštujući sva etička načela rada s pokusnim životinjama nakon drugog, sedmog, petnaestog i tridesetog dana od primjene otopine TNBS-a, etanola, odnosno fiziološke otopine (slike 18, 19, 20).

Slika 18. Shematski prikaz aplikacije otopine TNBS-a u etanolu
i žrtvovanja pokusnih životinja kojima je induciran kolitis

Slika 19. Shematski prikaz aplikacije otopine etanola
i žrtvovanja životinja kontrolnih skupina

Slika 20. Shematski prikaz aplikacije fiziološke otopine
i žrtvovanja životinja kontrolnih skupina

3.2.2.1. Procjena uspostave kolitisa

U cilju praćenja uspostave, razvoja i ciljeljenja kolitisa u različitim ispitivanim skupinama oba soja pokusnih životinja, pratio se niz kliničkih, makroskopskih i mikroskopskih parametara. Svim je pokusnim životinjama nakon aplikacije otopine TNBS-a u etanolu, vodene otopine etanola odnosno fiziološke otopine dnevno praćena promjena tjelesne težine, konzistencija stolice (formirana stolica, proljevasta stolica, opstipacija), eventualna pojava rektalnog krvarenja, prisutnost krvi u stolici te opće kliničko stanje.

Procjena uspostave kolitisa, osim temeljem kliničkih obilježja svake pojedine životinje određivana je i makroskopskom analizom prilikom žrtvovanja pokusnih životinja (konzistencija stolice, prisutnost ulceracija i upalnih žarišta, uočljive promjene na stijenci crijeva). Uspješnost uspostave kolitisa utvrđivana je i mikroskopskom analizom, odnosno patohistološkom i histomorfometrijskom analizom (opisano dalje u tekstu).

3.2.3. Dobivanje mišjeg seruma

Periferna krv pokusnih životinja svih ispitivanih skupina oba soja miševa uzeta je prilikom žrtvovanja pokusnih životinja punkcijom orbitalnog sinusa pomoću

heparinizirane *Pasteurove* pipete. Uzorci dobivene krvi odstajali su u epruvetama 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su centrifugirani na 3000 okretaja kroz 10 minuta. Dobiveni serum oprezno je izdvojen u epruvete te pohranjen na -80°C za daljnje postupke analize.

3.2.4. Uzorkovanje organa pokusnih životinja

Prilikom žrtvovanja pokusnih životinja i otvaranja trbušne šupljine te kostiju lubanje, svakoj je pojedinoj životinji izdvojena jetra, slezena i mozak te su njihove mase izmjerene analitičkom laboratorijskom vagom, nakon čega su organi zamrznuti u tekućem dušiku te pohranjeni na -80°C do daljnjih analiza, ukoliko nisu odmah bili podvrgnuti daljnjim analitičkim postupcima. Nadalje, izdvojen je i analiziran cjelokupni gastrointestinalni trakt a s posebnom je pozornošću analizirano debelo crijevo. Istraživanja su provedena na sistemske i lokalnoj razini.

3.2.5. Makroskopske promjene

Makroskopske promjene gastrointestinalnog trakta vidljive tijekom žrtvovanja pokusnih životinja zabilježene su za svaku pojedinu životinju. Osobito se pratila prisutnost makroskopski vidljivih upalnih žarišta u crijevu te prisutnost ulceracija i krvarenja. Procijenilo se područje zahvaćeno upalom, zabilježila eventualna prisutnost upale u okolnom tkivu, prisutnost nekrotičnog tkiva te ostale makroskopski vidljive promjene. Kod skupina u fazi oporavka, promatrala se prisutnost ožiljkastih promjena. Isto tako, izmjerena je dužina svakog pojedinog uzorka debelog crijeva, od područja ileocekalne regije do anusa.

Dio debelog crijeva u području rektuma izdvojen je za histološke analize, sadržaj mu je oprezno ispražnjen a crijevo je kirurškim skalpelom narezano u tri do pet manjih

dijelova. Dijelovi debelog crijeva posloženi su u plastične spremnike za histološke analize i uronjeni u 4%-tni paraformaldehid, nakon čega je uslijedio postupak pripreme preparata za histološke analize. Drugi je dio debelog crijeva izvagan pomoću analitičke vage, zamrznut u tekućem dušiku te pohranjen na -80°C do daljnjih analitičkih postupaka ekstrakcije proteina. Uzorak debelog crijeva koji je izdvojen za izolaciju sluznice podvrgnut je daljnjim analitičkim postupcima neposredno nakon žrtvovanja laboratorijskih životinja.

3.2.6. Priprema preparata za histološke analize

3.2.6.1. Silanizacija predmetnih mikroskopskih stakalaca

Predmetna mikroskopska stakalca silanizirana su pomoću otopine 2%-tnog Silana u acetonu u cilju poboljšanja adhezije tkivnih preparata. Cilj silanizacije je postizanje pozitivnog naboja površine predmetnih mikroskopskih stakalaca koji zbog toga jače privlače negativne naboje poput karboksilne skupine proteina. Zbog toga je adhezija tkivnih rezova na predmetnim mikroskopskim stakalcima bolja a tijekom histoloških postupaka ne dolazi do odvajanja preparata od predmetnih stakalaca.

Postupak silanizacije mikroskopskih predmetnih stakalaca proveden je prema sljedećem protokolu: stakalca su uranjana su u kloroform kroz 10 minuta, zatim je uslijedilo uranjanje u izopropilni alkohol također kroz 10 minuta. Nakon toga stakalca su uranjana 10 minuta u otopinu 2%-tnog silana u acetonu (otopina 5 mL 3-aminopropiltrietoksi-silana u 250 mL acetona). Uslijedilo je uranjanje stakalaca u aceton kroz 10 minuta a postupak je ponovljen dvaput. Nakon toga, stakalca su uranjana u destiliranu vodu kroz 10 minuta a postupak je ponavljan triput. Predmetna mikroskopska stakalca sušena su preko noći na temperaturi od 37 do 45°C te pohranjena do upotrebe na sobnoj temperaturi.

3.2.6.2. Priprema parafinskih preparata uzoraka tkiva

Prilikom žrtvovanja pokusnih životinja pojedinih skupina izdvojeni su uzorci tkiva debelog crijeva za histološka istraživanja te fiksirani tijekom 24 sata u 4%-tnom paraformaldehidu. Uslijedila je dehidracija (ukljanjanje vode iz tkiva) kroz rastuće koncentracije alkohola (70%, 80%, 96% te 100%). Nakon postupka dehidracije etanolom uslijedilo je prosvjetljivanje ksilolom te naposljetku uklapanje u parafin postupkom uranjanja tkiva u parafin temperature od +50 do +60°C. Pri navedenoj temperaturi parafin se nalazi u tekućem stanju a postupkom tri izmjene parafina ksilol koji se nalazi u tkivu postupno se zamjenjuje parafinom. Konačni kruti parafinski blokovi dobiveni su hlađenjem na +4°C. Parafinski blokovi tkiva prije postupka rezanja mikrotomom zaleđeni su na -20°C a zatim serijski narezani na rezove debljine 2 µm. Tkivni rezovi adherirani su na prethodno silanizirana predmetna stakalca, korištenjem najprije hladne vode gdje su pojedini rezovi odvojeni, te nakon toga uranjanjem u destiliranu vodu pri temperaturi od +40°C što je omogućilo izravnavanje parafinskih rezova i doprinijelo njihovoj boljoj adheziji na predmetna stakalca (203).

3.2.6.3. Hematoksilin-eozin bojanje preparata tkiva

Dobiveni parafinski blokovi tkiva narezani su u histološke preparate debljine 2 µm pomoću mikrotom instrumenta Laica. Učinjeno je prosječno 50 serijskih rezova po jednom preparatu tkiva. Preparati su obojeni histološkim bojenjem hematoksilin-eozinom. Hematoksilin kisele strukture u stanici (kromatin, jezgra) boji ljubičasto-plavo dok eozin bazične strukture stanice (citoplazma) boji crveno. Bojenje hematoksilin-eozinom učinjeno je prema sljedećem protokolu: predmetna stakalca s adheriranim tkivom deparafinizirana su uranjanjem preparata u otopinu ksilola kroz 5 minuta. Postupak je ponovljen triput s novom otopinom ksilola. Zatim su preparati uranjeni u

otopine alkohola padajuće koncentracije (100% - dvaput, 90%, 70% i 50%-tni alkohol), kroz 4 minute. Na taj je način u tkivo vraćena voda odnosno tkivo je rehidrirano. Uslijedilo je ispiranje u destiliranoj vodi kroz 4 minute, a nakon toga bojenje hematoksilinom inkubacijom preparata u otopini hematoksilina kroz 4 minute. Nakon prvog bojenja preparati su ispirani pod mlazom tekuće vode kroz 15 minuta te diferencirani u otopini HCl-etanola (100 mL 70%-nog etanola i 0,5 mL HCl) kroz 2 sekunde, nakon čega su ponovno ispirani pod mlazom tekuće vode kroz 10 minuta te uranjeni u čistu destiliranu vodu kroz 3 minute. Uslijedilo je bojenje eozinom, inkubacijom predmetnih stakalaca s adheriranim tkivom u otopini eozina kroz 3 minute, nakon čega su preparati uranjeni 3 puta po 5 minuta u čistu destiliranu vodu. Nakon toga su obojeni tkivni rezovi dehidrirani kroz otopine etanola rastućih koncentracija (70%, 2 puta po 96% te dva puta po 100%) kroz 30 sekundi a nakon čega su uranjeni u ksilol 3 puta po 5 minuta. Potom su predmetna stakalca s obojenim histološkim rezovima tkiva osušena na sobnoj temperaturi te montirana entelanom. Histološki preparati pripremljeni na opisan način sušeni su na sobnoj temperaturi kroz najmanje 24 sata čime su postignuti trajni preparati, spremni za analizu mikroskopom.

Hematoksilin-eozin bojanje histoloških preparata korišteno je kako bi se uvidjele patohistološke promjene u debelom crijevu ispitivanih životinja, te za histomorfometrijsku analizu preparata debelog crijeva. Histološki su preparati analizirani uporabom Olympus B201 mikroskopa.

3.2.7. Određivanje stupnja oštećenja sluznice crijeva

Mikroskopski indeks oštećenja (MIO) određivan je na parafinskim rezovima debelog crijeva debljine 2 μ m (50 serijskih rezova po svakom uzorku), obojanih hematoksilin-eozinom. Stupanj oštećenja sluznice crijeva utvrđen je prema uvriježenim

kriterijima. Patohistološko oštećenje označeno kao MIO određen je koristeći sljedeće parametre: I) infiltrati upalnih stanica: a) normalna lamina proprija - 0 bodova; b) pojedinačne upalne stanice u lamini propriji - 1 bod; c) nakupine upalnih stanica koje prodiru i u podsluznicu - 2 boda; d) transmuralni infiltrati upalnih stanica stijenke crijeva - 3 boda. II) oštećenje tkiva: a) normalna sluznica - 0 bodova; b) ograničeno oštećenje epitela - 1 bod; c) žarišna ulceracija mukoze - 2 boda; d) žarišna transmuralna ulceracija - 3 boda. Kombinacijom navedenih parametra za svaku pojedinu životinju te statističkom obradom pojedinih skupina dobiven je indeks mikroskopskog oštećenja za sve promatrane dane pokusa. Histološka procjena oštećenja napravljena je nakon analize preparata svjetlosnim mikroskopom metodom „dvostruko slijepe probe“.

3.2.8. Histomorfometrijska analiza

Uzorci kolona ispitivanih skupina životinja analizirani su histomorfometrijski na parafinskim rezovima obojanih hematoksilin-eozinom. Odredio se broj Lieberkunovih kripti na milimetar dužine debelog crijeva te širina i dubina kripti. Određivana je ukupna debljina te debljina pojedinih slojeva stijenki kolona.

Mjerenja su provedena pomoću kompjuterskog sustava za kvantitativnu obradu mikroskopske slike koji se sastoji od svjetlosnog Olympus BX40 mikroskopa (Olympus, Tokio, Japan) te Pulnix digitalne kamere (TMC 76S, Tokio, Japan). Analiza digitalnih fotografija histoloških preparata pri različitim povećanjima učinjena je pomoću kompjuterskog programa Issa (VAMS, Zagreb, Hrvatska). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija za pojedinu skupinu životinja.

3.2.9. Izolacija proteina iz uzoraka tkiva pokusnih životinja

3.2.9.1. Izolacija proteina mozga i debelog crijeva u octenoj kiselini

Proteini su izolirani iz uzoraka tkiva mozga i debelog crijeva dobivenih prilikom žrtvovanja pokusnih životinja iz pojedinih ispitivanih skupina prema modificiranoj metodi El Karima *i sur.* (204). Uzorci tkiva mozga i debelog crijeva približne težine 375 mg oprezno su usitnjeni pomoću kirurškog skalpela te su homogenizirani ručno, na ledu, u osam puta većem volumenu 0,5 M octene kiseline (CH_3COOH) s dodatkom komercijalno dostupnih inhibitora fosfataza i proteaza. Homogenati su zatim inkubirani u vodenoj kupelji kroz 10 minuta na temperaturi od $+95^\circ\text{C}$. Uslijedilo je centrifugiranje homogenata na 14 000 okretaja u minuti kroz 20 minuta na temperaturi od $+4^\circ\text{C}$. Pojedini dobiveni supernatanti oprezno su izdvojeni u prethodno ohlađene epruvete.

U dobivenim je uzorcima odmah nakon izdvajanja izmjerena koncentracija ukupnih proteina prema metodi Bradforda *i sur.* (205) opisanoj u poglavlju 3.2.11. Ostatak uzoraka zamrznut je u tekućem dušiku te pohranjen na -80°C do daljnjih analitičkih određivanja sadržaja neuropeptida NPY-a i VIP-a te interleukina IL-6 u dobivenim uzorcima, specifičnim imunoenzimskim testovima (ELISA metodom).

3.2.9.2. Izolacija proteina mozga i debelog crijeva u TRIS-HCl puferu

Uzorci mozga i debelog crijeva približne mase 100 mg dobiveni prilikom žrtvovanja pokusnih životinja iz pojedinih skupina oprezno su usitnjeni pomoću kirurškog skalpela te ručno homogenizirani na ledu u 400 μL TRIS-HCl pufera ($\text{pH}=8,0$). Potom su homogenati centrifugirani u vremenu od 20 minuta na 14 000 okretaja u minuti na temperaturi od $+4^\circ\text{C}$. Svaki je dobiveni supernatant oprezno izdvojen od taloga i prenesen u epruvete. Koncentracija ukupnih proteina u dobivenim supernatantima izmjerena je prema metodi Bradforda *i sur.* (205) opisanoj u poglavlju 3.2.11. Dobiveni

uzorci proteina u TRIS-HCl puferu alikvotirani su, zamrznuti u tekućem dušiku te pohranjeni na -80°C do daljnjih analitičkih postupaka i korišteni za određivanje sadržaja IL-10 u uzorcima tkiva imunoenzimskim testom (ELISA metodom) te za određivanje aktivnosti DPP IV/CD26 u uzorcima C57BL/6 životinja odnosno za određivanje aktivnosti DPP IV/CD26-sličnih enzima u uzorcima CD26 deficijentnih životinja.

3.2.9.3. Izolacija proteina iz uzoraka tkiva za analizu tehnikom *Western blot*

Uzorci tkiva mišjeg mozga i debelog crijeva dobiveni prilikom žrtvovanja pokusnih životinja iz pojedinih skupina oprezno su usitnjeni pomoću kirurškog skalpela te ručno homogenizirani na ledu korištenjem komercijalno dostupnog pufera za izolaciju proteina tkiva - RIPA (od engl. *Radioimmunoprecipitation buffer*) u kombinaciji s inhibitorima proteaza i fosfataza.

Otopina RIPA-e sadrži 1% nonidet P-40, 0,5% natrijevog-deoksikolata, 0,1% SDS-a te 0,004% natrijevog azida otopljenih u jednostruko koncentriranoj trisom puferiranoj fiziološkoj otopini, u konačnom volumenu od 50 mL. Otopina za izolaciju proteina priprema se svježa, neposredno prije homogenizacije uzoraka tkiva na način da se na 1 mL otopine RIPA-e dodaje po 10 µL otopine svakog inhibitora (fenil-metil-sulfonilfluorid u dimetil-sulfoksidu - PMSF u DMSO, natrijev-ortovanadat te koktel inhibitora proteaza). Prema priloženim uputstvima proizvođača korišteno je 3 mL pripremljene otopine RIPA-e s dodatkom navedenih inhibitora na 1 g tkiva, odnosno korišteni su proporcionalni omjeri.

Nakon ručne homogenizacije uzoraka na ledu, uslijedilo je centrifugiranje uzoraka 20 minuta na 14 000 okretaja u minuti na temperaturi od +4°C. Pojedini dobiveni supernatanti oprezno su izdvojeni u prethodno ohlađene epruvete. Koncentracija ukupnih proteina u izdvojenim supernatantima izmjerena je prema metodi

Bradforda *i sur.* (205) opisanoj u poglavlju 3.2.11. Ostatak dobivenih uzoraka zamrznut je u tekućem dušiku te pohranjen na -80°C do daljnjih metoda elektroforetskog razdvajanja proteina te određivanja proteinskog izražaja NPY-a, VIP-a, molekule CD26 te β -aktina u tkivima životinja pojedinih pokusnih skupina, *Western blot* tehnikom.

3.2.10. Izolacija sluznice debelog crijeva

Izdvojenom uzorku tkiva debelog crijeva pojedine žrtvovane laboratorijske životinje izmjerena je dužina, uzorak je izvagan a nakon toga debelo crijevo je otvoreno uzdužnom incizijom. Cijeli je postupak provođen na ledu. Sluznica debelog crijeva izolirana je pomoću kirurškog skalpela, nakon čega je homogenizirana u volumenu od 2 mL 0,3 M otopine manitola, prema protokolu Ahnen *i sur.* (206). Dobiveni je homogenat nakon toga centrifugiran na 50 000 okretaja u minuti u vremenu od 20 minuta na temperaturi od $+4^{\circ}\text{C}$ korištenjem Beckman ultracentrifuge. Dobiveni talog stanica resuspendiran je s destiliranom vodom u omjeru 1:6 te ponovno homogeniziran. Homogenatu je nadalje dodano 0,0011 g usitnjenog CaCl_2 te je uzorak inkubiran uz povremeno miješanje kroz 20 minuta na temperaturi od $+4^{\circ}\text{C}$. Uzorak je zatim centrifugiran na 3 000 okretaja u minuti u vremenu od 15 minuta na temperaturi od $+4^{\circ}\text{C}$ kako bi se istaložile čestice CaCl_2 i veće čestice. Dobiveni supernatant se potom centrifugirao na 27 000 okretaja u minuti kroz 30 minuta na temperaturi od $+4^{\circ}\text{C}$ korištenjem Beckman ultracentrifuge. Dobiveni talog stanica resuspendiran je u 0,4 mL Tris-HCl pufera ($\text{pH}=8,0$), uzorci su alikvotirani, izmjerena je koncentracija izoliranih proteina prema metodi Bradforda *i sur.* (205) te su alikvoti dobivenih uzoraka pohranjeni na -80°C do daljnjih analitičkih postupaka koji obuhvaćaju određivanje aktivnosti intestinalne DPP IV/CD26 u C57BL/6 miševa kao i aktivnosti DPP IV/CD26-sličnih enzima u CD26 deficijentnih miševa.

3.2.11. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Koncentracija ukupnih proteina u dobivenim uzorcima homogenata mozga i debelog crijeva određivana je prema metodi Bradforda *i sur.* (205). Za analize je korišten komercijalno dostupan koncentrirani reagens proizvođača Bio-Rad. Ishodni koncentrirani reagens razrijeđen je s ultra čistom vodom u omjeru 1:4, odnosno u 200 μL koncentriranog reagensa dodano je 800 μL ultra čiste vode. Za analize je u 1 mL Bradfordovog reagensa pripremljenog na prethodno opisani način dodano 0,002 mL homogenata. Slijepu probu sačinjavao je 1 mL pripremljenog Bradfordovog reagensa te 0,002 mL ultra čiste vode. Nakon inkubacije u trajanju od 10 minuta, spektrofotometrijski je izmjeren intenzitet plavog obojenja mjerenjem apsorbancije svjetlosti UV/VIS spektrofotometrom pri valnoj duljini $\lambda=595\text{ nm}$ prema slijepoj probi.

Koncentracije ukupnih proteina u ispitivanim uzorcima izračunate su pomoću prethodno učinjene baždarne krivulje koja je izrađena korištenjem različitih razrjeđenja standarda proteina, poznatih koncentracija. Linearna ovisnost ($r^2=0,9867$) apsorbancije svjetlosti pri valnoj duljini $\lambda=595\text{ nm}$ te koncentracije proteina korištena je pri izračunavanju koncentracije ukupnih proteina u pojedinom ispitivanom uzorku, prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{Koncentracija ukupnih proteina} = (\text{Apsorbancija pri } \lambda=595/0,0567) * 0,5$$

Koncentracija ukupnih proteina u ispitivanim uzorcima izražena je u mikrogramima po mikrolitru uzorka ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

3.2.12. Određivanje enzimске aktivnosti DPP IV/CD26 i DPP IV/CD26-sličnih enzima

Enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u serumu, mozgu te homogenatu sluznice debelog crijeva u C57BL/6 životinja te enzimska aktivnost DPP IV/CD26-sličnih enzima u istovjetnim uzorcima CD26 deficijentnih miševa određivana je u svim ispitivanim skupinama prema metodi Kreisela *i sur.* (207). Enzimске aktivnosti određivane su korištenjem UV/VIS spektrofotometra, mjerenjem apsorpcije svjetlosti pri valnoj duljini od 405 nm, prema slijepoj probi svakog pojedinog uzorka zasebno, u kivetama duljine 1 cm.

Analitička metoda temelji se na hidrolizi kromogenog glicin-prolin-p-nitroanilida (Gly-Pro-p-NA) kao supstrata za enzimsko djelovanje DPP IV/CD26. Ukupno 2×10^{-3} M supstrata Gly-Pro-p-NA te 20 μ L ispitivanog uzorka (seruma, odnosno homogenata tkiva poznate koncentracije proteina) inkubirano je u reakcijskoj smjesi u 170 μ L 0,1 M Tris-HCl pufera (pH=8,0). Nakon 30 minuta inkubacije na temperaturi od +37°C, reakcija je zaustavljena dodatkom 800 μ L 1M acetatnog pufera (pH=4,5), koji promjenom pH reakcijske smjese inaktivira aktivnost enzima. Intenzitet razvijene žute boje koja potječe od razgrađenog kromogenog supstrata određivan je prema slijepoj probi svakog pojedinog uzorka. Slijepa proba sadržava iste reagense i pufere poput ispitivane probe, a razlikuje se po tome što se ispitivani uzorak dodaje nakon dodatka 800 μ L 1M acetatnog pufera (pH=4,5) kada je inaktivirana mogućnost katalitičkog djelovanja enzima.

Spektrofotometrijsko određivanje enzimске aktivnosti DPP IV/CD26 odnosno DPP IV/CD26-sličnih enzima provodi se postupkom navedenim u tablici 5.

Tablica 5. Postupak određivanja enzimске aktivnosti DPP IV/CD26
i DPP IV/CD26-sličnih enzima

	SLIJEPA PROBA (mL)	PROBA (mL)
Supstrat (Gly-Pro-p-NA)	0,01	0,01
Tris-HCl pufer (pH=8,0)	0,17	0,17
Uzorak (serum/homogenat tkiva)	-	0,02
<i>Inkubacija uzoraka 30 minuta na 37°C</i>		
Acetatni pufer (pH=4,5)	0,80	0,80
Serum/homogenat tkiva	0,02	-

3.2.12.1. Izračun enzimске aktivnosti

Aktivnost DPP IV/CD26 odnosno DPP IV/CD26-sličnih enzima računa se prema sljedećoj jednadžbi:

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

Legenda:

A_p = apsorbancija probe

V_{uk} = ukupni volumen reakcijske smjese

V_{uz} = volumen uzorka

d = debljina kivete (1 cm)

t = vrijeme inkubacije u minutama (30 min)

ε = molarni ekstincijski koeficijent (za p-nitroanilid pri 405 nm
iznosi $9,9 \cdot 10^3$ mol)

10^6 = faktor pretvorbe mola u μ mol

Enzimska aktivnost serumske DPP IV/CD26 u C57BL/6 životinja izražena je u internacionalnim jedinicama po 1 L odnosno 1 dm^3 seruma (IU/L odnosno IU/ dm^3), što odgovara hidrolizi 1 μ mola supstrata u minuti po 1L odnosno 1 dm^3 seruma. Enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u debelom crijevu i mozgu C57BL/6 životinja izražena je u nanokatalima po miligramu proteina u uzorku homogenata sluznice debelog crijeva odnosno mozga (nkat/mg proteina).

Enzimске aktivnosti DPP IV/CD26-sličnih enzima u uzorcima seruma odnosno homogenata tkiva CD26 deficijentnih miševa izražene su u istovjetnim jedinicama kao i u C57BL/6 životinja.

3.2.13. Imunoenzimski testovi (ELISA)

Koncentracije neuropeptida NPY i VIP, kao i interleukina (IL-6 i IL-10) u serumu i uzorcima ekstrakata tkiva mozga i debelog crijeva pokusnih životinja određivani su imunoenzimskim testovima (ELISA metodom) na čitaču mikrotitarskih pločica (*Bio-tek EL808, Bio-tek instruments INC*). Određivanja su provedena korištenjem specifičnih imunoenzimskih testova za pojedini ispitivani parametar slijedeći uputstva proizvođača.

3.2.13.1. Specifični imunoenzimski test za utvrđivanje koncentracije

neuropeptida Y

Za utvrđivanje koncentracije NPY-a u ispitivanim uzorcima mišjeg seruma odnosno proteinskih ekstrakata mozga i debelog crijeva korišten je specifični imunoenzimski set proizvođača *Phoenix Pharmaceuticals, Inc*, kataloški broj EK-049-03.

Prethodno provedenim pilot pokusima utvrđeno je da je za optimalnu izvedbu određivanja koncentracije NPY-a u uzorcima tkiva mozga i debelog crijeva iste potrebno pripremati prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.9.1.

3.2.13.1.1. Načelo djelovanja

Načelo djelovanja ovog testa temelji se na principu kompetitivnog enzimskog imuno-eseja. U tu su svrhu jažice na priloženoj mikrotitrskoj pločici obložene sekundarnim protutijelom, a nespecifična vezna mjesta već su prethodno blokirana. Sekundarno protutijelo vezuje se na *Fc* fragment primarnog peptidnog protutijela čiji se *Fab* fragment kompetitivno vezuje na biotinizirani peptid, odnosno peptidni standard ili ciljni peptid u uzorcima. Biotinizirani peptid međudjeluje s kompleksom streptavidin-peroksidaza hrena (SA-HRP), koji katalizira razgradnju kromogenog supstrata. Intenzitet nastale žute boje izravno je proporcionalan količini biotiniziranog peptida-SA-HRP kompleksa ali obrnuto proporcionalan s količinom određivanog peptida u standardima odnosno pojedinim ispitivanim uzorcima. Razlog tome je kompetitivno vezivanje biotiniziranog peptida sa standardima ciljnog peptida ili uzoraka s primarnim peptidnim protutijelom. Dobivene vrijednosti apsorbancije svjetlosti standarda poznatih koncentracija služe za izradu standardne krivulje. Nepoznate koncentracije traženog peptida u ispitivanim uzorcima određuju se iz jednadžbe standardne krivulje i izražavaju u ng/mL.

3.2.13.1.2. Sadržaj kompleta imunoenzimskog testa

U kompletu imunoenzimskog testa za određivanje koncentracije NPY-a u ispitivanim uzorcima nalaze se sljedeći reagensi:

1. Dvadeseterostruko koncentrirani esejski pufer (50 mL),
kataloški broj EK-BUF;
2. Mikrotitarska pločica s 12 zasebno odvajajućih nizova i ukupno 96 jažica,
kataloški broj EK-PLATE;
3. Adhezivne folije (3 komada), kataloški broj EK-APS;
4. Liofilizirano primarno protutijelo (zečji protu-peptid IgG) (1 epruveta);
5. Liofilizirani standardni peptid;
6. Liofilizirani biotinizirani peptid;
7. Streptavidin-*horseradish* peroksidaza (SA-HRP) (30 µL)
kataloški broj EK-SA-HRP;
8. Liofilizirana pozitivna kontrola;
9. Otopina supstrata (12 mL), kataloški broj EK-SS;
10. Kloridna kiselina, 2N HCl (15 mL), kataloški broj EK-HCl.

3.2.13.1.3. Analitički postupci imunoenzimskog testa

Komplet za imunoenzimsko određivanje koncentracije NPY-a u uzorcima pohranjuje se na +4°C a neposredno prije korištenja svi se sastojci moraju zagrijati na sobnoj temperaturi. Najprije je potrebno razrijediti esejski pufer koji je dvadeseterostruko koncentrirani na jednostruku koncentraciju, na način da se 50 mL priloženog pufera razrijedi u 950 mL ultra čiste vode. Eventualna prisutnost kristalizirane tvari otapa se grijanjem eseja u vodenoj kupelji na 37°C. Dobiveni jednostruko koncentrirani pufer

koristi se za razrjeđivanje svih ostalih liofiliziranih komponenti imunoenzimskog testa te za postupke ispiranja jažica mikrotitarske pločice.

Nadalje, priloženi standard peptida oprezno se otapa u 1,0 mL esejskog pufera. Koncentracija dobivene matične otopine iznosi 1000 ng/mL. Primarno protutijelo te biotinizirani peptid rehidriraju se s 5 mL esejskog pufera a pozitivna kontrola u 200 µL esejskog pufera te potom oprezno homogeniziraju.

Slijepu probu predstavlja jažica u koju nije dodan uzorak kao ni primarno protutijelo niti biotinizirani peptid ali prolazi kroz iste postupke i dodaju se svi ostali reagensi kao i u ostale jažice sa standardima, uzorcima ili pozitivnim kontrolama.

Peptidni standardi NPY-a pripremljeni su u koncentracijama 0,01 ng/mL, 0,1 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL te 100 ng/mL razrjeđivanjem primarnog standarda koncentracije 1000 ng/mL s odgovarajućim volumenom esejskog pufera. Peptidni standardi nanose se u duplikatu u odgovarajuće jažice te se pomoću njih izrađuje standardna krivulja za određivanje nepoznate koncentracije traženog peptida u uzorcima seruma odnosno homogenata istraživanih tkiva. Kao interna kontrola koristi se priložena pozitivna kontrola traženog peptida poznate koncentracije.

Uzorci peptidnih standarda odnosno ispitivanih uzoraka nanose se u odgovarajuće jažice u volumenu od 50 µL. Potom se u svaku jažicu (osim slijepe probe) dodaje po 25 µL primarnog protutijela i po 25 µL biotiniziranog peptida. Jažice se zatim prekriju adhezivnom folijom te se mikrotitarska pločica položi na tresilicu uz 350 okretaja u minuti i inkubira dva sata na sobnoj temperaturi. Neposredno prije isteka vremena inkubacije priprema se otopina SA-HRP na način da se 12 µL koncentriranog SA-HRP otapa u 12 mL esejskog pufera. Nakon isteka vremena inkubacije sadržaj jažica se isprazni te se svaka jažica ispere četiri puta s 350 µL esejskog pufera. Postupak se

provodi pomoću multikanalne pipete, a nakon svakog ispiranja pločicu je potrebno dobro posušiti na celuloznoj vati.

Nakon postupaka ispiranja, u svaku se jažicu dodaje po 100 µL otopine SA-HRP, jažice se prekriju adhezivnom folijom te inkubiraju kroz jedan sat na sobnoj temperaturi na tresilici uz 350 okretaja u minuti. Nakon isteka vremena inkubacije, ponovno se isprazni sadržaj svih jažica te slijedi ponovni postupak ispiranja kao što je prethodno opisano. Potom se dodaje po 100 µL supstrata u svaku jažicu, jažice se prekriju adhezivnom folijom te inkubiraju kroz jedan sat na sobnoj temperaturi uz 350 okretaja u minuti na tresilici. Osobito je važno da se reakcija odvija u mraku te je stoga potrebno mikrotitarsku pločicu s reagensima zaštititi od svjetlosti. Nakon isteka vremena inkubacije razvija se plava boja različitog intenziteta. Reakcija katalitičke razgradnje supstrata zaustavlja se dodatkom 100 µL 2 M HCl u svaku jažicu pri čemu dolazi do promjene plave boje u žutu. Intenzitet nastalog žutog obojenja mjeri se u roku od 20 minuta prema slijepoj probi na čitaču mikrotitarskih pločica na valnoj duljini od 450 nm.

3.2.13.2. Specifični imunoenzimski test za utvrđivanje koncentracije

vazoaktivnog intestinalnog peptida

Za utvrđivanje koncentracije VIP-a u ispitivanim uzorcima mišjeg seruma odnosno proteinskih ekstrakata mozga i debelog crijeva korišten je specifični imunoenzimski set proizvođača *Phoenix Pharmaceuticals, Inc.*, kataloški broj EK-064-16.

Prethodno provedenim pilot pokusima utvrđeno je da je za optimalnu izvedbu određivanja koncentracije VIP-a u uzorcima tkiva mišjeg mozga i debelog crijeva iste potrebno pripremati prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.9.1.

Načelo djelovanja kao i priprema reagenasa, analitički postupci i vremena inkubacije identični su prethodno opisanom imunoenzimskom testu za dokazivanje koncentracije NPY-a u ispitivanim uzorcima. Sadržaj kompleta za imunoenzimsko određivanje koncentracije VIP-a u ispitivanim uzorcima jednak je sadržaju kompleta za određivanje koncentracije NPY-a (navedeno u prethodnom poglavlju), a imunoenzimski testovi razlikuju se u specifičnim protutijelima, standardima i koncentracijama standarda koje se nanose na mikrotitarsku pločicu.

U cilju dobivanja odgovarajuće standardne krivulje, prema priloženim uputstvima proizvođača, priloženi standard peptida VIP oprezno se otapa u 1,0 mL esejskog pufera. Koncentracija dobivene matične otopine iznosi 1000 ng/mL. Peptidni standardi VIP-a pripremljeni su u koncentracijama 0,04 ng/mL, 0,2 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL te 25 ng/mL, i to razrjeđivanjem primarnog standarda koncentracije 1000 ng/mL s odgovarajućim volumenom esejskog pufera. Peptidni standardi nanose se u duplikatu u odgovarajuće jažice na mikrotitarskoj pločici te se pomoću njih izrađuje standardna krivulja za određivanje nepoznate koncentracije traženog peptida u uzorcima seruma odnosno homogenata istraživanih tkiva.

Intenzitet nastalog žutog obojenja također se mjeri u roku od 20 minuta, kao što je opisano u prethodnom poglavlju, prema slijepoj probi, na čitaču mikrotitarskih pločica na valnoj duljini od 450 nm.

3.2.13.3. Specifični imunoenzimski test za utvrđivanje koncentracije interleukina-6

Za utvrđivanje koncentracije interleukina-6 (IL-6) u ispitivanim uzorcima mišjeg seruma odnosno tkivnih ekstrakata mozga i debelog crijeva korišten je specifični imunoenzimski set proizvođača *R&D Systems, Quantikine Mouse IL-6*, kataloški broj M6000B.

Prethodno provedenim pilot pokusima utvrđeno je da za optimalnu izvedbu određivanja koncentracije IL-6 u uzorcima tkiva mišjeg mozga i debelog crijeva iste je potrebno pripremati prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.9.1.

3.2.13.3.1. Načelo djelovanja

Načelo djelovanja ovog testa, za razliku od imunoenzimskih testova za određivanje koncentracije NPY-a i VIP-a, temelji se na principu kvantitativne tzv. sendvič imuno-esej tehnike. U tu svrhu jažice na mikrotitarskoj pločici obložene su specifičnim monoklonskim protu-mišjim IL-6 protutijelom. Standardi, pozitivne kontrole i uzorci nanose se u pojedine jažice te se IL-6 prisutan u uzorcima veže za promarna protutijela. Nakon postupka ispiranja nevezanih supstanci, u pojedinu jažicu dodaje se specifično sekundarno poliklonsko protutijelo (na kojemu se nalazi vezani enzim) za mišji IL-6. Nakon ponovnog postupka ispiranja i dodatka supstrata, dolazi do enzimske razgradnje što dovodi do nastanka plavog obojenja koje se nakon dodatka otopine za zaustavljanje enzimske reakcije mijenja u žuto. Intenzitet nastalog žutog obojenja izravno je proporcionalan količini IL-6 u ispitivanim uzorcima. Dobivene vrijednosti apsorbancije svijetlosti standarda poznatih koncentracija služe za izradu standardne krivulje. Nepoznate koncentracije traženog interleukina u ispitivanim uzorcima određuju se iz jednadžbe standardne krivulje i izražavaju u pg/mL.

3.2.13.3.2. Sadržaj kompleta imunoenzimskog testa

U kompletu imunoenzimskog testa za određivanje koncentracije IL-6 u ispitivanim uzorcima nalaze se sljedeći reagensi:

-
1. Mikrotitrarske pločice s 12 zasebno odvajajućih nizova i ukupno 96 jažica prethodno obloženih monoklonskim protutijelom specifičnim za mišji IL-6, 2 komada, kataloški broj MB6000 892369;
 2. Mišji IL-6 konjugat (23 mL), poliklonsko protutijelo protiv mišjeg IL-6 s konjugiranim enzimom peroksidazom hrena (*horseradish peroxidase*, HRP) kataloški broj MB6000 892665;
 3. Liofilizirani mišji rekombinantni standard IL-6 (2,5 ng), kataloški broj MB6000 892371;
 4. Liofilizirana mišja rekombinantna kontrola IL-6, kataloški broj MB6000 892372;
 5. Otopina za razrjeđivanje RD1-14 (engl. *Assay Diluent*) (12,5 mL), kataloški broj MB6000 895180;
 6. Otopina za kalibraciju RD5T (engl. *Calibrator Dlluent*) (21 mL), kataloški broj MB6000 895175;
 7. Dvadesetpeterostruko koncentrirani pufer za ispiranje (50 mL), kataloški broj MB6000 895024;
 8. Kromogeni reagens A (12,5 mL stabiliziranog vodikovog peroksida), kataloški broj MB6000 895000;
 9. Kromogeni reagens B (12,5 mL stabiliziranog tetrametilbenzidina), kataloški broj MB6000 895001;
 10. Otopina za zaustavljanje enzimske reakcije (23 mL razrijeđene kloridne kiseline), kataloški broj MB6000 895174;
 11. Adhezivne folije, 8 komada.

3.2.13.3.3. Analitički postupci imunoenzimskog testa

Komplet za imunoenzimsko određivanje koncentracije IL-6 u uzorcima pohranjuje se na +4°C a neposredno prije korištenja svi se sastojci moraju stabilizirati na sobnoj temperaturi. Prvotno je potrebno razrijediti pufer za ispiranje koji je dvadesetpeterostruko koncentriran na jednostruku koncentraciju, na način da se 25 mL priloženog pufera razrijedi u 600 mL ultra čiste vode. Eventualna prisutnost kristalizirane tvari otapa se grijanjem eseja u vodenoj kupelji na 37°C. Dobiveni jednostruko koncentrirani pufer koristi se za postupke ispiranja jažica mikrotitarske pločice.

Nadalje, priloženi standard mišjeg IL-6 oprezno se otapa u 5,0 mL otopine za kalibraciju RD5T te potom lagano homogenizira. Koncentracija dobivene matične otopine iznosi 500 pg/mL, predstavlja mišji standard IL-6 najveće koncentracije i koristi se za dobivanje različitih razrjeđenja standarda mišjeg IL-6. Razrjeđenja standarda mišjeg IL-6 pripremljena su u koncentracijama 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,2 pg/mL, 15,6 pg/mL te 7,8 pg/mL pomoću otopine za kalibraciju RD5T. Čista ishodna otopina za kalibraciju RD5T služi i kao standard nulte koncentracije (0 ng/mL), odnosno slijepa proba.

Pripremljeni standardi mišjeg IL-6 nanose se u duplikatu u odgovarajuće jažice na mikrotitarskoj pločici te se pomoću njih izrađuje standardna krivulja za određivanje nepoznate koncentracije traženog interleukina u uzorcima seruma odnosno homogenata istraživanih tkiva. Kao interna kontrola koristi se priložena pozitivna kontrola traženog interleukina poznate koncentracije.

Analitički postupak imunoenzimskog testa izvodi se na način da se ponajprije u svaku pojedinu jažicu na mikrotitarskoj pločici nanese po 50 µL otopine za razrjeđivanje RD1-14 te se potom u odgovarajuće jažice dodaje po 50 µL svježe pripremljenih standarda, pozitivne kontrole ili odgovarajućeg uzorka seruma odnosno proteinskog

ekstrakta. Jažice na mikrotitarskoj pločici se zatim prekriju adhezivnom folijom te se mikrotitarska pločica položi na površinu tresilice uz 350 okretaja u minuti u vremenu inkubacije od dva sata na sobnoj temperaturi.

Nakon isteka vremena inkubacije sadržaj jažica se isprazni te se svaka jažica ispere pet puta s 400 μ L pufera za ispiranje. Postupak se provodi pomoću multikanalne pipete, a nakon svakog ispiranja mikrotitarsku pločicu treba dobro posušiti. Nakon postupaka ispiranja, u svaku se jažicu dodaje po 100 μ L otopine mišjeg IL-6 konjugata, jažice se prekriju adhezivnom folijom te ponovno inkubiraju kroz dva sata na sobnoj temperaturi na tresilici uz 350 okretaja u minuti.

Po isteka vremena inkubacije, sadržaj svih jažica ponovno se isprazni nakon čega slijedi ponovni postupak ispiranja kao što je prethodno opisano. Slijedi priprema otopine supstrata koja se priprema neposredno prije nanošenja u jažice na način da se pomiješaju jednaki volumeni kromogenog reagensa A i B. Potom se dodaje po 100 μ L svježe pripremljenog supstrata u svaku jažicu, jažice se prekriju adhezivnom folijom te inkubiraju kroz trideset minuta na sobnoj temperaturi uz 350 okretaja u minuti na tresilici. I kod ove je enzimске reakcije osobito važno da se odvija u mraku te je stoga potrebno mikrotitarsku pločicu zaštititi od svjetlosti. Nakon isteka vremena inkubacije razvija se plava boja različitog intenziteta, u ovisnosti o sadržaju mišjeg IL-6 u pojedinom ispitivanom uzorku. Reakcija katalitičke razgradnje supstrata zaustavlja se dodatkom 100 μ L otopine za zaustavljanje reakcije u svaku jažicu pri čemu dolazi do promjene plave boje u žutu. Intenzitet nastalog žutog obojenja mjeri se u roku od 20 minuta prema slijepoj probi na čitaču mikrotitarskih pločica na valnoj duljini od 450 nm.

3.2.13.4. Specifični imunoenzimski test za utvrđivanje koncentracije interleukina-10

Za utvrđivanje koncentracije interleukina-10 (IL-10) u ispitivanim uzorcima mišjeg seruma odnosno proteinskih ekstrakata mozga i debelog crijeva korišten je specifični imunoenzimski set proizvođača *R&D Systems, Quantikine Mouse IL-10*, kataloški broj M1000.

Prethodno provedenim pilot pokusima utvrđeno je da za optimalnu izvedbu određivanja koncentracije IL-10 u uzorcima tkiva mišjeg mozga i debelog crijeva iste je potrebno pripremati prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.9.2.

3.2.13.4.1. Sadržaj kompleta imunoenzimskog testa

Sadržaj kompleta imunoenzimskog testa za određivanje koncentracije IL-10 u ispitivanim uzorcima obuhvaća sljedeće reagense:

1. Mikrotitrarske pločice s 12 zasebno odvajajućih nizova i ukupno 96 jažica prethodno obloženih monoklonskim protutijelom specifičnim za mišji IL-10, 2 komada, kataloški broj M1000 890410;
2. Mišji IL-10 konjugat (23 mL), poliklonsko protutijelo protiv mišjeg IL-10 s konjugiranim enzimom peroksidazom hrena (*horseradish peroxidase*, HRP) kataloški broj M1000 890003;
3. Liofilizirani mišji rekombinantni standard IL-10 (5 ng), kataloški broj M1000 890403;
4. Liofilizirana mišja rekombinantna kontrola IL-10, kataloški broj M1000 890234;
5. Otopina za razrjeđivanje RD1-14 (engl. *Assay Diluent*) (12,5 mL), kataloški broj M1000 895180;
6. Otopina za kalibraciju RD5T (engl. *Calibrator Dlluent*) (21 mL),

-
- kataloški broj M1000 895175;
7. Dvadesetpeterostruko koncentrirani pufer za ispiranje (50 mL),
kataloški broj M1000 895024;
8. Kromogeni reagens A (12,5 mL stabiliziranog vodikovog peroksida), kataloški broj M1000 895000;
9. Kromogeni reagens B (12,5 mL stabiliziranog tetrametilbenzidina),
kataloški broj M1000 895001;
10. Otopina za zaustavljanje enzimske reakcije (23 mL razrijeđene kloridne kiseline), kataloški broj M1000 895174;
11. Adhezivne folije, 8 komada.

Načelo djelovanja kao i priprema reagenasa, analitički postupci i vremena inkubacije za izvođenje imunoenzimskog testa za određivanje koncentracije IL-10 identični su prethodno opisanom imunoenzimskom testu za dokazivanje koncentracije IL-6 u ispitivanim uzorcima, kao što je opisano u poglavlju 3.2.13.3.3.

U cilju dobivanja odgovarajuće standardne krivulje, prema priloženim uputstvima proizvođača, liofilizirani standard mišjeg IL-10 oprezno je otopljen u 5,0 mL otopine za kalibraciju RD5T te potom lagano homogeniziran. Dobivena matična otopina ima koncentraciju 1000 pg/mL, predstavlja mišji standard IL-10 najveće koncentracije i koristi se za dobivanje različitih razrjeđenja standarda mišjeg IL-10. Razrjeđenja standarda mišjeg IL-10 u ovom su radu pripremljena u koncentracijama 31,2 pg/mL, 15,6 pg/mL, 7,8 pg/mL, 3,9 pg/mL, 1,95 pg/mL te 0,975 pg/mL. Čista ishodna otopina za kalibraciju RD5T služi i kao standard nulte koncentracije (0 ng/mL), odnosno slijepa proba. Peptidni standardi nanose se u duplikatu u odgovarajuće jažice na mikrotitarskoj pločici te se

pomoću njih izrađuje standardna krivulja za određivanje nepoznate koncentracije traženog peptida u uzorcima seruma odnosno homogenata istraživanih tkiva.

Uzorci mišjeg seruma, kao i homogenata tkiva, nanošeni su u jažice mikrotitarske pločice bez razrjeđivanja, u nativnoj koncentraciji, što je utvrđeno kao optimalno prethodnim pilot-pokusom. Cjelokupni analitički postupak imunoenzimskog testa jednak je postupku opisanom u poglavlju 3.2.13.3.3.

Nakon provedenog analitičkog postupka, intenzitet nastalog žutog obojenja također se mjeri u roku od 20 minuta, prema slijepoj probi, na čitaču mikrotitarskih pločica na valnoj duljini od 450 nm.

3.2.14. Western blot tehnika

Proteinski izražaj NPY-a, VIP-a, molekule CD26 te β -aktina u tkivima pokusnih životinja određivao se *Western blot* tehnikom. Ova tehnika omogućuje detekciju ciljnog proteina slijedom navedenih postupaka: 1. elektroforetsko razdvajanje proteina na poliakrilamidnom gelu, 2. prijenos proteina s gela na membranu, 3. vezivanje specifičnih primarnih i sekundarnih protutijela na ciljni protein i 4. detekcija fotoluminiscentnog signala.

3.2.14.1. Elektroforetsko razdvajanje proteina

Proteini koji se nalaze u uzorcima homogenata tkiva razdvajaju se prema veličini, odnosno molekulskoj masi, na poliakrilamidnim gelovima (PAGE) u prisutnosti SDS-a, postupkom elektroforetskog razdvajanja proteina. U tu svrhu potrebno je prethodno pripremiti gelove za elektroforezu prema protokolima opisanim u slijedećim poglavljima.

3.2.14.1.1. Priprema gelova za elektroforetsko razdvajanje proteina

SDS-PAGE-elektroforetsko razdvajanje proteina sastoji se od gela sačinjenog od dva dijela, sabijajućeg ili tzv. gornjeg gela te razdvajajućeg ili tzv. donjeg gela. Pripremaju se zasebno, a nakon polimerizacije donjeg gela na njega se dodaje gornji gel koji se također potom polimerizira i zajedno predstavljaju kompaktnu gelatinoznu strukturu različite čvrstoće, u ovisnosti o željenom postotku sadržaja bis-akrilamida. U ovom je istraživanju za detekciju proteinskog izražaja NPY-a i VIP-a korišten 12,5%-tni a za detekciju proteinskog izražaja molekule CD26 10%-tni poliakrilamidni gel u prisutnosti SDS-a.

3.2.14.1.2. Priprema razdvajajućeg gela za elektroforezu

Razdvajajući odnosno tzv. donji gel za elektroforezu priprema se pomoću odgovarajućih omjera reagenasa navedenih u tablici br. 6, u ovisnosti o postotku gela koji želimo pripremiti. Pojedini sastojci dodaju se uz stalno miješanje u otopinu prema okomitom redoslijedu navedenim u sljedećoj tablici.

Tablica 6. Priprema razdvajajućih gelova za elektroforetsko razdvajanje proteina

Sastojak	Gustoća gela				
	8%	10%	12,5%	15%	18%
H ₂ O (ultra čista)	4,120 mL	3,610 mL	2,990 mL	2,370 mL	1,620 mL
Tris/HCl pufer (1M, pH=8,8)	3,750 mL	3,750 mL	3,750 mL	3,750 mL	3,750 mL
Akrilamid/Bisakrilamid	2,000 mL	2,500 mL	3,120 mL	3,740 mL	4,490 mL
20% SDS	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	48 µL	48 µL	48 µL	48 µL	48 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL

Nakon dodatka $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ i TEMED-a započinje proces polimerizacije te se pripremljena otopina odmah nanosi u stakalca za pripremu gelova za elektroforetsko razdvajanje proteina. U ovom su istraživanju korištena stakalca proizvođača Bio-rad, USA. Pripremljena otopina dostatna je za pripremu dva razdvajajuća gela veličine 6 x 8,3 cm.

3.2.14.1.3. Priprema sabijajućeg gela za elektroforezu

Sabijajući, odnosno tzv. gornji gel za elektroforezu priprema se pomoću reagenasa navedenima u tablici br.7, koji se dodaju uz miješanje u okomitom redoslijedu navedenim u tablici.

Tablica 7. Priprema sabijajućih gelova za elektroforetsko razdvajanje proteina

Sastojak	5%-tni gel
H ₂ O (ultra čista)	3,690 mL
Tris/HCl pufer (0,5M, pH=6,8)	625 µL
Akrlamid/Bisakrlamid	562,5 µL
20% SDS	25 µL
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	25 µL
TEMED	5 µL

Nakon dodatka $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ i TEMED-a započinje proces polimerizacije te se pripremljena otopina neposredno nanosi u stakalca na prethodno pripremljeni i već polimerizirani razdvajajući gel. Potom se postavljaju plastični graničnici za oblikovanje jažica za nanošenje uzoraka za elektroforetsko razdvajanje proteina. Nakon dovršenog procesa polimerizacije pripremljene jažice imaju širinu 0,75mm i ukupno ih ima 10.

Pripremljena otopina dostatna je za pripremu dva sabijajuća gela veličine 2 x 8,3 cm. Pripremljeni gelovi za elektroforezu koriste se istog dana ili najkasnije sljedeći dan uz pohranjivanje na +4°C.

3.2.14.1.4. Priprema uzoraka za nanošenje na gel za elektroforetsko

razdvajanje proteina

Uzorci homogenata tkiva koji sadržavaju ekstrahirane proteine pripremljeni na način opisani u poglavlju 3.2.9.3. razrjeđuju se u puferu za nanošenje uzoraka na gel za elektroforezu vodeći računa o adekvatnom razrjeđenju pufera. Uzorci odgovarajuće koncentracije pripremaju se u konačnom volumenu od 20 µL dodatkom RIPA pufera. Ukupne količine proteina u uzorcima pripremljenima za nanošenje na gel iznosile su 30 i 50 µg, što je utvrđeno prethodnim pilot-pokusima kao optimalna količina ukupnih proteina koje je potrebno nanositi u svaku jažicu.

Potom se uzorci zagrijavaju u vodenoj kupelji na +95°C kroz 10 minuta, ohlade i potom nanose u jažice prethodno pripremljenih gelova za elektroforetsko razdvajanje proteina. Prvi u nizu na gel se nanosi biljeg koji sadrži različite obojene proteinske komponente poznatih molekulskih masa. U ovom su istraživanju korišteni proteinski biljezi *Kaleidoscope Prestained Standards*, *BIO-RAD* te *Fermentas Life Sciences PageRuler™* koji sadrže odgovarajuće raspone proteina različitih molekulskih masa. Proteinski biljezi pohranjuju se na temperaturi od -20°C a na gel se nanose u ukupnom volumenu od 5 µL u nativnom obliku, bez prethodnog zagrijavanja na +95°C i bez dodatka dodatnih reagenasa, prema uputstvima proizvođača.

3.2.14.1.5. Proces elektroforetskog razdvajanja proteina

Proces elektroforetskog razdvajanja proteina na gelu provodio se pomoću vertikalnog sustava elektroforeze (Bio-rad, USA). Stakalca koja sadrže gelove za elektroforezu s nanesenim biljegom i uzorcima homogenata proteina tkiva postavljaju se u strukturu za provođenje postupka elektroforeze koja se nadopuni s 500 mL prethodno pripremljenog pufera za elektroforetsko razdvajanje proteina i priključe na stalan izvor struje napona 50 V uz neprekidno hlađenje, utvrđen kao optimalan prethodnim pilot-pokusima, kroz nekoliko sati. Elektroforeza je dovršena kada fronta i proteinski biljeg najmanje molekulske mase doputuju do dna gela.

Nakon provedenog procesa elektroforetskog razdvajanja proteina, gelovi se ostavljaju u prethodno pripremljenom puferu za prijenos proteina kroz 20 minuta. Isto tako se u navedenom puferu ostavljaju i Watman papiri za prijenos kroz vrijeme od 10 minuta. Postupak pripreme poliviniliden-fluorid (PVDF) membrane je sljedeći: izrezana membrana odgovarajuće veličine aktivira se u metanolu tijekom 30 sekundi. Potom se membrana ispiru u čistoj destiliranoj vodi kroz 5 minuta, a nakon toga se ostavlja u puferu za prijenos proteina kroz najmanje 10 minuta. Nakon pripreme gela, Watman papira za prijenos i membrane, slijedi proces prijenosa proteina na membranu.

3.2.14.1.6. Proces prijenosa proteina na membranu

Proces prijenosa elektroforetski razdvojenih proteina s gela na membranu provodio se pomoću sustava za prijenos proteina *Trans-blot semi-dry transfer cell* (tzv. polu-suhi sustav, Bio-rad, USA).

Kako bi se elektroforetski razdvojeni proteini pravilno prenijeli s gela na membranu, na anodnu je ploču najprije postavljen papir za prijenos, potom membrana na koju je položen akrilamidni gel s proteinima koji je potom prekropljen drugim papirom

za prijenos. Svaki je korak bio popraćen vlaženjem puferom za transfer. Nakon što su pomoću staklene epruvete istisnuti eventualni mjehurići zraka, sustav je zatvoren postavljanjem katodne ploče i sigurnosnog poklopca te priključen na stalan izvor struje jakosti 0,22 mA pazeći pritom da napon ne pređe 25 V. Postupak prijenosa proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu provođen je kroz 45 minuta. Navedeni su uvjeti utvrđeni kao optimalni prethodnim pilot-pokusima.

Uspješnost postupka prijenosa proteina provjeravana je bojenjem PVDF membrane u otopini *Ponceau S*, koja omogućuje vizualizaciju proteinskih bendova. Potom je membrana ispirana u destiliranoj vodi do ponovnog obezbojenja. Uslijedilo je blokiranje nespecifičnih veznih mjesta (epitopa) u svježe pripremljenoj otopini 5%-tnog nemasnog mlijeka tijekom dva sata na sobnoj temperaturi.

3.2.14.1.7. Vezivanje specifičnih primarnih i sekundarnih protutijela

U uzorcima elektroforetski razdvojenih proteina mozga odnosno debelog crijeva različitih skupina C57BL/6 i CD26 deficijentnih miševa istraživao se proteinski izražaj NPY-a, VIP-a i molekule CD26. Kao kontrola nanosa istovjetnih količina ukupnih proteina na poliakrilamidni gel i ispravnosti cjelokupnog postupka *Western blot* tehnike korišten je β -aktin, ubikvitarno prisutan tkivni protein. U svrhu detekcije proteina korištena su specifična poliklonska protutijela, i to redom: za NPY primarno poliklonsko zečje protu-NPY protutijelo, NPY (FL-97): sc-28943, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*; za VIP primarno poliklonsko zečje protu-VIP protutijelo, VIP (H-95): sc-20727, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, za CD26 primarno poliklonsko zečje protu-CD26 protutijelo, CD26 (H-270): sc-9153, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.* te za kontrolu primarno protu- β -aktin mišje monoklonsko protutijelo, MAB1501, *Chemicon International*. Navedene su otopine primarnih protutijela pripremljena kao što je opisano ranije u tekstu i upotrebljavana u

razrjeđenju 1:200 za NPY, VIP i CD26, odnosno 1:40000 za β -aktin, što je prethodno utvrđeno brojnim pilot-pokusima kao optimalna razrjeđenja.

Neposredno prije uranjanja u otopinu odgovarajućeg primarnog protutijela, membrana je oprezno izrezana na visini odgovarajuće molekulske mase, a kao orijentacija poslužili su vidljivi bendovi proteinskog biljega poznatih molekulskih masa. Odgovarajući dio membrane ostavljen je potom u odgovarajućoj otopini protutijela tijekom noći uz lagano miješanje na tresilici (70 okretaja u minuti) na temperaturi od +4°C.

Dio membrane koji je sadržavao kontrolu nanosa i postupka *Western blot* tehnike, β -aktin (molekulska masa 42 kDa), ostavljen je preko noći u puferu za blokiranje mjesta nespecifičnog vezivanja protutijela, obzirom da je prethodnim pilot-pokusima utvrđen izrazito jaki afinitet vezivanja primarnih protutijela za β -aktin. Stoga je taj dio membrane uranjan u otopinu primarnog protutijela za β -aktin idućeg dana, kroz vrijeme od 30 minuta na temperaturi od +4°C.

Nakon postupka vezivanja odgovarajućih primarnih protutijela, membrane su ispirane tri puta po petnaest minuta uz miješanje na tresilici (70 okretaja u minuti), u svježe pripremljenoj otopini za ispiranje (TBS-T).

Uslijedio je postupak vezivanja odgovarajućih sekundarnih protutijela, i to redom: za NPY, VIP i CD26 mišje sekundarno protu-zečje protutijelo konjugirano s peroksidazom hrena (*horseradish peroxidase*, HRP), *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, a za β -aktin sekundarno kozje protu-mišje protutijelo konjugirano s peroksidazom hrena (HRP), *Santa Cruz Biotechnology, Inc.* Otopine sekundarnih protutijela pripremane su svježe te korištene u razrjeđenjima 1:2000 što je utvrđeno kao optimalna koncentracija prethodnim pilot-pokusima. Membrane su uranjane u otopinu odgovarajućih sekundarnih protutijela u vremenu od 90 minuta na sobnoj temperaturi uz miješanje na tresilici

brzinom 70 okretaja u minuti. Nakon postupka vezivanja sekundarnih protutijela, membrane su ponovno ispirane tri puta prema prethodno opisanom postupku.

3.2.14.1.8. Detekcija fotoluminiscentnog signala postupkom kemiluminiscencije

Signal specifičan za pojedini ispitivani parametar pojačan je sustavom kemiluminiscencije fotoluminiscentnim signalom i detektiran korištenjem *Agfa* fotofilmova. Sekundarna protutijela na svojoj površini sadrže konjugirani enzim peroksidazu hrena (*horseradish peroxidase*, HRP), koji omogućuje razgradnju specifičnog fotoluminiscentnog signala, čiji se potom intenzitet detektira fotosenzibilnim filmovima. U tu svrhu na membrane je otpipetirano pripližno 1 mL neposredno prije, svježe pripremljene otopine supstrata, dobivene miješanjem proporcionalnih volumena otopine A (1000 μ L) i otopine B (25 μ L), od kojih se sastoji komplet supstrata (*Amersham ECL plus Western blotting detection reagents*). Nakon inkubacije u trajanju od 10 minuta u mraku, membrane su prekrivene tankom prozirnom folijom i prenesene u kazetu za postupak razvijanja i detektiranja fotoluminiscentnog signala. Potom su na membrane položeni fotosenzibilni filmovi (*AGFA Ortho CP-G plus*) u različitim vremenskim intervalima, u ovisnosti o jakosti fotoluminiscentnog signala (od 30 sekundi do 30 minuta). Cijeli je postupak provođen u mraku. Signal detektiran na fotosenzibilnim filmovima vizualiziran je postupkom uranjanja filmova u sljedeći niz otopina: otopinu za razvijanje, za fiksaciju i za ispiranje. Filmovi su ponajprije uranjani u pripremljenu otopinu za razvijanje (*Agfa*) kroz 30 sekundi, zatim su ispirani u čistoj destiliranoj vodi kroz 30 sekundi, nakon čega je uslijedio postupak fiksacije u otopini fiksativa (*Kodak*) kroz 45 sekundi te neposljetku ispiranje u čistoj destiliranoj vodi kroz 30 sekundi. Razvijeni filmovi osušeni su na sobnoj temperaturi. Dobiveni signali skenirani su uporabom optičkog digitalnog skenera (*Canon solutions*).

Proteinski biljeg, koji je vidljiv na membrani, poslužio je kao orijentacija veličine molekulskih masa detektiranih signala, dok su kao kontrola nanosa istovjetne koncentracije ukupnih proteina u različitim uzorcima poslužili detektirani signali β -aktina.

3.3. Statistička obrada podataka

Prikupljeni podaci pohranjeni su u baze podataka koristeći program Windows Microsoft Excell®. Dobiveni podaci izraženi su kao mjera središnjice (srednja vrijednost) i raspršenja za brojčane podatke, odnosno kontingencijskim tablicama za kategoričke podatke, ovisno o njihovoj raspodjeli. Dobiveni rezultati prikazani su tabelarno ili grafički. Pri statističkoj obradi podataka uspoređivane su vrijednosti varijabli među skupinama, koristeći parametrijske i neparametrijske postupke statističke raščlambe, ovisno o raspodjeli podataka i mjernoj ljestvici koju oni slijede. Razlike između pojedinih skupina testirane su analizom varijance (ANOVA testom), Tukey HSD testom (engl. *honestly significant difference test*), Scheffeovim testom, odnosno Mann-Whitney U testom. Razina od $p < 0,05$ smatrala se statistički značajnom. Postupci statističke raščlambe učinjeni su koristeći program Windows Microsoft Excell® te pomoću računalnog programa STATISTICA® 7 (StatSoft Inc.; Tulsa, OK 74104, SAD).

4. Rezultati

4. Rezultati

4.1. Obilježja pokusnog modela kolitisa

Crohnovoj bolesti sličan kolitis u miša, odnosno TNBS-kolitis, predstavlja životinjski model upalne bolesti crijeva s kliničkim, histopatološkim, biokemijskim i imunskim specifičnostima vrlo sličnima humanoj Crohnovoj bolesti. Kako bi ispitali potencijalna neuroimunomodulacijska svojstva DPP IV/CD26 u Crohnovoj bolesti, uspostavljen je TNBS-model kolitisa (Crohnovoj bolesti sličan kolitis) u CD26 deficijentnih te C57BL/6 soju laboratorijskih miševa. C57BL/6 životinje ujedno predstavljaju i divlji tip miša jer su bili podloga za genetsku manipulaciju pri dobivanju CD26 deficijentnih životinja. Uspostava, razvoj, intenzitet i cijeljenje kolitisa u oba soja pokusnih životinja pratili su se temeljem kliničkih, makroskopskih i mikroskopskih (patohistoloških i histomorfometrijskih) parametara.

4.1.1. Procjena uspostave, razvoja i cijeljenja kolitisa

Uspostava, razvoj i cijeljenje kolitisa u C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja pratili su se dnevno, temeljem niza parametara koji uključuju opći pregled životinja, dnevno mjerenje tjelesne mase, pregled konzistencije stolice i tragova krvi te prisutnost rektalnog krvarenja. U cilju dodatne procjene i provjere uspostave kolitisa, na lokalnoj razini učinjene su slijedeće analize:

- a. Određivanje makroskopski vidljivih promjena kolona;
- b. Određivanje patohistoloških promjena u ispitivanim skupinama C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja kojima je induciran kolitis u usporedbi s njihovim odgovarajućim kontrolnim skupinama;
- c. Određivanje mikroskopskog indeksa oštećenja;

-
- d. Histomorfometrijska analiza (određivanje broj kripti, mjerenje dubina kripti i širina kripti) sluznice debelog crijeva na parafinskim tkivnim rezovima obojanima hematoksilin-eozinom svih pojedinih životinja različitih sojeva pojedinih ispitivanih skupina.

Temeljem kliničkih simptoma i rezultata specifičnih patohistoloških i histomorfometrijskih analiza, utvrđeno je da pokusne životinje oba soja poboljšavaju od TNBS-om induciranog kolitisa. Stopa smrtnosti laboratorijskih životinja bila je najveća prvih pet dana od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu i iznosila je približno 11%. Takve promjene nisu zapažene u kontrolnim skupinama životinja, a do uginuća istih došlo je eventualno uslijed prethodne perforacije crijeva prilikom manipulacije polipropilenskim kateterom.

Kolitis se kod pokusnih životinja oba soja manifestirao općenito lošim kliničkim stanjem, gubitkom tjelesne mase, promjenama konzistencije stolice u kojoj je bilo moguće utvrditi sadržaj krvi te eventualno prisutstvom rektalnog krvarenja. Simptomi su bili najintenzivniji drugog dana od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu. Makroskopske promjene također su bile najizraženije drugog dana a manifestirale su se kao skraćanje i zadebljanje kolona te lokalizirana, žarišna upala završnog dijela debelog crijeva. Patohistološki nalazi potvrdili su postojanje upalnih promjena vrlo sličnih onima u humanoj Crohnovoj bolesti. Histomorfometrijska analiza preparata debelog crijeva potvrdila je smanjenje broja kripti, njihovo proširenje te smanjenje dubine kripti debelog crijeva u skupinama životinja s induciranim kolitisom. Zamijećene su i promjene mase jetre i slezene odnosno hepatosomatskog inteksa te relativnog omjera mase slezene i tjelesne mase. Navedene promjene detaljno su opisane i razrađene u daljnjem tekstu.

Obzirom da u pojedinim skupinama pokusnih životinja oba soja nisu zabilježene statistički značajne razlike u niti jednom od ispitivanih parametara između

pojedinih skupina životinja žrtvovanih različitim dana od aplikacije fiziološke otopine, te su skupine objedinjene. U cilju pojednostavljivanja prikaza dobivenih rezultata, označene su kao nulti dan, odnosno skupina životinja u fiziološkim uvjetima.

4.1.1.1. Promjena tjelesne mase i mase organa pokusnih životinja

Tjelesne mase pojedinih životinja svih skupina oba istraživana soja određivane su svakoga dana približno u isto doba, počevši od dana aplikacije otopine TNBS-a u etanolu, otopine etanola ili pak fiziološke otopine, do dana žrtvovanja (drugi, sedmi, petnaesti ili trideseti dan). Zapaženo je da su mase CD26 deficijentnih životinja u odnosu na C57BL/6 soj životinja iste dobi i spola statistički značajno različite ($p < 0,05$) te iznose $(25,29 \pm 2,23)$ g za C57BL/6 odnosno $(23,41 \pm 2,51)$ g za CD26 deficijentne životinje.

Mase mozga, jetre i slezene analitički su izmjerene svakoj pojedinoj pokusnoj životinji i sistematski prikazane u tablici br. 8. Zamijećeno je da su mase mozgov kod svih skupina C57BL/6 više u odnosu na mase mozgov CD26 deficijentnih životinja. S druge strane, mase jetre i slezene nešto su više u CD26 deficijentnih životinja u odnosu na odgovarajuće skupine C57BL/6 životinja. Trend smanjenja masa jetre i slezene drugog dana od indukcije kolitisa uočen je kod oba soja pokusnih životinja.

Hepatosomatski indeks (relativan omjer mase jetre i tjelesne mase) te relativan omjer mase slezene i tjelesne mase životinja izračunati su za sve žrtvovane pokusne životinje svih skupina. Utvrđeno je da CD26 deficijentni miševi imaju statistički značajno više ($p < 0,05$) vrijednosti hepatosomatskog indeksa u odnosu na C57BL/6 skupine životinja. Hepatosomatski indeks smanjuje se drugog dana od indukcije kolitisa u oba soja pokusnih životinja, što je posljedica smanjenja mase jetre, unatoč smanjenju tjelesne težine.

C57BL/6 i CD26 deficijentne životinje, s druge strane, ne razlikuju se statistički značajno u vrijednostima relativnih omjera mase slezene i tjelesne mase u fiziološkim uvjetima, kao ni u kontrolnim skupinama. Unatoč smanjenju mase slezene drugog dana od indukcije kolitisa u oba soja pokusnih životinja, uslijed smanjenja tjelesne mase ne dolazi do statistički značajnog sniženja njihovih relativnih omjera. Statistički značajan porast relativnog omjera mase slezene i tjelesne mase zabilježen je u skupini CD26 deficijentnih životinja petnaestog dana od indukcije kolitisa, u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu te u odnosu na C57BL/6 životinje žrtvovane istog dana od indukcije kolitisa (slike 23 i 24).

Tablica 8. Mase mozga, jetre i slezene C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja različitih pokusnih skupina

Soj pokusnih životinja	Pokusna skupina	Dan žrtvovanja	Masa mozga (g)	Masa jetre (g)	Masa slezene (g)
C57BL/6	fiziološka	0.	0,44776 ± 0,02273	1,32092 ± 0,11335	0,07822 ± 0,00951
	kolitis	2.	0,44733 ± 0,02117	0,89232 ± 0,14574	0,07596 ± 0,01806
	kolitis	7.	0,44019 ± 0,01498	1,12842 ± 0,19671	0,08650 ± 0,02623
	kolitis	15.	0,44037 ± 0,03687	1,24861 ± 0,12537	0,08424 ± 0,02037
	kolitis	30.	0,44113 ± 0,02342	1,36642 ± 0,14692	0,07707 ± 0,01311
C57BL/6	fiziološka	0	0,44776 ± 0,02273	1,32092 ± 0,11335	0,07822 ± 0,00951
	kontrola	2.	0,44716 ± 0,01527	1,27890 ± 0,15756	0,07680 ± 0,01630
	kontrola	7.	0,44488 ± 0,00435	1,23160 ± 0,05487	0,07462 ± 0,00938
	kontrola	15.	0,44838 ± 0,25067	1,26048 ± 0,05868	0,07630 ± 0,01327
	kontrola	30.	0,43701 ± 0,03043	1,35711 ± 0,17414	0,07728 ± 0,00697
CD26^{-/-}	fiziološka	0.	0,41532 ± 0,02409	1,43343 ± 0,12470	0,08170 ± 0,01447
	kolitis	2.	0,41836 ± 0,02203	1,08765 ± 0,12792	0,06012 ± 0,01982
	kolitis	7.	0,42448 ± 0,02631	1,53770 ± 0,07895	0,11080 ± 0,04752
	kolitis	15.	0,42556 ± 0,01740	1,47498 ± 0,18033	0,11300 ± 0,01758
	kolitis	30.	0,41040 ± 0,01315	1,36693 ± 0,10567	0,09158 ± 0,02720
CD26^{-/-}	fiziološka	0.	0,41532 ± 0,02409	1,43343 ± 0,12470	0,08170 ± 0,01447
	kontrola	2.	0,40117 ± 0,02964	1,33858 ± 0,22979	0,08222 ± 0,03727
	kontrola	7.	0,41232 ± 0,02331	1,38604 ± 0,07852	0,08058 ± 0,00259
	kontrola	15.	0,41924 ± 0,03450	1,24388 ± 0,08975	0,08260 ± 0,00995
	kontrola	30.	0,42334 ± 0,02402	1,34925 ± 0,24189	0,08338 ± 0,01257

Slika 21 grafički prikazuje promjene hepatosomatskih indeksa skupina C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa (prikaz A), odnosno odgovarajućih kontrolnih skupina (prikaz B).

Slika 21. Promjene hepatosomatskih indeksa (relativni omjer mase jetre i tjelesne mase) u C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa (prikaz A), odnosno odgovarajućih kontrolnih skupina (prikaz B).

(Dobivene vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja

Statističkom analizom dobivenih rezultata utvrđene su statistički različite ($p < 0,05$) vrijednosti hepatosomatskih indeksa između pojedinih ispitivanih sojeva pokusnih životinja kako u fiziološkim uvjetima tako i tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

Na slici 22 grafički su prikazane promjene hepatosomatskih indeksa u C57BL/6 (prikaz A) i CD26 deficijentnih životinja (prikaz B) u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine, tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

Slika 22. Promjene hepatosomatskih indeksa (omjer relativne mase jetre i tjelesne mase) u C57BL/6 (prikaz A) i CD26 deficijentnih životinja (prikaz B) tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobivene vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Slika 23 grafički prikazuje promjene relativnih omjera mase slezene i tjelesne mase skupina C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa (prikaz A), odnosno odgovarajućih kontrolnih skupina (prikaz B).

Slika 23. Promjene relativnih omjera mase slezene i tjelesne mase u C57BL/6 te CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa (prikaz A), odnosno odgovarajućih kontrolnih skupina (prikaz B).

(Dobivene vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficijetnih životinja

Na slici 24 grafički su prikazane promjene relativnih omjera mase slezene i tjelesne mase u C57BL/6 (prikaz A) i CD26 deficijetnih životinja (prikaz B) u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine, tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

Slika 24. Promjene relativnih omjera mase slezene i tjelesne mase C57BL/6 (prikaz A) te CD26 deficijetnih životinja (prikaz B) tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobivene vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

4.1.1.2. Makroskopske promjene debelog crijeva

Drugi dan od aplikacije etanolne otopine TNBS-a predstavlja akutnu fazu kolitisa i karakteriziran je skraćanjem i zadebljnjem kolona te lokaliziranim, žarišnim upalnim promjenama ponajviše u završnom dijelu debelog crijeva. Upalne promjene diskontinuiranog su karaktera, s područjima zdravog tkiva između područja zahvaćenih upalom. Navedene promjene zapažene su u oba soja pokusnih životinja kojima je induciran kolitis, a nisu zapažene u kontrolnim skupinama, tj. skupinama životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina, odnosno otopina etanola.

Slike 25 i 26 prikazuju karakteristične promjene u debelom crijevu pokusnih životinja kojima je induciran kolitis, u akutnoj fazi bolesti.

Slika 25. Makroskopske promjene debelog crijeva karakteristične za akutnu fazu kolitisa (skraćenje i zadebljanje kolona, makroskopska upala-prikazi B i C, u usporedbi sa zdravim kolonom-prikaz A).

Slika 26. Makroskopske upalne promjene debelog crijeva karakteristične za akutnu fazu kolitisa.

4.1.1.3. Patohistološke promjene debelog crijeva

Patohistološka analiza provedena je na preparatima poprječnog presjeka debelog crijeva dobivenih nakon fiksacije u 4%-tnom paraformaldehidu i klasičnog parafinskog postupka. Preparati su nakon rezanja na tkivne rezove debljine 2 μ m obojani hematoksilin-eozinom. Analiza se vršila na serijskim rezovima četiri odsječka debelog crijeva, ukupno po 50 histoloških preparata po danu i životinji.

Životinje koje su bile u kontrolnim skupinama, tretirane fiziološkom otopinom, nisu pokazivale upalne promjene stijenke debelog crijeva (slika 27). Kod životinja iz kontrolnih skupina tretiranih otopinom etanola u nekim se preparatima drugog dana pokusa moglo uočiti razvijanje upalnog procesa, ali je uvijek bila zahvaćena samo sluznica uz infiltrate granulocita u lamini propriji i pojavu edema, ali bez oštećenja površnog epitela. Broj kripti na milimetar dužine crijeva je zbog edema bio smanjen. Također su uočena proširenja pojedinih kripti uz njihovo skraćivanje. Razlike u tipu stanica u infiltratima, kao i izgledu kripti između dva ispitivana soja nisu uočena. Kod kasnijih dana pokusa došlo je do potpune rezolucije upale bez nastanka fibroze ili ožiljaka.

Pregledom preparata C57BL/6 i CD26 deficitarnih miševa u skupinama koje su bile tretirane etanolnom otopinom TNBS-a utvrđene su različite patohistološke promjene. Promjene su bile najizraženije drugog dana od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu. Intraluminalna aplikacija etanolne otopine TNBS-a kod životinja oba soja izazvalo je nastajanje istog tipa promjena u stijenci kolona (slika 28). Može se uočiti djelom nekrotična sluznica, obilno prožeta neutrofilnim granulocitima kao i raspadnutim leukocitima, uz žarišna krvarenja i nastanak nekrotičnog detritusa (slika 28D). Promjene ne zahvaćaju sluznicu cijelog lumena crijeva već na nekim mjestima postoji održani epitel uz normalni izgled kripti. U području podsluznice postoji izražen edem uz

granulocitnu infiltraciju tkiva (slika 28C). Mogu se uočiti brojni eritrociti te nakupljanje fibrina. Infiltrati upalnih stanica nalaze se i u području oba sloja mišićnice.

Razlike između sojeva možemo uočiti analizirajući veći broj preparata. Naime, kod CD26 deficijentnih miševa promjene koje nalazimo ne zahvaćaju cijeli promjer crijeva već se radi o lokaliziranim ulceracijama. Najčešće upalu nalazimo u površnim slojevima sluznice uz očuvani mišićni sloj (slika 29A), ali se kod manjeg broja životinja javlja i transmuralna upala uz širenje promjena i na mezenterij debelog crijeva (slika 29B,D). Tako duboke transmuralne upale nisu uočene kod miševa soja C57BL/6. Ipak, upala u sluznici tih životinja češće je difuzna te zahvaća cijeli opseg crijeva uz vrlo malo, ili bez očuvanih dijelova sluznice (slika 29C).

Patohistološke promjene klasificirane su prateći količinu upalnih stanica i razinu oštećenja tkiva. Na taj su način dobivene vrijednosti koje smo označili kao **mikroskopski indeks oštećenja (MIO)**. Kod C57BL/6 soja životinja najveći broj uzoraka kolona drugog dana nakon aplikacije etanolne otopine TNBS-a klasificiran je kao nakupine upalnih stanica u sluznici s prodorom u podsluznicu - 2 boda; uz prisustvo ulceracija sluznice - 2 boda. Na taj je način dobiven MIO za C57BL/6 soj životinja označen kao stupanj oštećenja 4. U tu je skupinu spadalo 80% uzoraka. Kod jedne je životinje na pojedinačnim preparatima uočena infiltracija upalnih stanica kroz cijelu stijenku kolona iako transmuralnih ulceracija stijenke nije bilo. Kod preostalih 20% uzoraka oštećenje je bilo slabije izraženo te su uočene samo pojedinačne upalne stanice u lamini propriji - 1 bod; uz ograničeno oštećenje epitela - 1 bod. Na taj je način dobiven MIO označen sa stupnjem oštećenja 2. Treba naglasiti da su upalne promjene imale difuzni a ne žarišni izgled, te da je u većini uzoraka bila upaljena cijela cirkumferencija stijenke kolona.

Kod CD26 deficijntnih miševa većina je uzoraka tkiva debelog crijeva drugog dana pokusa pokazivala značajne upalne promjene. Oštećenja su bila ograničena samo na dio stijenke tako da je na preparatima bio uvijek prisutan i dio očuvane stijenke kolona. Stupanj oštećenja tkiva kod tih je životinja određen opisujući nakupine upalnih stanica u sluznici i podsluznici s 2 boda; uz žarišne ulceracije sluznice s 2 boda te je dobiven MIO označen s 4 boda. Na određenom broju uzoraka uočeni su transmuralni infiltrati upalnih stanica (3 boda) te žarišna transmuralna ulceracija stijenke kolona (3 boda) te MIO iznosi 6 bodova. Neki uzorci kolona životinja ove skupine nisu pokazivali značajne patohistološke promjene. Tako smo dobili MIO 2 u 9% uzoraka, MIO 4 boda u 66% uzoraka te MIO 6 u 25%.

Na preparatima kolona oba soja životinja u kasnijim danima pokusa vidljivo je vrlo brzo cijeljenje sluznice uz postepenu obnovu kripti i površnog epitela, smanjenje i nestanak upalnog infiltrata te gubitak edema (slika 30). Stanice koje nalazimo tijekom cijeljenja u lamini proprijii su mononuklearnog tipa. Česti su nalaz nakupine limfatičnog tkiva kako u podsluznici tako i u lamini proprijii.

Slika 27. Poprječni presjek kroz stijenku debelog crijeva CD26 deficijntnog (A) i C57BL6 (B) soja miša dva dana nakon aplikacije fiziološke otopine.

Preparati su dobiveni parafinskim postupkom. Hematoksilin-eozin bojenje, povećanje 20x.

Slika 28. Poprječni presjek kroz stijenku debelog crijeva CD26 deficijntnog (A, C) i C57BL/6 (B,D) miša dva dana nakon aplikacije otopine TNBS-a. Preparati su dobiveni parafinskim postupkom, obojani hematoksilin-eozinom. Povećanje 4x (A,B); 10x (C); 20x (D).

Slika 29. Poprječni presjek kroz stijenku debelog crijeva CD26 deficijentnog (A,B,D) i C57BL/6 (C) soja miša dva dana nakon aplikacije etanolne otopine TNBS-a.

A) Lokalizirane upalne promjene sluznice s oštećenjem epitela i lamine proprije.

B) Lokalizirana transmuralna upala. C) Upalne promjene cijele cirkumferencije kolona uz oštećenje epitela, upalnog infiltrata lamine proprije te očuvanu laminu muscularis mucosae. D) Veće povećanje dijela transmuralne upale, vidljiv nedostatak lamine muscularis mucosae. Vidljiv edem podsluznice uz krvarenje i nakupljanje fibrina. Preparati su dobiveni parafinskim postupkom, obojani hematoksilin-eozinom.

Povećanje 4x (A,B,C); 20x (D).

Slika 30. Poprečni presjek kroz stijenku debelog crijeva CD26 deficijentnog miša trideseti dan pokusa. Preparat je dobiven parafinskim postupkom, obojan hematoksilin-eozinom. Povećanje 4x.

4.1.1.4. Histomorfometrijska analiza parafinskih tkivnih rezova

Na slici 31 prikazani su rezultati dobiveni histomorfometrijskom analizom tkivnih rezova debelog crijeva kontrolnih skupina C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja.

Slika 31. Usporedba rezultata histomorfometrijske analize A) broja kripti (po milimetru dužine crijeva), B) širine kripti i C) dubine kripti u kontrolnim skupinama C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja.

(Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0, 2, 7, 15, 30 – dani žrtvovanja

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine etanola (kontrolne skupine životinja)

Statističkom analizom dobivenih vrijednosti nisu utvrđene statistički značajne razlike kako u broju tako ni u širini ni dubini kripti debelog crijeva između ispitivanih sojeva životinja. Nadalje, utvrđeno je da aplikacija otopine etanola, kao ni fiziološke otopine, ne uzrokuje statistički značajne razlike u ispitivanim histomorfometrijskim parametrima.

Na slici 32 grafički je prikazana usporedba broja kripti debelog crijeva C57BL/6 životinja u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

Slika 32. Prikaz histomorfometrijske analize broja kripti sluznice debelog crijeva tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u C57BL/6 miševa u usporedbi s kontrolnim skupinama.

Vrijednosti su izražene kao broj kripti po milimetru (mm) dužine crijeva.

(Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0, 2, 7, 15, 30 – dani žrtvovanja

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno otopine etanola (kontrola)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između skupine životinja kod kojih je induciran kolitis, u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Analizom dobivenih rezultata utvrđeno je da drugog dana od indukcije kolitisa, u C57BL/6 životinja dolazi do statistički značajnog smanjenja broja kripti debelog crijeva. Ovo smanjenje broja kripti prisutno je i sedmog dana od indukcije kolitisa.

Slika 33 prikazuje rezultate histomorfometrijske analize broja kripti po milimetru dužine crijeva tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u CD26 deficitnim životinjama, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

Slika 33. Prikaz histomorfometrijske analize broja kripti sluznice debelog crijeva tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u CD26 deficitnih miševa u usporedbi s kontrolnim skupinama. Vrijednosti su izražene kao broj kripti po milimetru (mm) dužine crijeva. (Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0, 2, 7, 15, 30 – dani žrtvovanja

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis) odnosno otopine etanola (kontrola)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između skupine životinja kod kojih je induciran kolitis, u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Analizom dobivenih rezultata utvrđeno je da statistički značajno smanjenje broja kripti u CD26 deficitnih životinja perzistira kroz cijelo razdoblje razvoja i cijeljenja kolitisa.

Usporedba izmjerenih vrijednosti broja kripti po milimetru dužine debelog crijeva tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u ispitivanim sojevima pokusnih životinja grafički je prikazana na slici 34.

Slika 34. Usporedba rezultata histomorfometrijske analize broja kripti sluznice debelog crijeva tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u C57BL/6 i CD26 deficitnih miševa

Vrijednosti su izražene kao broj kripti po milimetru (mm) dužine crijeva.

(Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0, 2, 7, 15, 30 – dani žrtvovanja

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis) odnosno otopine etanola (kontrola)

Dobiveni rezultati pokazuju da u CD26 deficitnih životinja dolazi do izraženijeg smanjenja broja kripti debelog crijeva tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, ali ne i statistički značajno u usporedbi s C57BL/6 životinjama.

Grafički prikaz promjena širina kripti u C57BL/6 životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa dan je na slici 35.

Slika 35. Prikaz histomorfometrijske analize širina kripti sluznice debelog crijeva tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u C57BL/6 miševa u usporedbi s kontrolnim skupinama.

Vrijednosti su izražene u mikrometrima (μm).

(Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0, 2, 7, 15, 30 – dani žrtvovanja

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis) odnosno otopine etanola (kontrola)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između skupine životinja kod kojih je induciran kolitis, u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Dobiveni rezultati pokazuju da drugog i sedmog dana od indukcije kolitisa dolazi do statistički značajnog ($p < 0,05$) povećanja širina kripti u skupinama životinja kojima je induciran kolitis u odnosu na životinje koje su primile sterilnu fiziološku otopinu odnosno otopinu etanola (kontrolne skupine).

Slične su promjene zamijećene i kod CD26 deficitarnih životinja, međutim, kod ovog soja miševa samo je drugog dana od indukcije kolitisa povećanje širine kripti statistički značajno ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu. Dobiveni rezultati grafički su prikazani na slici 36.

Slika 36. Prikaz histomorfometrijske analize širina kripti sluznice debelog crijeva tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u CD26 deficitarnih miševa u usporedbi s kontrolnim skupinama. Vrijednosti su izražene u mikrometrima (μm).

(Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0, 2, 7, 15, 30 – dani žrtvovanja

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno otopine etanola (kontrola)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između skupine životinja kod kojih je induciran kolitis, u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Usporedba promjena širina kripti debelog tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u ispitivanim sojevima pokusnih životinja grafički je prikazana na slici 37. Statističkom analizom dobivenih rezultata nisu utvrđene značajne razlike između skupina CD26 deficijernih i C57BL/6 životinja.

Slika 37. Usporedba rezultata histomorfometrijske analize širina kripti sluznice debelog crijeva tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u C57BL/6 i CD26 deficijernih miševa.

Vrijednosti su izražene u mikrometrima (μm).

(Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0, 2, 7, 15, 30 – dani žrtvovanja

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno otopine etanola (kontrola)

Slika 38 grafički prikazuje rezultate dobivene histomorfometrijskom analizom dubina kripti debelog crijeva tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u skupinama C57BL/6 životinja, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama. Analizom dobivenih podataka utvrđeno je statistički značajno ($p < 0,05$) sniženje dubina kripti debelog crijeva u akutnoj fazi kolitisa, odnosno drugog dana od izazivanja kolitisa.

Slika 38. Prikaz histomorfometrijske analize dubina kripti sluznice debelog crijeva tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u C57BL/6 miševa u usporedbi s kontrolnim skupinama. Vrijednosti su izražene u mikrometrima (μm) a rezultati prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Legenda:

0, 2, 7, 15, 30 – dani žrtvovanja

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno otopine etanola (kontrola)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između skupine životinja kod kojih je induciran kolitis, u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

U skupinama CD26 deficitarnih životinja zabilježen je sličan trend smanjenja broja kripti tijekom razvoja kolitisa. Rezultati su grafički prikazani na slici 39. Analizom dobivenih podataka utvrđeno je da je smanjenje dubina kripti u akutnoj fazi kolitisa statistički značajno ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu.

Slika 39. Prikaz histomorfometrijske analize dubina kripti sluznice debelog crijeva tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u CD26 deficitarnih miševa u usporedbi s kontrolnim skupinama. Vrijednosti su izražene u mikrometrima (μm). (Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0, 2, 7, 15, 30 – dani žrtvovanja

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno otopine etanola (kontrola)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između skupine životinja kod kojih je induciran kolitis, u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Usporedba rezultata histomorfometrijske analize dubina kripti debelog crijeva tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u skupinama CD26 deficitarnih i C57BL/6 životinja grafički su prikazane na slici 40. Analizom dobivenih rezultata utvrđen je sličan trend smanjenja dubina kripti u akutnoj fazi kolitisa, u oba soja pokusnih životinja. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između ispitivanih sojeva.

Slika 40. Usporedba rezultata histomorfometrijske analize dubina kripti sluznice debelog crijeva tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u C57BL/6 i CD26 deficitarnih miševa

Vrijednosti su izražene u mikrometrima (μm).

(Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0, 2, 7, 15, 30 – dani žrtvovanja

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno otopine etanola (kontrola)

4.2. Specifična imunobiokemijska istraživanja

Istraživanja na sistemskoj razini

Promjene koje se odvijaju *in vivo* pri razvoju i cijeljenju kolitisa u cirkulaciji laboratorijskih životinja klasificirane su kao promjene na sistemskoj razini.

Kako bi dobili uvid u promjene ispitivanih parametara na sistemskoj razini pratili smo sljedeća obilježja ciljnih molekula:

- 1.) enzimsku aktivnost serumske dipeptidil-peptidaze IV (DPP IV/CD26) u skupinama C57BL/6 miševa;
- 2.) aktivnost serumskih dipeptidil-peptidazi IV – sličnih enzima (engl. DPP IV/CD26-*like enzyme activities*) u skupinama CD26 deficijentnih miševa;
- 3.) koncentraciju neuropeptida Y (NPY) u serumu C57BL/6 i CD26 deficijentnih skupina životinja;
- 4.) koncentraciju vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP) u serumu C57BL/6 i CD26 deficijentnih skupina životinja;
- 5.) koncentraciju interleukina – 6 (IL-6) u serumu C57BL/6 i CD26 deficijentnih skupina životinja;
- 6.) koncentraciju interleukina – 10 (IL-10) u serumu C57BL/6 i CD26 deficijentnih skupina životinja.

Navedena su istraživanja provedena u serumu pokusnih životinja koji je dobiven neposredno nakon žrtvovanja miševa iz pojedinih ispitivanih skupina (poglavlje 3.2.3.).

Istraživanja na lokalnoj razini

Promjene koje se odvijaju *in vivo* pri razvoju i cijeljenju pokusnog modela kolitisa u ciljnim organima (u mozgu i debelom crijevu) laboratorijskih životinja klasificirane su kao promjene na lokalnoj razini.

Kako bi dobili uvid u promjene ispitivanih parametara na lokalnoj razini obavljena su sljedeća istraživanja:

I. Istraživanja u **mozgu** različitih skupina pokusnih životinja:

1. Određivanje enzimske aktivnosti DPP IV/CD26 u mozgu C57BL/6 soja miša različitih ispitivanih skupina;
2. Određivanje enzimske aktivnosti DPP IV/CD26 – sličnih enzima u mozgu CD26 deficijentnog soja miša različitih ispitivanih skupina;
3. Određivanje sadržaja neuropeptida Y (NPY) u mozgu C57BL/6 i CD26 deficijentnih skupina životinja;
4. Određivanje sadržaja vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP) u mozgu C57BL/6 i CD26 deficijentnih skupina životinja;
5. Određivanje sadržaja interleukina – 6 (IL-6) u mozgu C57BL/6 i CD26 deficijentnih skupina životinja;
6. Određivanje sadržaja interleukina – 10 (IL-10) u mozgu C57BL/6 i CD26 deficijentnih skupina životinja;

II. Istraživanja u **debelom crijevu** različitih skupina pokusnih životinja:

1. Određivanje intestinalne enzimske aktivnosti DPP IV/CD26 u C57BL/6 soju miša različitih ispitivanih skupina;
2. Određivanje intestinalne aktivnosti DPP IV/CD26-sličnih enzima u CD26 deficijentnom soju miša različitih ispitivanih skupina;

-
3. Određivanje sadržaja neuropeptida Y (NPY) u debelom crijevu C57BL/6 i CD26 deficijentnih skupina životinja;
 4. Određivanje sadržaja vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP) u debelom crijevu C57BL/6 i CD26 deficijentnih skupina životinja;
 5. Određivanje sadržaja interleukina – 6 (IL-6) u debelom crijevu C57BL/6 i CD26 deficijentnih skupina životinja;
 6. Određivanje sadržaja interleukina – 10 (IL-10) u debelom crijevu C57BL/6 i CD26 deficijentnih skupina životinja.

4.2.1. Rezultati istraživanja na sistemskoj razini

Istraživanja na sistemskoj razini obuhvatila su analize ranije opisanih parametara u cirkulaciji svih skupina pokusnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u C57BL/6 i CD26 deficijentnim životinjama, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

4.2.1.1. Biokemijske analize enzimске aktivnosti DPP IV/CD26 i DPP IV/CD26-sličnih enzima tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa

Enzimске aktivnosti serumske DPPIV/CD26 i DPP IV/CD26-sličnih enzima određivane su u svim skupinama pokusnih životinja oba istraživana soja i izražene su u internacionalnim jedinicama po litri seruma (IU/L).

4.2.1.1.1. Aktivnosti serumske DPP IV/CD26 u C57BL/6 miševa

Aktivnosti serumske DPP IV/CD26 u C57BL/6 životinja izmjerene su spektrofotometrijski te su dobiveni rezultati analizirani i prikazani grafički na slikama br. 41 i 43.

Statističkom analizom dobivenih podataka utvrđeno je da aplikacija otopine etanola (kontrolne skupine odgovarajućih dana) ne uzrokuje statistički značajne promjene u aktivnosti serumske DPP IV/CD26 u C57BL/6 životinja. Aplikacija otopine TNBS-a u etanolu, koja dovodi do razvoja kolitisa s najvećom aktivnošću bolesti drugog dana od aplikacije, uzrokuje statistički značajno sniženje ($p < 0,001$) aktivnosti DPP IV/CD26 u serumu C57 BL/6 životinja. Vrijednosti ostaju statistički značajno snižene drugog i sedmog dana ($p < 0,001$) te petnaestog dana ($p < 0,05$) od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu, uz tendenciju vraćanja na fiziološke razine. Tridesetog dana od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu vrijednosti aktivnosti serumske DPP IV/CD26 u C57BL/6 životinja se normaliziraju.

Slika 41. prikazuje promjene enzimske aktivnosti serumske DPP IV/CD26 tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u C57BL/6 soju pokusnih životinja, u odnosu na vrijednosti izmjerene kod odgovarajućih kontrolnih skupina.

Slika 41. Aktivnost dipeptidil-peptidaze IV (DPP IV/CD26) u serumu C57BL/6 soja miša tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa uzrokovanog aplikacijom otopine TNBS-a u etanolu, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobivene vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja s induciranim kolitisom), odnosno otopine etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,001$ za drugi i sedmi te $p < 0,05$ za petnaesti dan) između skupine životinja kod kojih je induciran kolitis, u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Statističkom analizom dobivenih rezultata utvrđeno je statistički značajno ($p < 0,05$) smanjene aktivnosti DPP IV/CD26 u serumu C57BL/6 životinja kojima je induciran kolitis i to drugog, sedmog i petnaestog dana od indukcije kolitisa, u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine.

4.2.1.1.2. Aktivnosti DPP IV/CD26-sličnih enzima u serumu

CD26 deficijentnih miševa

Enzimske aktivnosti DPP IV/CD26-sličnih enzima određivane su i u svim skupinama CD26 deficijentnih životinja. Dobiveni rezultati su analizirani i prikazani grafički na slici br. 42.

Slika 42. Aktivnost DPP IV/CD26-sličnih enzima u serumu CD26 deficijentnog soja miša tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa uzrokovanog aplikacijom otopine TNBS-a, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobivene vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja s induciranim kolitisom), odnosno otopine etanola (kontrolne skupine)

Skala je prilagođena niskim vrijednostima DPP IV/CD26-sličnih enzima

Statističkom analizom dobivenih rezultata nisu utvrđene statistički značajne razlike u aktivnosti DPP IV/CD26 sličnih enzima ni u skupinama s induciranim kolitisom, niti u kontrolnim skupinama, niti međusobno.

Slika 43. prikazuje usporedbu dobivenih vrijednosti DPP IV/CD26 i DPP IV/CD26 sličnih enzima u serumu C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja. Utvrđeno je da aktivnost DPP IV/CD26-sličnih enzima u serumu CD26 deficijentnog soja miša iznosi u prosjeku 9,36% ukupne detektirane aktivnosti DPP IV/CD26 u serumu C57BL/6 soja miša u fiziološkim uvjetima.

Slika 43. Usporedba aktivnosti dipeptidil-peptidaze IV (DPP IV/CD26) u serumu C57BL/6 soja miša i aktivnosti DPP IV/CD26-sličnih enzima u serumu CD26 deficijentnog soja miša tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa uzrokovanog aplikacijom otopine TNBS-a u etanolu te odgovarajućih kontrolnih skupina.
(Dobivene vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja s induciranim kolitisom), odnosno otopine etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,001$) između skupina C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja

b, statistički značajna razlika ($p < 0,001$ za drugi i sedmi te $p < 0,05$ za petnaesti dan) između skupine životinja soja C57BL/6 kod kojih je induciran kolitis, u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

4.2.1.2. Koncentracije neuropeptida u serumu pokusnih životinja

Koncentracije neuropeptida (NPY) i vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP) određivane su imunoenzimskim testovima u serumu svih skupina pokusnih životinja C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja.

4.2.1.2.1. Serumske koncentracije neuropeptida Y

Izmjerene vrijednosti koncentracija NPY-a u serumima kontrolnih skupina oba soja pokusnih životinja prikazane su na slici 44.

Slika 44. Usporedba vrijednosti koncentracija neuropeptida Y u serumu pokusnih životinja kontrolnih skupina C57BL/6 i CD26^{-/-} sojeva miševa.

(Dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine etanola (kontrolne skupine)

Statističkom analizom dobivenih vrijednosti koncentracija NPY-a u serumu različitih kontrolnih skupina oba soja životinja utvrđene su nešto više vrijednosti NPY-a u serumu CD26^{-/-} miševa više, ali ova razlika nije statistički značajna. Utvrđeno je da aplikacija otopine etanola (kontrolne skupine) kod oba soja miša ne uzrokuje statistički značajne promjene u koncentraciji NPY-a u serumu.

Na slici 45 grafički su prikazani dobiveni rezultati koncentracija NPY-a u serumu C57BL/6 soja životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

Slika 45. Koncentracije NPY-a u serumu C57BL/6 životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno etanola (kontrolne skupine)

Analizom dobivenih rezultata utvrđeno je povišenje vrijednosti koncentracije NPY-a u serumu C57BL/6 skupina životinja drugog i osobito sedmog dana nakon indukcije kolitisa odnosno aplikacije otopine TNBS-a u etanolu u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine. Statističkom analizom dobivenih vrijednosti utvrđeno je da ove razlike zbog standardnih devijacija nisu statistički značajne.

Slika 46 grafički prikazuje dobivene vrijednosti koncentracija NPY-a u serumu CD26 deficitarnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

Slika 46. Koncentracije NPY-a u serumu C57BL/6 životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Analizom dobivenih rezultata utvrđeno je povišenje koncentracija NPY-a u serumu CD26 deficijernih životinja drugog, sedmog i petnaestog dana od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu. Najveće vrijednosti uočene su sedmog dana i one se, kao i petnaestog dana, razlikuju statistički ($p < 0,05$) značajno u odnosu na fiziološke vrijednosti i odgovarajuće kontrolne skupine. Tridesetog dana koncentracije NPY-a ponovno se normaliziraju, poprimajući fiziološke vrijednosti.

Usporedba dobivenih vrijednosti koncentracija NPY-a u serumu C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa prikazana je na slici 47.

Slika 47. Usporedba promjena koncentracija NPY-a u serumu C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

(Dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

b, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja

Analizom dobivenih rezultata uočen je sličan trend porasta koncentracije NPY-a u serumu koji kod oba soja pokusnih životinja dostiže najviše vrijednosti sedmog dana od indukcije kolitisa. Petnaestog dana vrijednosti koncentracije NPY-a se normaliziraju i poprimaju fiziološke vrijednosti kod C57BL/6 životinja dok kod CD26 deficijernih životinja tek počinju opadati i između ova dva soja razlikuju se statistički značajno ($p < 0,05$). Tridesetog dana od aplikacije kolitisa vrijednosti kod oba soja poprimaju fiziološke vrijednosti.

4.2.1.2.2. Serumske koncentracije vazoaktivnog intestinalnog peptida

Izmjerene vrijednosti koncentracija VIP-a u serumima kontrolnih skupina C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja prikazane su na slici 48.

Slika 48. Usporedba vrijednosti koncentracija vazoaktivnog intestinalnog peptida u serumu pokusnih životinja kontrolnih skupina C57BL/6 i CD26-/- sojeva miševa.

(Dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja

Analizom dobivenih rezultata uočeno je da CD26 deficijentne životinje u fiziološkim uvjetima imaju višu koncentraciju VIP-a u serumu u odnosu na C57BL/6 životinje. Ova je razlika statistički značajna ($p < 0,05$). Nadalje, uočeno je da aplikacija otopine etanola kod oba soja pokusnih životinja uzrokuje blago povišenje koncentracije VIP-a u serumu drugog dana nakon aplikacija, no ove razlike nisu statistički značajne.

Dobivene vrijednosti koncentracija VIP-a u serumu C57BL/6 životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama grafički su prikazane na slici 49.

Slika 49. Koncentracije vazoaktivnog intestinalnog peptida u serumu C57BL/6 životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja s induciranim kolitisom) odnosno etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Analizom dobivenih rezultata uočeno je povišenje koncentracije VIP-a u serumu C57BL/6 životinja drugog dana nakon indukcije kolitisa. Statističkom analizom dobivenih vrijednosti utvrđeno je da je ovo povišenje statistički značajno ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu. Vrijednosti VIP-a ostaju povišene sedmog i petnaestog

dana od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu, s trendom smanjivanja koncentracije. Tridesetog dana koncentracije VIP-a u serumu poprimaju fiziološke vrijednosti.

Koncentracije VIP-a u serumu CD26 deficijernih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama grafički su prikazane na slici 50.

Slika 50. Koncentracije vazoaktivnog intestinalnog peptida u serumu

CD26 deficijernih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa

u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja s induciranim kolitisom) odnosno etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Analizom dobivenih vrijednosti koncentracija VIP-a u serumu CD26 deficijernih životinja uočen je sličan, ali naglašeniji trend porasta koncentracije kao u C57BL/6 životinja. Naime, u CD26 deficijernih životinja također je uočen najveći porast koncentracije VIP-a u serumu drugog dana od indukcije kolitisa. Ova se vrijednost statistički značajno razlikuje ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu. Vrijednosti koncentracije VIP-a u serumu CD26 deficijernih životinja statistički su značajno povišene ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine i sedmog dana od indukcije kolitisa, no počinju poprimati niže vrijednosti. Petnaestog i tridesetog

dana nakon aplikacije otopine TNBS-a u etanolu vrijednosti koncentracija VIP-a u serumu poprimaju gotovo fiziološke vrijednosti.

Usporedba koncentracija VIP-a u serumu C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa prikazana je na slici 51.

Slika 51. Usporedba promjena koncentracija vazoaktivnog intestinalnog peptida u serumu C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

(Dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu

(skupine životinja kojima je induciran kolitis)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja

b, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Analizom dobivenih rezultata utvrđeno je da je povećanje koncentracije VIP-a u serumu CD26 deficijernih životinja izraženije. Za razliku od C57BL/6 životinja, statistički značajno više ($p < 0,05$) koncentracije VIP-a u cirkulaciji zadržavaju se i sedmog dana od indukcije kolitisa.

4.2.1.3. Koncentracije interleukina u serumu pokusnih životinja

Koncentracije interleukina 6 i interleukina 10 u serumu određivane su u skupinama C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja imunoenzimskim testovima.

4.2.1.3.1. Serumske koncentracije interleukina-6

Koncentracije IL-6 određene su u serumu C57BL/6 i CD26 deficijntnih životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina. Ove su skupine ujedno predstavljale i kontrolne skupine onim skupinama pokusnih životinja kojima je induciran kolitis. Statističkom analizom dobivenih vrijednosti koncentracija IL-6 u serumu pokusnih životinja pojedinog soja utvrđena je statistički viša ($p < 0,05$) koncentracija IL-6 u serumu CD26 deficijntnih životinja. Slika 52 prikazuje usporedbe fizioloških vrijednosti koncentracija IL-6 u serumu pokusnih životinja u sojevima C57BL/6 i CD26 deficijntnih miševa.

Slika 52. Usporedba fizioloških vrijednosti serumske koncentracije interleukina-6 u skupinama C57BL/6 i CD26 deficijntnih miševa.

(Dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda: a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficijntnih životinja

Slika 53 grafički prikazuje usporedbu promjena koncentracija IL-6 u serumu C57BL/6 i CD26 deficijntnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

Slika 53. Usporedba promjene koncentracija interleukina-6 u serumu C57BL/6 i CD26 deficijntnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

(Dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a (skupine životinja s induciranim kolitisom)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficijntnih životinja

b, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Drugog dana od aplikacije otopine TNBS-a, kada je aktivnost bolesti najveća, vidljiv je izraziti porast vrijednosti serumske koncentracije IL-6, statistički značajan ($p < 0,001$) u oba soja pokusnih životinja. Porast je izraženiji kod skupine CD26 deficijentnih životinja. Sedmog dana od aplikacije otopine TNBS-a u CD26 deficijentnih životinja dolazi do normalizacije vrijednosti serumskih koncentracija IL-6, dok kod C57BL/6 životinja vrijednosti padaju ispod fizioloških koncentracija (statistička značajna razlika, $p < 0,05$). Petnaestog i tridesetog dana od aplikacije otopine TNBS-a vrijednosti se ne razlikuju statistički značajno od fizioloških vrijednosti u oba soja pokusnih životinja.

4.2.1.3.2. Serumske koncentracije interleukina-10

Koncentracije IL-10 određivane su u serumu C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa. Skupine pokusnih životinja soja kojima je aplicirana fiziološka otopina ujedno su predstavljale i kontrolne skupine onim skupinama pokusnih životinja kojima je induciran kolitis. Statističkom analizom dobivenih vrijednosti koncentracija IL-10 u serumu pokusnih životinja pojedinog soja utvrđena je statistički značajno viša ($p < 0,05$) koncentracija u serumu CD26 deficijentnih životinja.

Slika 54 prikazuje usporedbe fizioloških vrijednosti koncentracija IL-10 u serumu pokusnih životinja u C57BL/6 i CD26 deficijentnim miševa.

Slika 54. Usporedba fizioloških vrijednosti serumske koncentracije interleukina-10 u skupinama C57BL/6 i CD26 deficitnih miševa.

(Dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda: a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficitnih životinja

Slika 55 prikazuje usporedbu promjena koncentracija IL-10 u serumu C57BL/6 i CD26 deficitnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

Slika 55. Usporedba promjene koncentracija interleukina-10 u serumu C57BL/6 i CD26 deficitnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

(Dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a (skupine životinja s induciranim kolitisom)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficitnih životinja

b, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

4.2.2 Rezultati istraživanja na lokalnoj razini

Istraživanja na lokalnoj razini obuhvatila su analize ranije opisanih parametara u mozgu i debelom crijevu svih skupina pokusnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u C57BL/6 i CD26 deficitnim životinjama, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

4.2.2.1. Imunobiokemijska istraživanja u mozgu

4.2.2.1.1. Enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u mozgu

Slika 56 prikazuje promjene aktivnosti DPP IV/CD26 u mozgu C57BL/6 soja životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

Slika 56. Enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u mozgu C57BL/6 životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno otopine etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Analizom dobivenih rezultata vrijednosti enzimske aktivnosti DPP IV/CD26 u mozgu zapaženo je da aplikacija otopine etanola ne uzrokuje statistički značajne promjene u aktivnosti ovog enzima. Zapaženo je međutim da se aktivnost DPP IV/CD26 smanjuje drugog i sedmog dana od indukcije kolitisa u odnosu na kontrolne skupine. Statističkom analizom utvrđeno je da je ovo smanjenje statistički značajno ($p < 0,05$).

4.2.2.1.2. Enzimska aktivnost DPP IV/CD26-sličnih enzima u mozgu

Slika 57 grafički prikazuje dobivene vrijednosti aktivnosti DPP IV/CD26-sličnih enzima u mozgu CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

Slika 57. Enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u mozgu CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Skala je prilagođena niskim vrijednostima enzimске aktivnosti

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno otopine etanola (kontrolne skupine)

Skala je prilagođena niskim vrijednostima enzimске aktivnosti

Analizom dobivenih rezultata vrijednosti enzimске aktivnosti DPP IV/CD26-sličnih enzima u CD26 deficijentnih životinja, zapaženo je da ni aplikacija otopine etanola ni aplikacija otopine TNBS-a u etanolu ne uzrokuju statistički značajne promjene u enzimskoj aktivnosti u mozgu.

Slika 58 prikazuje usporedbu enzimске aktivnosti DPP IV/CD26 i DPP IV/CD26-sličnih enzima u mozgu tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, u oba soja miševa. Analizom dobivenih rezultata utvrđeno je da svega 1,33% ukupne DPP IV/CD26 enzimске aktivnosti u mozgu otpada na aktivnost DPP IV/CD26-sličnih enzima.

Slika 58. Usporedba enzimске aktivnosti DPP IV/CD26 u mozgu C57BL/6 životinja te enzimске aktivnosti DPP IV/CD26-sličnih enzima u mozgu CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno otopine etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,001$) između C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja

b, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

4.2.2.1.3. Proteinski izražaj molekule CD26 u mozgu

Slika 59 prikazuje bendove detektirane tehnikom *Western blota*, a pokazuju proteinski izražaj molekule CD26 u mozgu C57BL/6 soja životinja prilikom razvoja i cijeljenja kolitisa. Kod CD26 deficijernih miševa, kao što je i očekivano, nije pronađen proteinski izražaj molekule CD26. Kontrolu jednolikog nanosa istovjetne koncentracije ukupnih proteina predstavlja signal detektiran za β -aktin.

Slika 59. Proteinski izražaj molekule CD26 i β -aktina u mozgu C57BL/6 životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis)

Analizom fotoluminiscentnih signala detektiranih fotosenzibilnim filmovima nakon provedene tehnike *Western blota*, uočeni su bendovi koji predstavljaju izražaj molekule CD26 u području relativne molekulske mase 110 kDa. Kontrola jednolikog nanosa proteina, signal detektiran za β -aktin, detektiran je u području relativne molekulske mase

42 kDa. Iz dobivenih je rezultata vidljivo da proteinski izražaj molekule CD26 u mozgu, za razliku od njegove enzimske aktivnosti, tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa ostaje konstantan.

4.2.2.1.4. Koncentracije neuropeptida u mozgu

Koncentracije NPY-a i VIP-a određivane su u ekstraktima proteina tkiva mozga C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja odgovarajućim imunoenzimskim testovima. Dobiveni rezultati izraženi su kao pikogrami neuropeptida po miligramu ukupnih proteina (pg/mg proteina).

4.2.2.1.4.1. Koncentracije neuropeptida Y

Slika 60 prikazuje usporedbu koncentracija NPY-a u mozgu u kontrolnim skupinama oba soja miša. Statističkom analizom dobivenih rezultata nije utvrđena statistički značajna razlika u sadržaju NPY-a između C57BL/6 i CD26 deficijernih miševa. Nadalje, utvrđeno je da aplikacija etanola ne uzrokuje statistički značajne promjene u sadržaju NPY-a u mozgu oba soja miševa.

Slika 60. Usporedba vrijednosti koncentracije neuropeptida Y u mozgu pokusnih

životinja kontrolnih skupina C57BL/6 i CD26 deficijernih sojeva miševa.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine etanola (kontrolne skupine)

Slika 61 prikazuje koncentracije NPY-a u mozgu pokusnih životinja C57BL/6 soja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

Slika 61. Koncentracije neuropeptida Y u mozgu C57BL/6 životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno otopine etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Iz grafičkog prikaza promjene koncentracija NPY u mozgu C57BL/6 životinja vidljiv je značajan porast drugog dana od indukcije kolitisa. Statističkom analizom dobivenih rezultata utvrđeno je da je ovaj porast statistički značajan ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Potom vrijednosti koncentracije NPY-a u mozgu značajno opadaju, petnaestog dana i statistički značajno ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Tridesetog dana od indukcije kolitisa koncentracije NPY-a poprimaju fiziološke vrijednosti.

Slika 62 prikazuje koncentracije NPY u mozgu CD26 deficijentnih pokusnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

Slika 62. Koncentracije neuropeptida Y u mozgu CD26 deficitiranih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno otopine etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Analizom dobivenih rezultata zapaženo je da u mozgu CD26 deficitiranih miševa dolazi do statistički značajnog ($p < 0,05$) sniženja koncentracije NPY-a drugog i sedmog dana od indukcije kolitisa u odnosu na kontrolnu skupinu.

Usporedba koncentracija NPY u mozgu skupinama C57BL/6 i CD26 deficitiranih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa prikazana je na slici 63.

Slika 63. Usporedba koncentracija neuropeptida Y u mozgu C57BL/6 i CD26 deficitiranih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficitiranih životinja

Analizom dobivenih rezultata uočio se različiti trend promjene koncentracije NPY-a u proteinskim ekstraktima mozga u ispitivanim sojevima životinja. Statističkom analizom dobivenih rezultata utvrđene su statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u koncentraciji NPY-a u mozgu drugog, petnaestog i tridesetog dana od indukcije kolitisa.

4.2.2.1.4.2. Proteinski izražaj neuropeptida Y

Slika 64 prikazuje bendove detektirane tehnikom *Western blota*, a prikazuju izražaj NPY-a u mozgu CD26 deficijentnog soja životinja prilikom razvoja i cijeljenja kolitisa. Kontrolu jednolikog nanosa istovjetne koncentracije ukupnih proteina predstavlja signal detektiran za β -aktin.

Slika 64. Proteinski izražaj neuropeptida Y i β -aktina u mozgu CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis)

Analizom fotoluminiscentnih signala detektiranih fotosenzibilnim filmovima nakon provedene tehnike *Western blota*, uočeni su bendovi koji predstavljaju proteinski izražaj molekule NPY, u području relativne molekulske mase 4,7 kDa. Kontrola jednolikog nanosa ukupne koncentracije proteina, signal detektiran za β -aktin, uočen je u području relativne molekulske mase 42 kDa. Iz dobivenih je rezultata vidljivo da se proteinski izražaj molekule NPY u mozgu CD26 deficijentnih životinja smanjuje drugog i sedmog dana od indukcije kolitisa, što slijedi rezultate dobivene imunoenzimskim testom.

4.2.2.1.4.3. Koncentracije vazoaktivnog intestinalnog peptida

Koncentracije VIP-a određivane su u mozgovima pokusnih životinja C57BL/6 i CD26 deficijernih miševa i izražene kao nanogrami po miligramu ukupnih proteina. Slika 65 prikazuje usporedbu koncentracija VIP-a u mozgu u kontrolnim skupinama oba soja miša. Statističkom analizom dobivenih rezultata nije utvrđena statistički značajna razlika u sadržaju VIP-a između pojedinih sojeva miševa.

Slika 65. Usporedba vrijednosti koncentracije vazoaktivnog intestinalnog peptida u mozgu pokusnih životinja kontrolnih skupina C57BL/6 i CD26 deficijernih sojeva miševa.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine etanola (kontrolne skupine životinja)

Slika 66 prikazuje koncentracije VIP-a u mozgu pokusnih životinja C57BL/6 soja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

Slika 66. Koncentracije vazoaktivnog intestinalnog peptida u mozgu C57BL/6 životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno otopine etanola (kontrolne skupine)
a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Na slici 67 prikazane su koncentracije VIP-a u mozgu CD26 deficijentnih pokusnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

Slika 67. Koncentracije vazoaktivnog intestinalnog peptida u mozgu CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina
2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno otopine etanola (kontrolne skupine)
a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Usporedba koncentracija VIP-a u mozgu C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa prikazane su na slici 68. Statističkom obradom dobivenih rezultata utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između sadržaja VIP-a u mozgu između ispitivanih sojeva drugog dana od aplikacije otopine TNBS-a, danu kada je aktivnost bolesti najveća.

Slika 68. Usporedba koncentracija vazoaktivnog intestinalnog peptida u mozgu C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a (skupine životinja kojima je induciran kolitis)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja

4.2.2.1.4.4. Proteinski izražaj vazoaktivnog intestinalnog peptida

Slika 69 prikazuje bendove detektirane tehnikom *Western blota*, a prikazuju proteinski izražaj VIP-a u mozgu C57BL/6 soja životinja prilikom razvoja i cijeljenja kolitisa. Kontrolu jednolikog nanosa istovjetne koncentracije ukupnih proteina predstavlja signal detektiran za β -aktin.

Slika 69. Proteinski izražaj vazoaktivnog intestinalnog peptida i β -aktina u mozgu C57BL/6 soja životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis)

Analizom fotoluminiscentnih signala detektiranih fotosenzibilnim filmovima nakon provedene tehnike *Western blota*, uočeni su bendovi koji predstavljaju proteinski izražaj molekule VIP-a. Proteinski izražaj molekule VIP-a određuje se putem određivanja proteinskog izražaja prekursora, molekule pre-pro-VIP-a u području relativne molekulske mase 21 kDa. Kontrola jednolikog nanosa proteina, signal detektiran za β -aktin, utvrđen je u području relativne molekulske mase 42 kDa. Iz dobivenih je rezultata vidljivo da se proteinski izražaj molekule VIP-a u mozgu povećava drugog dana od indukcije kolitisa, što slijedi rezultate dobivene imunoenzimskim testom.

4.2.2.1.5. Koncentracije interleukina u mozgu

Koncentracije IL-6 i IL-10 određivane su u različitim skupinama C57BL/6 i CD26 deficitarnih miševa. Vrijednosti IL-6 i IL-10 u pojedinoj skupini izražene su kao srednja vrijednost u pikogramima po miligramu ukupnih proteina (pg/mg proteina).

4.2.2.1.5.1. Koncentracije interleukina-6

Na slici 70 prikazana je usporedba fizioloških vrijednosti koncentracije IL-6 u mozgu C57BL/6 i CD26 deficitarnih životinja.

Slika 70. Usporedba fizioloških vrijednosti koncentracije interleukina-6

u mozgu u skupinama C57BL/6 i CD26 deficitarnih miševa.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficitarnih životinja

Iz dobivenih rezultata može se utvrditi da CD26 deficijenti miševi u odnosu na C57BL/6 soj životinja imaju višu koncentraciju IL-6 u mozgu u fiziološkim uvjetima. Statističkom analizom dobivenih rezultata utvrđeno je da je ova razlika statistički značajna ($p < 0,05$).

Slika 71 prikazuje koncentracije IL-6 u mozgu C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

Slika 71. Usporedba promjene koncentracija interleukina-6 u mozgu C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

(Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a (skupine životinja s induciranim kolitisom)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja

b, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Drugi dan od aplikacije TNBS dolazi do povišenja koncentracija IL-6 u mozgu oba soja životinja, za prosječno 125,2% kod C57BL/6 te za prosječno 71,8% kod CD26 deficijentnih životinja. Vrijednosti ovih koncentracija razlikuju se statistički značajno u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine ($p < 0,05$). Obzirom da je koncentracija IL-6 fiziološki nešto viša kod CD26 deficijentnih životinja, a porast koncentracije IL-6 drugog dana od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu u C57BL/6 životinja veći, dobivene se vrijednosti ne razlikuju statistički značajno međusobno.

Sedmog dana od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu kod skupine CD26 deficijentnih miševa dolazi do statistički značajnog sniženja vrijednosti koncentracija IL-6 u mozgu, čak ispod fizioloških vrijednosti koncentracija. Ovo je smanjenje koncentracije statistički značajno različito ($p < 0,05$) i u odnosu na fiziološke vrijednosti koncentracije i u odnosu na koncentracije izmjerene drugog dana nakon aplikacije otopine TNBS-a u etanolu. Koncentracija IL-6 također se snižuje i kod C57BL/6 soja miša ali ne zamijećuje se trend kao i kod CD26 deficijentnih životinja. Vrijednosti koncentracija IL-6 u mozgu sedmog dana od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu statistički se značajno razlikuju između dvaju sojeva ($p < 0,05$) dok petnaestog dana nema statistički značajnih razlika. Tridesetog dana vrijednosti koncentracija IL-6 u mozgu oba soja miša vraćaju se na fiziološke vrijednosti.

4.2.2.1.5.2. Koncentracije interleukina-10

Slika 72. prikazuje usporedbu fizioloških vrijednosti koncentracije IL-10 u mozgu C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja.

Slika 72. Usporedba fizioloških vrijednosti koncentracije interleukina-10

u mozgu u skupinama C57BL/6 i CD26 deficijentnih miševa.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Statističkom analizom dobivenih rezultata nije utvrđena statistički značajna razlika u sadržaju IL-10 u mozgu između skupina C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja u fiziološkim uvjetima.

Rezultati određivanja koncentracije IL-10 u mozgu C57BL/6 u usporedbi s CD26 deficijntnim životinjama tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa prikazani su na slici 73.

Slika 73. Usporedba promjene koncentracija interleukina-10 u mozgu C57BL/6 i CD26 deficijntnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

(Dobivene vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 – kontrolna skupina, skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a (skupine životinja s induciranim kolitisom)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficijntnih životinja

b, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Iz dobivenih je rezultata vidljivo da su promjene IL-10 u mozgu tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa izraženije u skupinama C57BL/6 životinja. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) prilikom smanjenja koncentracije IL-10 u mozgu utvrđene su drugog i sedmog dana od uspostave kolitisa, u odnosu na CD26 deficijntne životinje.

4.2.2.2. Imunobiokemijska istraživanja u debelom crijevu

4.2.2.2.1. Enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u debelom crijevu

Enzimska aktivnost intestinalne DPP IV/CD26 određivana je u svim skupinama C57BL/6 životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa a rezultati su grafički prikazani na slici 74.

Slika 74. Enzimsko aktivnost DPP IV/CD26 u debelom crijevu C57BL/6 životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u usporedbi s kontrolnom skupinom.

(Dobivene vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno otopine etanola (kontrolna skupina)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Enzimsko aktivnost DPP IV/CD26 u debelom crijevu C57BL/6 životinja statistički je značajno snižena ($p < 0,05$) drugog, sedmog i petnaestog dana od indukcije kolitisa u usporedbi s kontrolnim skupinama.

4.2.2.2. Enzimsko aktivnost DPP IV/CD26-sličnih enzima u debelom crijevu

Enzimsko aktivnosti DPP IV/CD26-sličnih enzima u debelom crijevu određivana je u svim skupinama CD26 deficijskih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa. Dobiveni rezultati grafički su prikazani na slici 75.

Slika 75. Enzimsko aktivnost DPP IV/CD26-sličnih enzima u debelom crijevu CD26 deficijskih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u usporedbi s kontrolnom skupinom.

(Dobivene vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno otopine etanola (kontrolna skupina)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Skala je prilagođena niskim vrijednostima enzimске aktivnosti

Statističkom analizom dobivenih rezultata utvrđeno je statistički značajno sniženje ($p < 0,05$) enzimске aktivnosti DPP IV-CD26 sličnih enzima drugog, sedmog i petnaestog dana od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine. Tridesetog se dana vrijednosti normaliziraju i poprimaju gotovo fiziološke vrijednosti.

Slika 76 grafički prikazuje usporedbu vrijednosti DPP IV/CD26 i DPP IV/CD26-sličnih enzima u skupinama C57BL/6 i CD26 deficijentnih miševa. Analizom dobivenih rezultata utvrđeno je da svega 1,46% ukupne DPP IV/CD26 aktivnosti potječe od aktivnosti DPP IV/CD26-sličnih enzima.

Slika 76. Usporedba enzimске aktivnosti DPP IV/CD26 u debelom crijevu C57BL/6 životinja te enzimске aktivnost DPP IV/CD26-sličnih enzima u debelom crijevu CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobivene vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno otopine etanola (kontrola)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,001$ i $p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficitarnih životinja

b, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

4.2.2.2.3. Proteinski izražaj molekule CD26 u debelom crijevu

Slika 77 prikazuje bendove detektirane tehnikom *Western blota*, a prikazuju proteinski izražaj molekule CD26 u debelom crijevu C57BL/6 soja životinja prilikom razvoja i cijeljenja kolitisa. Kod CD26 deficitarnih miševa, kao što je i očekivano, nije pronađen proteinski izražaj molekule CD26. Kontrolu jednolikog nanosa istovjetne koncentracije ukupnih proteina predstavlja signal detektiran za β -aktin.

Slika 77. Proteinski izražaj molekule CD26 i β -aktina u debelom crijevu C57BL/6 soja životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis)

Analizom fotoluminiscentnih signala detektiranih fotosenzibilnim filmovima nakon provedene tehnike *Western blota*, uočeni su bendovi koji predstavljaju proteinski izražaj molekule CD26 u području relativne molekulske mase 110 kDa. Kontrola jednolikog nanosa proteina, signal detektiran za β -aktin, utvrđen je u području relativne molekulske mase 42 kDa. Iz dobivenih je rezultata vidljiv porast u proteinskom izražaju molekule CD26 u debelom crijevu drugog i sedmog dana od indukcije kolitisa.

4.2.2.2.4. Koncentracije neuropeptida u debelom crijevu

Koncentracije NPY-a i VIP-a određivane su u svim skupinama C57/BL/6 i CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

4.2.2.2.4.1. Koncentracije neuropeptida Y

Koncentracije NPY određivane su u debelom crijevu pokusnih životinja C57BL/6 i CD26 deficijentnih miševa i izražene kao nanogrami po miligramu ukupnih proteina. Slika 78 prikazuje usporedbu koncentracija NPY u mozgu u kontrolnim skupinama oba soja miša.

Slika 78. Usporedba koncentracija neuropeptida Y u kontrolnim skupinama

C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja.

(Dobivene vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine etanola

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja

b, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću skupinu kojoj je aplicirana fiziološka otopina

Statističkom analizom dobivenih podataka utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u fiziološkim koncentracijama NPY-a u debelom crijevu između ispitivanih sojeva miševa. Međutim, drugog dana od aplikacije otopine etanola, u skupini CD26 deficijentnih životinja dolazi do blagog povišenja koncentracije NPY-a u debelom crijevu,

koje je ipak statistički značajno ($p=0,044$) u odnosu na fiziološku koncentraciju NPY-a i u fiziološkim uvjetima istog soja miša, i istog dana u C57BL/6 soju miša.

Na slici 79 prikazane su promjene koncentracije NPY-a tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u skupini C57BL/6 životinja, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

Slika 79. Koncentracije neuropeptida Y u debelom crijevu C57BL/6 životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.
(Dobivene vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis)

a, statistički značajna razlika ($p<0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Analizom dobivenih rezultata utvrđena su statistički značajna povišenja ($p<0,05$) koncentracije NPY-a u debelom crijevu drugog i sedmog dana od indukcije kolitisa u C57BL/6 životinjama, u odnosu na kontrolne skupine.

Slika 80 prikazuje promjene vrijednosti NPY-a u debelom crijevu CD26 deficijernih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

Slika 80. Koncentracije neuropeptida Y u debelom crijevu
CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa
u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobivene vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Na slici 81 prikazana je usporedba koncentracija NPY-a u debelom crijevu C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

Slika 81. Usporedba koncentracija neuropeptida Y u debelom crijevu C57BL/6 i CD26
deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

(Dobivene vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja

Usporedbom dobivenih rezultata koncentracija NPY-a u debelom crijevu u ispitivanim sojevima pokusnih životinja, utvrđen je sličan trend promjene koncentracija istraživanog neuropeptida. Međutim, porast koncentracije NPY-a u debelom crijevu izraženiji je u C57BL/6 životinja tijekom razvoja kolitisa. Utvrđene su statistički značajno više ($p < 0,05$) koncentracije NPY-a u debelom crijevu C57BL/6 životinja drugog i sedmog dana od indukcije kolitisa, u odnosu na CD26 deficitarne životinje.

4.2.2.2.4.2. Proteinski izražaj neuropeptida Y

Slika 82 prikazuje bendove detektirane tehnikom *Western blota*, a prikazuju proteinski izražaj NPY-a u debelom crijevu C57BL/6 soja životinja prilikom razvoja i cijeljenja kolitisa. Kontrolu jednolikog nanosa istovjetne koncentracije ukupnih proteina predstavlja signal detektiran za β -aktin.

Slika 82. Proteinski izražaj neuropeptida Y i β -aktina u debelom crijevu C57BL/6 soja životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis)

Analizom fotoluminiscentnih signala detektiranih fotosenzibilnim filmovima nakon provedene tehnike *Western blota*, uočeni su bendovi koji predstavljaju proteinski izražaj molekule NPY u području relativne molekulske mase 4,7 kDa. Kontrola jednolikog nanosa proteina, signal detektiran za β -aktin, detektiran je u području relativne molekulske mase 42 kDa. Iz dobivenih je rezultata vidljivo da se proteinski izražaj

molekule NPY u debelom crijevu C57BL/6 soja životinja povećava drugog i sedmog dana od indukcije kolitisa, što slijedi rezultate dobivene imunoenzimskim testom.

Slika 83 prikazuje bendove detektirane tehnikom *Western blota*, a prikazuju proteinski izražaj NPY-a u debelom crijevu CD26 deficijentnog soja životinja prilikom razvoja i cijeljenja kolitisa. Kontrolu jednolikog nanosa istovjetne koncentracije ukupnih proteina predstavlja signal detektiran za β -aktin

Slika 83. Proteinski izražaj neuropeptida Y i β -aktina u debelom crijevu CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis)

Analizom fotoluminiscentnih signala detektiranih fotosenzibilnim filmovima nakon provedene tehnike *Western blota*, uočeni su bendovi koji predstavljaju proteinski izražaj molekule NPY u području relativne molekulske mase 4,7 kDa. Kontrola jednolikog nanosa proteina, signal detektiran za β -aktin, utvrđen je u području relativne molekulske mase 42 kDa. Iz dobivenih je rezultata vidljivo da se proteinski izražaj molekule NPY u debelom crijevu CD26 deficijentnih životinja povisuje drugog dana od indukcije kolitisa, što slijedi rezultate dobivene imunoenzimskim testom.

4.2.2.2.4.3. Koncentracije vazoaktivnog intestinalnog peptida

Koncentracije VIP-a određivane su u debelom crijevu C57BL/6 i CD26 deficijentnih miševa i izražene kao nanogrami po miligramu ukupnih proteina.

Slika 84 prikazuje usporedbu koncentracija VIP-a u debelom crijevu u kontrolnim skupinama oba soja miša. Statističkom analizom dobivenih rezultata nije utvrđena statistički značajna razlika u sadržaju VIP-a između pojedinih sojeva miševa.

Slika 84. Usporedba vrijednosti koncentracije vazoaktivnog intestinalnog peptida u debelom crijevu pokusnih životinja

kontrolnih skupina C57BL/6 i CD26 deficijentnih sojeva miševa.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine etanola (kontrolne skupine)

Na slijedećoj slici prikazane su dobivene vrijednosti koncentracija VIP-a u debelom crijevu C57BL/6 životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

Slika 85. Koncentracije vazoaktivnog intestinalnog peptida u debelom crijevu C57BL/6 životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa,

u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis) odnosno otopine etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Analizom dobivenih podataka utvrđeno je statistički značajno povišenje ($p < 0,05$) koncentracije VIP-a u ekstraktima debelog crijeva C57BL/6 životinja u akutnoj fazi kolitisa, u odnosu na kontrolnu skupinu.

Slika 86 prikazuje koncentracije VIP-a u debelom crijevu CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

Slika 86. Koncentracije vazoaktivnog intestinalnog peptida u debelom crijevu CD26

deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa,

u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis), odnosno otopine etanola (kontrolne skupine)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

Analizom dobivenih vrijednosti utvrđeno je statistički značajno povišenje ($p < 0,05$) koncentracije VIP-a u ekstraktima debelog crijeva CD26 deficijernih životinja u akutnoj fazi kolitisa u odnosu na kontrolnu skupinu. Vrijednosti VIP-a ostaju statistički značajno povišene i sedmog dana od indukcije kolitisa, za razliku od C57BL/6 skupine životinja.

Usporedba promjena koncentracija VIP-a u debelom crijevu C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa prikazana je na slici 87.

Slika 87. Usporedba koncentracija vazoaktivnog intestinalnog peptida u debelom crijevu C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu

b, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja

Analizom dobivenih rezultata uočeno je da promjene koncentracije VIP-a u debelom crijevu oba ispitivana soja miševa slijede isti trend, s naglašenim porastom koncentracije drugog dana od indukcije kolitisa, statistički značajnim ($p < 0,05$) u odnosu na fiziološke koncentracije za oba soja pokusnih životinja. Ovaj je porast izrazitiji kod CD26 deficijernih životinja pa je u akutnom razdoblju kolitisa, drugog dana od indukcije, razlika između koncentracije VIP-a u debelom crijevu C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja statistički značajna ($p < 0,05$).

4.2.2.2.4.4. Proteinski izražaj vazoaktivnog intestinalnog peptida

Slika 88 prikazuje bendove detektirane tehnikom *Western blota*, a prikazuju proteinski izražaj VIP-a u debelom crijevu CD26 deficijentnog soja životinja prilikom razvoja i cijeljenja kolitisa. Kontrolu jednolikog nanosa istovjetne koncentracije ukupnih proteina predstavlja signal detektiran za β -aktin.

Slika 88. Proteinski izražaj vazoaktivnog intestinalnog peptida i β -aktina u debelom crijevu CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis)

Analizom fotoluminiscentnih signala detektiranih fotosenzibilnim filmovima nakon provedene tehnike *Western blota*, uočeni su bendovi koji predstavljaju proteinski izražaj molekule VIP-a u području relativne molekulske mase 21 kDa. Proteinski izražaj molekule VIP-a određuje se putem određivanja proteinskog izražaja prekursora, molekule pre-pro-VIP-a (21 kDa). Kontrola jednolikog nanosa ukupnih proteina, signal detektiran za β -aktin, utvrđen je u području relativne molekulske mase 42 kDa. Iz dobivenih je rezultata vidljivo da se proteinski izražaj molekule VIP-a u debelom crijevu CD26 deficijentnih životinja povisuje drugog dana od indukcije kolitisa, što potvrđuje rezultate dobivene imunoenzimskim testom.

4.2.2.2.5. Koncentracije interleukina u debelom crijevu

Koncentracije IL-6 i IL-10 određivane su u proteinskim ekstraktima tkiva debelog crijeva C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja.

4.2.2.2.5.1. Koncentracije interleukina-6

Na slici 89 prikazana je usporedba fizioloških vrijednosti koncentracije IL-6 u debelom crijevu C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja. Dobivene vrijednosti predstavljaju kontrolne skupine za odgovarajući soj pokusnih životinja.

Slika 89. Usporedba fizioloških vrijednosti koncentracije interleukina-6

u debelom crijevu u skupinama C57BL/6 i CD26 deficijernih miševa.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Statističkom analizom dobivenih rezultata nije utvrđena statistički značajna razlika u sadržaju IL-6 u debelom crijevu između skupina C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja u fiziološkim uvjetima.

Slika 90 prikazuje usporedbu vrijednosti koncentracija IL-6 u tkivu debelog crijeva u C57BL/6 i CD26 deficijernih životinja. Utvrđeno je statistički značajno povišenje ($p < 0,05$) koncentracije IL-6 drugog dana nakon aplikacije otopine TNBS-a u etanolu u oba soja laboratorijskih miševa. Iako je koncentracija u CD26 deficijernih miševa u akutnoj fazi kolitisa nešto viša u odnosu na vrijednosti izmjerene u tkivu debelog crijeva C57BL/6 životinja, ova razlika nije statistički značajna.

Slika 90. Usporedba koncentracija interleukina-6 u debelom crijevu C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine životinja kojima je induciran kolitis)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na fiziološku koncentraciju (CD26^{-/-} soj)

b, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na fiziološku koncentraciju (C57BL/6 soj)

4.2.2.2.5.2. Koncentracije interleukina-10

Na slici 91 prikazana je usporedba fizioloških vrijednosti koncentracije IL-10 u proteinskim ekstraktima tkiva debelog crijeva C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja.

Slika 91. Usporedba fizioloških vrijednosti koncentracije interleukina-10 u debelom crijevu u skupinama C57BL/6 i CD26 deficijentnih miševa.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Statističkom analizom dobivenih rezultata nije utvrđena statistički značajna razlika u sadržaju IL-10 u debelom crijevu između skupina C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja u fiziološkim uvjetima.

Vrijednosti izmjerenih koncentracija IL-10 u debelom crijevu C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja prikazane su na slici 92.

Slika 92. Usporedba koncentracija interleukina-10 u debelom crijevu C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

(Dobivene vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška.)

Legenda:

0 - kontrolna skupina; skupina životinja kojima je aplicirana fiziološka otopina

2, 7, 15, 30 – dani od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu (skupine pokusnih životinja kojima je induciran kolitis)

a, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između C57BL/6 i CD26 deficijentnog soja životinja za odgovarajući dan nakon aplikacije otopine TNBS-a u etanolu

b, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na fiziološku koncentraciju odgovarajućeg soja miševa

Statističkom analizom dobivenih rezultata utvrđeno je da kod CD26 deficijentnih miševa drugog dana od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu dolazi do statistički značajnog povišenja IL-10 u debelom crijevu. Ovo je povišenje statistički značajno različito u odnosu na fiziološke koncentracije ovog soja te u odnosu na vrijednosti IL-10 izmjerenih kod C57BL/6 životinja drugog dana od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu. Sedmog dana dolazi do sniženja koncentracije IL-10 u debelom crijevu oba soja životinja, koje je statistički značajno u odnosu na fiziološke vrijednosti kod C57BL/6 životinja, a kod CD26 deficijentnih se vraća gotovo na fiziološku vrijednost. Vrijednosti koncentracije IL-10 u debelom crijevu i sedmog se dana od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu razlikuju statistički značajno ($p < 0,05$). Petnaestog se dana vrijednosti IL-10

relativno normaliziraju, uz blago povišenje u odnosu na fiziološke koncentracije u debelom crijevu oba soja životinja i nerazlikuju se statistički značajno niti međusobno niti u odnosu na fiziološke koncentracije. Tridesetog dana od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu vrijednosti koncentracija IL-10 u debelom crijevu u potpunosti se normaliziraju i u C57BL/6 i u CD26 deficijentnih životinja.

5. Rasprava

Upalne bolesti crijeva uključuju nekoliko bolesti gastrointestinalnog sustava, koje su klinički karakterizirane rekurentnim upalnim procesima različitih segmenata probavnog kanala, najčešće tankog i debelog crijeva, kroničnog i nepredvidivog tijeka, često popraćene brojnim izvancrijevnim komplikacijama (13). Dva najvažnija patomorfološka entiteta upalnih bolesti crijeva jesu Crohnova bolest i ulcerozni kolitis. Riječ je o povezanim heterogenim kompleksnim poligenским poremećajima koji se razlikuju u lokalizaciji i prirodi upalnih promjena, imunopatološkim osnovama i kliničkim manifestacijama bolesti (21).

Unatoč opsežnim kliničkim, histološkim, endoskopskim, biokemijskim, mikrobiološkim, imunološkim i epidemiološkim istraživanjima, etiopatogeneza upalnih bolesti crijeva, kao i mehanizmi koji dovode do pojedinog patomorfološkog oblika bolesti, još uvijek ostaju nepoznati (74). Uvriježena je teorija da se upalne bolesti crijeva razvijaju kod genetski predisponiranih pojedinaca kao posljedica neadekvatnog, nereguliranog, odnosno pretjeranog imunosnog odgovora na određene, zasad još nerazjašnjene, antigene iz hrane ili pak bakterijske antigene u lumenu crijeva, pod utjecajem različitih čimbenika okoliša (25).

U rasvjetljavanju činjenica vezanih uz patogenezu upalnih bolesti crijeva vrlo značajan doprinos daju pokusni modeli bolesti. Pokusni modeli kolitisa prema kliničkim simptomima, histopatološkim i imunopatološkim promjenama uvelike nalikuju humanim upalnim bolestima crijeva. Zbog toga omogućavaju proučavanje ranih događanja vezanih uz pojavu i razvoj upalnih procesa, kao i njihovog cijeljenja (78).

Model TNBS-om induciranoг kolitisa u miša (TNBS-kolitis, Crohnovoj bolesti sličan kolitis, engl. *Crohn-like colitis*) predstavlja pokusni model upalne bolesti crijeva pri čemu dolazi do oštećenja epitelnih stanica, ulceracija i transmuralne upale koja je

uglavnom lokalizirana u području distalnog dijela kolona. Rektalna primjena otopine TNBS-a u etanolu uzrokuje kod pokusnih životinja primarno Th1 oblik imunskog odgovora, koji je specifičan za Crohnovu bolest u ljudi (80). Zbog velike sličnosti kliničkih, histoloških i imunskih karakteristika kod ljudi te reproducibilnosti u životinja, predstavlja pogodan pokusni model za proučavanje ranih događanja vezanih uz nastanak, razvoj i cijeljenje Crohnove bolesti (78, 80).

Istraživanja provedena u ovom radu bila su usmjerena upravo na mišji model Crohnovoj bolesti sličnog kolitisa (TNBS-kolitis, engl. *Crohn-like colitis*). Kako bi ispitali pretpostavke na kojima se temelji ovo istraživanje te istražili neuroimunomodulacijska svojstva DPP IV/CD26 tijekom razvoja i cijeljenja upalnih promjena, u istraživanje su bila uključena dva soja pokusnih životinja: miševi s genetskom deficijencijom molekule CD26 te divlji tip miša, C57BL/6 soj, iz kojeg su i dobivene genetski manipulirane životinje. Utišavanje molekule CD26 nema letalan ishod kod životinja, a CD26 deficijentne životinje naizgled su normalnog fenotipa i ne pokazuju značajnije razlike u uobičajenim fiziološkim procesima u odnosu na C57BL/6 životinje, što je i prethodno opisano u literaturi (208, 209). CD26 deficijentne životinje uključene u ovo istraživanje, u odnosu na C57BL/6 životinje istog spola i dobi imale su oko 10% nižu tjelesnu masu, a razlika je i statistički značajna ($p < 0,05$). Ova se pojava djelomično može pripisati i povećanom lučenju inzulina te rezistenciji na glukozu u CD26 deficijentnih životinja, što je prethodno opisano u literaturi (209). Nadalje, CD26 deficijentne životinje imaju i konstitutivno statistički značajno više ($p < 0,05$) hepatosomatske indekse u fiziološkim uvjetima u odnosu na C57BL/6 životinje. Omjeri mase slezene i tjelesne mase također su viši u CD26 deficijentnih životinja, ali ne i statistički značajno različito u odnosu na C57BL/6 životinje.

TNBS-kolitis u oba je soja pokusnih životinja induciran rektalnom, intraluminalnom aplikacijom otopine TNBS-a u etanolu, pod općom anestezijom. Etanol uzrokuje akutno oštećenje mukoze crijeva (engl. *barrier breaker*), što omogućuje prodiranje TNBS-a u dublje slojeve crijeva. Otopina TNBS-a snažan je iritans i kontaktni, senzibilizirajući alergen. Kao hapten veže se za molekule velike molekulske mase poput tkivnih proteina te posljedično izaziva akutni imunosni odgovor. U tkivu se može enzimatski i neenzimatski metabolizirati pri čemu nastaju kisik i vodikov peroksid. Reaktivni metaboliti kisika koji se stvaraju oksidativnim metabolizmom TNBS-a dovode do nastanka cijele kaskade upalnih reakcija koje naposljetku dovode do razvoja teške, transmuralne, granulomatozne upale s fokalnim žarištima (210). Prema dosadašnjim saznanjima, u dostupnoj literaturi ne postoji opis uspostave TNBS-kolitisa u CD26 deficijentnog soja miša.

Klinička manifestacija uspostavljenog kolitisa karakterizirana je generaliziranim lošim stanjem pokusnih životinja u akutnoj fazi bolesti, gubitkom težine od približno 15-20%, u odnosu na vrijednosti na dan aplikacije otopine TNBS-a u etanolu, stolicama promijenjene konzistencije ponekad sa sadržajem krvi te rektalnim krvarenjem u određenom broju životinja. Kod kontrolnih skupina životinja nisu zamijećeni ovi klinički simptomi a gubitak tjelesne težine, ukoliko je bio prisutan, bio je manji od 5% jedan dan nakon aplikacije fiziološke otopine odnosno otopine etanola. Ove eventualne promjene spadaju u uobičajene dnevne varijacije tjelesne težine a mogu se pripisati i postupku anesteziranja životinja.

Crohnova bolest u ljudi manifestira se kao kronični upalni proces, najčešće lokaliziran u terminalnom ileumu i kolonu, s karakterističnim transmuralnim, fistulirajućim, često granulomatoznim upalnim promjenama diskontinuiranog karaktera (4). Međutim, bolest se može pojaviti u bilo kojem dijelu probavnog kanala, čak u obliku ulceracija

lokaliziranih u usnoj šupljini, sve do upalnih promjena u perianalnom području (37). U mišjem modelu kolitisa uspostavljenom i istraživanom u ovom radu upalne su promjene lokalizirane u debelom crijevu životinja dok se u ostalim dijelovima probavnog kanala, zbog nemogućnosti dopiranja klizme koja sadrži otopinu TNBS-a u etanolu u više segmente crijeva, ne razvijaju upalne promjene (80), što je pokazano i ovim istraživanjem.

Tijekom razvoja kemijski induciranog TNBS-modela kolitisa u C57BL/6 i u CD26 deficijentnom soju životinja dolazi do kliničke manifestacije bolesti, statistički značajnih promjena tjelesne mase, mase jetre i slezene, makroskopskih, patohistoloških i histomorfometrijskih promjena debelog crijeva uz značajan porast mikroskopskog indeksa oštećenja. Temeljem utvrđenih statistički značajnih promjena kliničkih i histoloških parametara na lokalnoj i sistemske razini, Crohnovoj bolesti sličan kolitis u ovom je istraživanju uspostavljen u oba soja miša. Najjača klinička manifestacija bolesti u uspostavljenom modelu kolitisa zapažena je drugog dana od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu i opisana kao akutna faza kolitisa, što je u skladu s literaturom (80).

U akutnoj fazi kolitisa, u oba je soja miša zapaženo skraćivanje i zadebljanje kolona u odnosu na kontrolnu skupinu, s izmijenjenom konzistencijom stolice a često i zastoje u peristaltici crijeva. Makroskopski vidljive upalne promjene u kolonu lokaliziranog su, diskontinuiranog karaktera, ispreplitane područjima zdravog tkiva, što je također specifično za Crohnovu bolest. Moguće je zamijetiti tragove krvarenja i krvi u stolici. Sedmog dana od indukcije kolitisa moguće je zapaziti ožiljkaste promjene u sluznici kolona, no u većini slučajeva promjene su većinom uočljive mikroskopski. Skraćivanje crijeva još uvijek je prisutno u odnosu na fiziološke uvjete, ali manje naglašeno u odnosu na akutnu fazu bolesti. Petnaestog i tridesetog dana od indukcije

kolitisa nije više moguće makroskopski razaznati promjene u odnosu na fiziološke uvjete.

Razvoj upalnih promjena vrlo srodnih onima u oboljelih od Crohnove bolesti kod ljudi potvrđen je mikroskopskim analizama dobivenih preparata debelog crijeva pokusnih životinja. Histomorfometrijskom analizom tkivnih preparata debelog crijeva utvrđeno je statistički značajno smanjenje broja kripti debelog crijeva, uz povećanje njihove širine i smanjenje njihove dubine, uzrokovano aplikacijom otopine TNBS-a u etanolu. Promjene su zapažene u oba soja pokusnih životinja. Sterilna fiziološka otopina, kao ni otopina etanola, nisu izazivale značajnije promjene u histomorfometrijskim parametrima, kako u C57BL/6 tako ni u CD26 deficitarnim životinjama.

Makroskopske promjene debelog crijeva zapažene prilikom žrtvovanja pokusnih životinja u potpunosti su slijedile rezultate patohistoloških i histomorfometrijskih analiza. Štoviše, upalne promjene utvrđene su mikroskopskim analizama pripremljenih histoloških preparata i u onim slučajevima životinja kojima je induciran kolitis a kod kojih nije bilo značajnijih vidljivih makroskopskih manifestacija u debelom crijevu. Takve promjene nisu zapažene u kontrolnim skupinama životinja kojima su pod istim uvjetima aplicirane otopine etanola, odnosno fiziološke otopine, niti su uočene značajnije promjene u debelom crijevu patohistološkom analizom. Tridesetog dana od indukcije kolitisa u oba soja pokusnih životinja dolazi do potpune remisije upalnih promjena i cijeljenja sluznice debelog crijeva koja u većini slučajeva poprima karakteristični fiziološki izgled u histološkom smislu.

Patohistološkom analizom tkivnih preparata debelog crijeva najizrazitije promjene zapažaju se drugog dana od aplikacije otopine TNBS-a u etanolu, tj. u akutnoj fazi kolitisa. Kod oba soja pokusnih životinja može se uočiti djelom nekrotična sluznica, obilno prožeta neutrofilnim granulocitima kao i raspadnutim leukocitima, uz žarišna

krvarenja i nastanak nekrotičnog detritusa. Promjene ne zahvaćaju sluznicu cijelog lumena crijeva već na nekim mjestima postoji održani epitel uz normalni izgled kripti. U području podsluznice postoji izražen edem uz granulocitnu infiltraciju tkiva. Mogu se uočiti brojni eritrociti te nakupljanje fibrina. Infiltrati upalnih stanica nalaze se i u području oba sloja mišićnice.

Uočene su i patohistološke razlike između sojeva: kod CD26 deficijentnih miševa promjene ne zahvaćaju cijeli promjer crijeva već se radi o lokaliziranim ulceracijama. Upalne promjene lokaliziranog karaktera najčešće zahvaćaju površinske slojeve sluznice uz očuvani mišićni sloj, ali se kod manjeg broja životinja javlja i transmuralna upala uz širenje promjena i na mezenterij debelog crijeva. S druge strane, upalne promjene u debelom crijevu C57BL/6 životinja češće su difuzne te zahvaćaju cijelu cirkumferenciju crijeva, uz vrlo malo, ili bez očuvanih dijelova sluznice.

Navedene su specifične promjene i rezultat imunosnih međudjelovanja. Imunopatološke osnove Crohnove bolesti razlikuju se od ulceroznog kolitisa. Pretpostavljaju se dva oblika imunosnih promjena i procesa koji dovode do razvoja upalnih promjena u pojedinom entitetu. S jedne strane nalaze se upalne reakcije koje su započele pod utjecajem interleukina 12, a induciraju pomoćničke limfocite T Th1 imunosnog odgovora koji proizvode interferon γ (IFN- γ) te tumorski nekrotizirajući čimbenik α (TNF- α). S druge strane nalazimo Th2 stanični odgovor koji je induciran interleukinom 4 (25). Međutim, iako su na prvi pogled oprečni, ovi mehanizmi mogu naposljetku dovesti do zajedničkog efektorskog mehanizma (74).

Istraživanja provedena na modelima bolesti u životinja kojima su ciljno inaktivirani geni uključeni u imunosne funkcije, potvrdili su ove dvije navedene hipoteze. Daljnja histopatološka i imunološka istraživanja pokazala su da Th1-stanični upalni odgovor, koji uključuje stimulaciju makrofaga i prekomjerno izlučivanje interferona γ ,

dovodi do transmuralne upale slične Crohnovoj bolesti, dok Th-2 citokinski profil, karakteriziran prekomjernim lučenjem IL-4 inducira upalu sličnu ulceroznom kolitisu (211).

Optimalna zaštita organizma, kao i očuvanje zdravlja, rezultat je interakcije brojnih organskih sustava involviranih u održavanje homeostaze. Ponajviše možemo istaknuti neuroendokrini i imunosni sustav, kao dva osnovna regulacijska sustava organizma. Dugi niz godina promatrali su se kao dvije različite mreže sa specifičnim interakcijama unutar organizma ali i između organizma i okoliša. Zadnjih tridesetak godina zamijećuje se izravna interakcija neuroendokrinog i imunosnog sustava koja se očituje na nekoliko razina: 1. psihoneuroimunologija, kao dokaz interakcije između stresa i imunosnog odgovora, odnosno nastanka psihosomatskih oboljenja (212); 2. imunopsihijatrija, gdje nalazimo uzročno posljedičnu vezu između imunosnih nepravilnosti i psihijatrijskih oboljenja (211); 3. imunoneurologija, s utvrđenom povezanošću učinka imunosnih medijatora na funkciju stanica središnjeg živčanog sustava te 4. neuroimunomodulacija, kao vrlo aktualno područje istraživanja, s rastućim brojem dokaza o učinku živčanog sustava na imunosne funkcije organizma (213). Činjenice koje potkrepljuju i dokazuju usku povezanost neuroendokrinog i imunosnog sustava jesu lučenje istovjetnih neuroendokrinih hormona i neuropeptida te citokina i s neuroloških i s imunosnih stanica te izražaj istoznačnih receptora na površini istih a ponajviše uzajamna povezanost i međusobni učinci za koje je karakteristična povratna sprega (187).

Izraziti porast broja znanstvenih istraživanja u području neuroimunomodulacije potekao je iz ovih saznanja, što rezultira nepobitnim dokazima i sve uvriježenijem mišljenju o snažnoj povezanosti ovih sustava u organizmu gdje je teško povući granicu između pojedinih komponenti. U području gastroenterologije, vrlo obećavajuća su

saznanja dobivena istraživanjem interakcija neuroendokrinog i imunskog sustava. Posljednjih godina dobivena su saznanja da je neuroimunomodulacija vrlo značajna karika u autoimunosti i nastanku upale te da neurogena upala može biti uključena u patogenezu upalnih bolesti crijeva (172).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se upalni procesi koji se odvijaju na lokalnoj razini u debelom crijevu reflektiraju i u imunobiokemijskim parametrima u mozgu pokusnih životinja. Navedena je činjenica utvrđena za sve istraživane parametre obuhvaćene ovom studijom. Stoga, dobivenim je rezultatima pokazana i potvrđena važnost crijevno-mozgovne osi u patogenezi upalnih bolesti crijeva.

Dosadašnja su istraživanja ukazala da proteaze imaju važnu, ali još uvijek nedovoljno jasnu ulogu u patogenezi upalnih bolesti crijeva. Pokazano je da proteaze stanične površine imaju presudnu ulogu u razgradnji medijatora uključenih u održavanje integriteta sluznice kao i nastanak upalnih promjena (214). Zbog svojih specifičnih enzimskih svojstava te ujedno i sposobnosti kostimulacije limfocita T ali i uključenosti u kaskadne reakcije prijenosa signala u stanicu, jedna od vrlo važnih proteaza je i *dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV)*, odnosno molekula CD26 (DPP IV/CD26). CD26/DPP IV transmembranski je glikoprotein koji ima svojstva serinske proteaze. Molekula CD26 izražena je na površini epitelih stanica velikog broja tkiva, među kojima su i gastrointestinalni trakt i mozak. Izražena je također i na površini aktiviranih limfocita T, B, NK-stanica i makrofaga (122). Proteolitičkim cijepanjem, odnosno otpuštanjem membranski vezane DPP IV/CD26 nastaje topljivi oblik DPP IV koji cirkulira u serumu i ostalim biološkim tekućinama (168).

Dosadašnjim istraživanjima utvrđene su promijenjene vrijednosti aktivnosti i izražaja DPP IV/CD26 kod oboljelih od upalnih bolesti crijeva, koje koreliraju s jačinom i aktivnošću bolesti. Potvrđena je uključenost ove molekule u nastanku upalnih i

autoimunih promjena. Međutim, uloga DPP IV/CD26 u patogenezi upalnih bolesti crijeva nije poznata (86-88), te su nas stoga rezultati naših prijašnjih istraživanja, kao i dokazi o potencijalnoj ulozi DPP IV/CD26 u patogenezi upalnih bolesti crijeva i potaknuli da proširimo istraživanja i uspostavimo model bolesti u miša. Vođeni pretpostavkom da DPP IV/CD26 ostvaruje svoja modulacijska svojstva i putem svojih specifičnih supstrata te želeći pritom istražiti i dio neuroimunobiokemijske osnove bolesti gdje također vjerujemo da ova molekula ostvaruje svoju ulogu, fokusirali smo se na ciljane neuropeptide i interleukine istraživane u ovom radu.

Otkriven je velik broj biološki vrlo značajnih supstrata DPP IV/CD26, za koje je utvrđeno da sudjeluju u održavanju homeostaze i integriteta sluznice probavnog sustava kako u fiziološkim tako i u patološkim procesima pri razvoju upale. Među njima se nalaze neuropeptidi kao što su neuropeptid Y (NPY), vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), peptid YY (PYY), supstancija P, zatim glukagonu sličan peptid 1 i 2 (GLP-1 i GLP-2), kemokini i citokini poput IL-2, IL-6, IL-10, čimbenik nekroze tumora alfa (TNF- α) i drugi (104). Osim proteolitičke uloge, molekula CD26 vezivanjem s adenzin-deaminazom i molekulom CD45, ostvaruje svoju kostimulacijsku i signalnu ulogu, ponajviše na limfocitima. Postoje i saznanja da je molekula CD26 uključena u procese regulacije migracije limfocita T do mjesta upale u imunološki posredovanim bolestima (84).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju snižene sistemske vrijednosti aktivnosti serumske DPP IV/CD26 u skupinama pokusnih životinja C57BL/6 soja kojima je induciran kolitis. Ova su zapažanja u skladu s objavljenim rezultatima koja uključuju istraživanja na oboljelima od upalnih bolesti crijeva i životinjskim modelima ovih bolesti (86-88). Sniženje aktivnosti serumske DPP IV/CD26 u ovom istraživanju započinje drugog dana od uspostave kolitisa, zadržava statistički značajno snižene vrijednosti ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolne skupine kroz sedmi i petnaesti dan od uspostave

kolitisa, a na fiziološke se vrijednosti vraća tridesetog dana. Naša prijašnja istraživanja opisuju i korelaciju aktivnosti DPP IV/CD26 s aktivnošću i jakosti upalnih bolesti crijeva u pacijenata (86), što je i rezultatima ovih istraživanja na životinjskom modelu bolesti potvrđeno.

Istovremeno, određivali smo i aktivnost DPP IV/CD26-sličnih enzima u CD26 deficijentnih miševa dobivenih genetskom manipulacijom C57BL/6 životinja. Deficijencija proteinskog izražaja molekule CD26 u ovom je istraživanju potvrđena *Western blot* tehnikom. Isto tako, njezina je deficijencija potvrđena metodom protočne citometrije našim prijašnjim istraživanjima.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na činjenicu da približno 9,36% ukupne aktivnost DPP IV/CD26 otpada na DPP IV/CD26-slične enzime. U CD26 deficijentnih životinja nismo zapazili sniženje vrijednosti serumske aktivnosti DPP IV/CD26-sličnih enzima, što upućuje na značaj upravo ove molekule u procesima koji se odvijaju pri razvoju i cijeljenju kolitisa.

Rezultati enzimske aktivnosti DPP IV/CD26 dobiveni na lokalnoj razini, u mozgu i u debelom crijevu skupina pokusnih životinja također pokazuju statistički značajne promjene ($p < 0,05$) koje slijede upalne događaje. Aktivnost DPP IV/CD26 u mozgu C57BL/6 soja pokusnih životinja kojima je induciran kolitis statistički je značajno snižena ($p < 0,05$) drugog i sedmog dana od indukcije istog, u odnosu na fiziološke vrijednosti i odgovarajuće kontrolne skupine. Petnaestog i tridesetog dana od indukcije kolitisa enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u mozgu ponovno poprima fiziološke vrijednosti. Ovakve promjene nisu zamijećene u CD26 deficijentnih životinja, kod kojih su određivane aktivnosti DPP IV/CD26-sličnih enzima u mozgu. Analizom dobivenih rezultata utvrđeno je da svega 1,33% ukupno detektirane enzimske aktivnosti DPP IV/CD26 otpada na DPP IV/CD26-slične enzime. Iz ovog podatka također možemo

zaključiti važnost enzimske aktivnosti upravo ove molekule u mozgu tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa.

S druge strane, nije utvrđena promjena proteinskog izražaja molekule CD26 u mozgu C57BL/6 pokusnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, što smo pokazali tehnikom *Western blota*. Stoga možemo zaključiti da se aktivnost DPP IV/CD26 u mozgu najvjerojatnije mijenja, odnosno smanjuje, na nivou enzimske aktivnosti, a ne samog proteinskog izražaja molekule. Nepostojanje proteinskog izražaja molekule CD26 u životinjama s utišanim genom koji kodira molekulu CD26, također je potvrđeno tehnikom *Western blota*.

Promjene aktivnosti intestinalne DPP IV/CD26 na lokalnoj razini, na mjestima razvoja kolitisa, u debelom crijevu pokusnih životinja, vrlo su izražene u odnosu na kontrolne skupine i fiziološke vrijednosti. Aktivnost intestinalne DPP IV/CD26 u C57BL/6 soju pokusnih životinja statistički je značajno snižena ($p < 0,001$) drugog, sedmog i petnaestog dana od indukcije kolitisa. Fiziološke vrijednosti poprima tridesetog dana od indukcije kolitisa. Zanimljivo je primijetiti kako se slične promjene u aktivnosti intestinalnih DPP IV/CD26-sličnih enzima u CD26 deficijentnih životinja također statistički značajno ($p < 0,01$) snizuju u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine i fiziološke vrijednosti. Međutim, zasigurno značajan dio sniženja ovih aktivnosti posljedica je destrukcije sluznice debelog crijeva uzrokovanog upalnim promjenama razvoja kolitisa, koje dovode i do razaranja samih enzima prisutnih na epitelnim stanicama (215). Usporedbom dobivenih vrijednosti aktivnosti intestinalne DPP IV/CD26 u C57BL/6 životinja i aktivnosti intestinalnih DPP IV/CD26-sličnih enzima u CD26 deficijentnih životinja, utvrdili smo da svega 1,46% ukupne aktivnosti DPP IV/CD26 otpada na aktivnost DPP IV/CD26-sličnih enzima u debelom crijevu.

S druge strane, tehnikom *Western blota* utvrđen je porast proteinskog izražaja molekule CD26 u debelom crijevu C57BL/6 soja pokusnih životinja kojima je induciran kolitis, drugog i sedmog dana od indukcije istog. Razlog tomu može biti pojačana sinteza DPP IV/CD26 potaknuta sniženjem njegove aktivnosti u debelom crijevu. Pretpostavlja se regulacijski mehanizam koji nastoji smanjenu aktivnost DPP IV/CD26 nadomjestiti povećanim proteinskim izražajem DPP IV/CD26. Deficijencija proteinskog izražaja molekule CD26 u CD26 deficijentnih miševa također je potvrđena *Western blot* tehnikom.

Istraživanja provedena u ovom radu bila su nadalje usmjerena na neuroimunosne medijatore, supstrate DPP IV/CD26, za koje postoje indikacije o njihovoj ulozi u patogenezi upalnih bolesti crijeva. Dosadašnjim provedenim istraživanjima utvrđeno je da citokini poput IL-6 i IL-10 nedvojbeno sudjeluju u upalnim procesima nastanka upalnih bolesti crijeva te da su u sprezi s neuroendokrinim medijatorima. IL-6 pleiotropan je proupalni interleukin sa značajnom ulogom u nastanku Crohnove bolesti. Jedan je od najvažnijih citokina kojeg proizvode limfociti T lamine proprije u Crohnovoj bolesti i TNBS-modelu kolitisa (199). Novija istraživanja govore u prilog činjenici njegove indukcije Th17 tipa imunskog odgovora, za kojeg postoje sve nepobitniji dokazi o značaju u patogenezi Crohnove bolesti (216). Pokazano je da su IL-6 deficijentni miševi djelomično zaštićeni od razvoja TNBS kolitisa u modelu upalnih bolesti crijeva, djelomično i zbog lučenja većih količina protuupalnih citokina (217). Nadalje, pokazano je da anti IL-6 protutijela uspješno sprječavaju nastajanje upalnih procesa u crijevu (199, 218). U dostupnoj literaturi ne postoje podaci o sistemskim i lokalnim koncentracijama IL-6 tijekom razvoja i cijeljenja TNBS-om induciranog kolitisa u CD26 deficijentnih životinja, stoga smo željeli istražiti i ove podatke.

IL-6 podliježe katalitičkoj razgradnji uslijed enzimskog djelovanja DPP IV/CD26 (84). Rezultati ovog istraživanja pokazuju statistički značajno više vrijednosti fiziološke koncentracije IL-6 u serumu CD26 deficijentnih životinja u odnosu na divlji tip miša. Drugog dana od indukcije kolitisa dolazi do izrazitog porasta koncentracije IL-6 u serumu oba soja pokusnih životinja. Analizom dobivenih rezultata zamijećeno je da koncentracija IL-6 u serumu korelira s jačinom bolesti u pojedinim životinja. Ovi su rezultati u skladu s rezultatima dosadašnjih istraživanja za oboljele od upalnih bolesti crijeva (218). Vrijednosti sistemskih koncentracija IL-6 sedmog dana se normaliziraju, štoviše, u C57BL/6 životinja poprimaju vrijednosti niže od fizioloških koncentracija ($p < 0,05$). Ovu pojavnost nismo zamijetili kod CD26 deficijentnih životinja pa stoga možemo zaključiti da se veliki dio razgradnje IL-6 u serumu, odnosno normalizacije njegove koncentracije, može pripisati enzimskom djelovanju DPP IV/CD26.

Promjene koncentracije IL-6 vrlo su izražene i na lokalnoj razini, u debelom crijevu pokusnih životinja. Naime, drugog dana od indukcije kolitisa, u akutnoj fazi bolesti, dolazi do naglašenog, statistički značajnog ($p < 0,001$) porasta koncentracije IL-6 u proteinskim ekstraktima debelog crijeva oba soja životinja. Također je zamijećena korelacija koncentracije IL-6 u uzorcima debelog crijeva s jakošću upalnih procesa. Ovi su rezultati također u skladu s podacima iz literature (218). Vrijednosti koncentracija IL-6 bile su više u CD26 deficijentnih životinja, no ne i statistički značajno u odnosu na C57BL/6 životinje. Kako u dostupnoj literaturi nema podataka o koncentraciji IL-6 u debelom crijevu CD26 deficijentnih miševa kojima je induciran TNBS-model kolitisa, a obzirom na značaj ovog proupalnog citokina u patogenezi upalnih bolesti crijeva, zanimljivi su rezultati ovog istraživanja koji ukazuju da unatoč nepostojanju katalitičke aktivnosti DPP IV/CD26, ne dolazi do značajnog povišenja koncentracije IL-6 na mjestima upale u odnosu na divlji tip miša. Razlog tomu mogu biti i fiziološki više

koncentracije IL-10 u serumu kao i na mjestima upalnih promjena CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, što je utvrđeno ovim istraživanjem i opisano u poglavlju rezultata te raspravljeno dalje u tekstu.

Koncentracije IL-6 u proteinskim ekstraktima mozga također su bile statistički značajno više u odnosu na fiziološke vrijednosti drugog dana od indukcije kolitisa, kako u C57BL/6 tako i u CD26 deficijentnim životinjama. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) zamijećene su u fiziološkim vrijednostima koncentracija IL-6 između istraživanih sojeva životinja, no ne i drugog dana od indukcije kolitisa. Trend promjene koncentracija IL-6 u mozgu sličan je u oba soja pokusnih životinja, nešto manje naglašen kod C57BL/6 soja.

Istraživanja u sklopu ovog rada uključila su i određivanja sistemskih i lokalnih koncentracija IL-10 u C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja. Također u dostupnoj literaturi ne postoje podaci o sistemskim i lokalnim koncentracijama IL-10 tijekom razvoja i cijeljenja TNBS-kolitisa u CD26 deficijentnih životinja. IL-10 važan je protuupalni citokin s potencijalnim terapijskim učincima kod oboljelih od upalnih bolesti crijeva. Nedostatak IL-10 dovodi do spontanog nastanka kolitisa u miša, što dovoljno govori u prilog značajnosti ovog interleukina u samoj patogenezi upalnih bolesti crijeva (219). Utvrđena je snižena koncentracija IL-10 kod oboljelih od upalnih bolesti crijeva te njegova značajna uloga u patogenezi upalnih procesa (220). Pokazano je da IL-10 deficijentne životinje spontano razvijaju Crohnu-sličan kolitis. Tretman s IL-10 smanjuje kliničke, histološke i biokemijske pokazatelje upale kod TNBS modela kolitisa u miša, uz smanjenje koncentracije IL-6 i IFN- γ u homogenatu kolona (201). Biološko djelovanje IL-10 pod izravnom je modulacijom DPP IV/CD26, koji ga inaktivira (84).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na statistički značajno više ($p < 0,05$) koncentracije IL-10 u serumu CD26 deficijentnih životinja. Drugog dana od indukcije kolitisa dolazi do sniženja serumske koncentracije IL-10 u oba soja životinja. Ovi su

rezultati u skladu s prethodno objavljenim istraživanjima provedenima u oboljelih od upalnih bolesti crijeva (220). Sedmog dana od indukcije kolitisa u CD26 deficijentnih životinja dolazi do statistički značajnog porasta koncentracije IL-10 u serumu u odnosu na fiziološke vrijednosti. Kod C57BL/6 životinja porast je puno blaži a vrijednosti koncentracije IL-10 izmjerene sedmog dana od indukcije kolitisa ne razlikuju se statistički značajno od fizioloških vrijednosti. C57BL/6 životinje tek petnaestog dana od indukcije kolitisa imaju nešto više vrijednosti koncentracije IL-10 u serumu u odnosu na fiziološke vrijednosti. I ovdje možemo zamijetiti važnu ulogu DPP IV/CD26 u procesima početka oporavka upalnih promjena. U uvjetima nedostatka DPP IV/CD26 dolazi do promptnog i izraženog porasta IL-10 u serumu sedmog dana od indukcije kolitisa.

Važnost DPP IV/CD26 još je izraženija tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa na lokalnim razinama. Naime, u fiziološkim uvjetima nisu zamijećene statistički značajne razlike u koncentracijama IL-10 u tkivnim ekstraktima niti mozga niti debelog crijeva između CD26 deficijentnih i C57BL/6 soja životinja. Međutim, drugog dana od indukcije kolitisa u debelom crijevu CD26 deficijentnih miševa dolazi do značajnog porasta koncentracije IL-10, koja se na fiziološke razine vraća sedmog dana. Kod C57BL/6 životinja nije zamijećena ovakva pojava, naprotiv, drugog dana od indukcije kolitisa ne dolazi do značajnije promjene koncentracije IL-10 dok sedmog dana dolazi do statistički značajnog sniženja kako u odnosu na fiziološke vrijednosti tako i u odnosu na drugi dan od indukcije kolitisa. Vrijednosti IL-10 statistički su značajno više u debelom crijevu CD26 deficijentnih životinja i drugog i sedmog dana od indukcije kolitisa u usporedbi s vrijednostima koncentracije IL-10 dobivenih istih dana žrtvovanja C57BL/6 životinja. Obzirom da se koncentracije IL-10 u debelom crijevu u fiziološkim uvjetima ne razlikuju statistički značajno između ova dva soja pokusnih životinja, a obzirom na važna protuupalna svojstva ovog interleukina (201), molekuli DPP IV/CD26 možemo pripisati

značaj u očuvanju integriteta sluznice u upalnim promjenama koja se očituje u statistički povećanoj ($p < 0,05$) koncentraciji IL-10 u CD26 deficijentnih životinja tijekom razvoja i cijeljenja upalnih promjena kolona.

Promjene koje se odvijaju tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa reflektiraju se i u mozgu, što predstavlja osobito zanimljiv podatak. Naime, koncentracije IL-10 u tkivnim ekstraktima mozga ne razlikuju se statistički značajno između C56BL/6 i CD26 deficijentnih životinja. Međutim, drugog dana od indukcije kolitisa dolazi do statistički značajnog sniženja ($p < 0,05$) koncentracije IL-10 u mozgu C57BL/6 životinja, koja perzistira i sedmog dana. U CD26 deficijentnih životinja nije zabilježeno sniženje koncentracije IL-10 u mozgu drugog dana već kasnije, kada započinje cijeljenje upalnih procesa u debelom crijevu, sedmog dana od indukcije kolitisa. Međutim, promjene su manje izražene u odnosu na C57BL/6 soj pokusnih životinja. Stoga možemo zaključiti važnost DPP IV/CD26 u procesima promjene koncentracije IL-10 u upalnim promjenama i na sistemskoj i na lokalnim razinama. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem podupiru dosadašnja saznanja o pozitivnim učincima inhibicije DPP IV/CD26 tijekom razvoja upalnih promjena (231, 232).

Osim interleukina, ovo je istraživanje obuhvatilo i analize neuropeptida, također supstrata DPP IV/CD26. Dosadašnja su istraživanja ukazala na činjenicu da neuropeptidi poput neuropeptida Y (NPY) i vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP) utječu na imunosni odgovor te sudjeluju u mehanizmima nastanka, odnosno sprječavanja upale. Međutim, njihova uloga nije u potpunosti poznata, a kontradiktorni su i rezultati o njihovom pro- odnosno protuupalnom učinku. Vjeruje se da VIP u okviru patogeneze upalnih bolesti crijeva ima protuupalno djelovanje koje se očituje kroz sprječavanje lučenja proupalnih i istovremeno poticanje lučenja protuupalnih faktora, i lokalno i sistemski. Na lokalnoj razini, VIP u crijevu sprječava lučenje TNF- α , IL-2 i IFN- γ

od strane Th1 autoreaktivnih stanica. Istovremeno, potiče regulacijske limfocite T na lučenje protuupalnih faktora IL-10 i TGF- β (193). Klinička su istraživanja pokazala kontradiktorne vrijednosti ovog neuropeptida na sistemskoj i lokalnoj razini (172, 221).

Analizom rezultata dobivenih ovim istraživanjem utvrđeno je da CD26 deficijetne životinje konstitutivno sadrže veće koncentracije VIP-a u sistemskoj cirkulaciji u odnosu na C57BL/6 životinje. Ove su razlike statistički značajne ($p < 0,05$). Promjene sadržaja VIP-a u serumu C57BL/6 i CD26 deficijentnih životinja slijede sličan trend, no promjene kod CD26 deficijentnih životinja su izrazitije. Naime, kod oba soja miševa dolazi do statistički značajnog povišenja ($p < 0,05$) koncentracije VIP-a u serumu drugog dana od indukcije kolitisa. Za razliku od C57BL/6 životinja, koncentracije VIP-a ostaju statistički značajno povišene ($p < 0,07$) i sedmog dana od indukcije kolitisa. Petnaestog i tridesetog dana proprimaju fiziološki vrijednosti u oba soja životinja. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s objavljenim rezultatima o povišenim vrijednostima VIP-a u serumu oboljelih od drugih upalnih procesa (222).

Rezultati koncentracije VIP-a na lokalnim razinama, u tkivnim ekstraktima mozga i debelog crijeva ne razlikuju se statistički značajno između CD26 deficijentnih i C57BL/6 životinja. Profil promjene koncentracije VIP-a u debelom crijevu sličan je u oba soja pokusnih životinja, s naglašenim, statistički značajnim porastom koncentracije drugog dana od indukcije kolitisa. Koncentracije VIP-a u debelom crijevu pokusnih životinja gotovo su dvostruko više u CD26 deficijentnih u odnosu na divlji tip miševa drugog dana od indukcije kolitisa. Obzirom na statistički značajno više koncentracije protuupalnog neuropeptida VIP-a u debelom crijevu CD26 deficijentnih životinja u akutnoj fazi kolitisa, možemo i kroz ovaj segment zaključiti protektivni učinak inhibicije DPP IV/CD26.

Promjene na lokalnoj razini u debelom crijevu također imaju reperkusije na sadržaj VIP-a u mozgu, koji je isto tako u akutnoj fazi kolitisa statistički značajno povišen

($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine u oba soja životinja. Navedene su promjene i u mozgu i u debelom crijevu puno izraženije u CD26 deficijentnih životinja i razlikuju se statistički značajno ($p < 0,05$) u odnosu na C57BL/6 soj miševa. I u ovom slučaju možemo zaključiti da uvjeti nedostatka molekule CD26 uzrokuju statistički značajne promjene i na sistemskoj i na lokalnoj razini, koje se mogu odražavati u patogenezi upalnih bolesti crijeva.

Za razliku od VIP-a, vrlo su oskudni podaci o učincima NPY-a u nastanku autoimunosti i upale u crijevu. Novije objavljeni znanstveni članci ukazuju na njegovu potencijalno važnu ali neistraženu ulogu u imunosnim međudjelovanjima, što dovodi do potrebe za daljnjim istraživanjima na tom području. Recentno objavljeno istraživanje opisuje povećanu rezistenciju NPY deficijentnog soja miša na razvoj kemijski i mikrobiološki izazvanog kolitisa (183). Osim toga, pokazano je smanjenje pokazatelja upale kod eksperimentalnog kolitisa izazvanog u miševa s deficijencijom Y1 receptora za NPY (NPY Y1^{-/-} miševa) u odnosu na kontrolnu skupinu (223). Pokazano je da je koncentracija NPY u serumu oboljelih od upalnih bolesti crijeva statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu skupinu i da nema statistički značajne razlike između bolesnika s aktivnom bolešću te onih u remisiji (224). Nadalje, pokazano je da NPY stimulira lučenje IL-6 i TNF- α kod zdravih ispitanika (225). S druge strane, postoje i upravo suprotni podaci koji govore u prilog protuupalnim svojstvima NPY (184). Navedene činjenice upućuju na osobit znanstveni interes istraživanja neuroimunomodulacijskih događanja u procesima nastanka kao i cijeljenja upale.

NPY vrlo je efektivan supstrat DPP IV/CD26. Katalitičko djelovanje DPP IV/CD26 uzrokuje inaktivaciju NPY-a i njegovu nemogućnost vezivanja za Y1 receptor, putem kojega ostvaruje većinu svojih bioloških učinaka (184). Obzirom na navedene činjenice i oskudna znanstvena saznanja na ovom području, ovo je istraživanje obuhvatilo i analize

NPY-a tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u oba soja pokusnih životinja. Željeli smo istražiti dosad nepoznate podatke o promjeni sistemskih i lokalnih koncentracija NPY-a tijekom razvoja i cijeljenja TNBS-om induciranog kolitisa u C57BL/6 i CD26 deficijentnim životinjama.

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazuju na nešto više vrijednosti NPY-a u serumu CD26 deficijentnih životinja ali ove razlike nisu statistički značajne u odnosu na C57BL/6 soj životinja. Međutim, tijekom razvoja kolitisa dolazi do povećanja koncentracije NPY-a u serumu kod oba soja životinja, a razlike su statistički značajne ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine samo kod CD26 deficijentnih životinja. Porast je najizraženiji sedmog dana od indukcije kolitisa, a za razliku od C57BL/6 životinja, koncentracije NPY-a u serumu ostaju povišene i petnaestog dana od indukcije kolitisa. Ova je razlika statistički značajna ($p < 0,05$) između dva ispitivana soja pokusnih životinja. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem u skladu su s objavljenim rezultatima istraživanja koja uključuju oboljele od upalnih bolesti crijeva (224).

Vrlo su zanimljivi podaci o koncentracijama NPY-a na lokalnim razinama, u mozgu i u debelom crijevu pokusnih životinja. Naime, nisu utvrđene statistički značajne razlike u sadržaju NPY-a ni u mozgu ni u debelom crijevu između CD26 deficijentnih i C57BL/6 soja životinja. Međutim, drugog dana od indukcije kolitisa, u oba soja pokusnih životinja dolazi do statistički značajnog povećanja ($p < 0,05$) koncentracije NPY-a u tkivnim ekstraktima debelog crijeva. Za razliku od promjena u koncentraciji zamijećenih kod VIP-a, promjene sadržaja NPY-a izraženije su kod C57BL/6 životinja. Statistički značajno povišene ($p < 0,05$) koncentracije NPY-a i u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu i u odnosu na CD26 deficijentne životinje zadržavaju se i sedmog dana od indukcije kolitisa.

Promjene koncentracija NPY-a još su zanimljivije u debelom crijevu pokusnih životinja. Name, promjene u koncentraciji NPY-a u tkivnim ekstraktima upalno promijenjenih tkiva debelog crijeva pokazuju različiti profil ponašanja. Kod C57BL/6 soja životinja dolazi do naglog porasta koncentracije NPY-a drugog dana od indukcije kolitisa. Sedmog dana vrijednosti se vraćaju u granice fizioloških koncentracija, a petnaestog dana postaju statistički značajno snižene u odnosu i na fiziološke vrijednosti i na odgovarajuće kontrolne skupine. U CD26 deficijentnih životinja pak s druge strane nalazimo statistički značajno sniženje koncentracije NPY-a u debelom crijevu drugog i sedmog dana od indukcije kolitisa. Tridesetog dana od indukcije kolitisa vrijednosti koncentracije NPY-a vraćaju se na fiziološku razinu u oba soja pokusnih životinja. Ukoliko uzmemo u obzir veći broj znanstvenih radova koji opisuju proupalna svojstva NPY-a u odnosu na one koji opisuju njegova protuupalna svojstva, možemo zaključiti da i u ovom segmentu inhibicija DPP IV/CD26 ima pozitivne učinke tijekom razvoja i cijeljenja upalnih promjena gastrointestinalnog sustava (183,184, 223-225).

Analizom dobivenih rezultata možemo zamijetiti da se deficijencija DPP IV/CD26 odražava na svim svim ispitivanim parametrima, i na sistemskoj i na lokalnim razinama. Većina ovih učinaka, osobito na sistemskoj razini, može se najvjerojatnije pripisati enzimskoj razgradnji istraživanih molekula a koje su redom supstrati DPP IV/CD26 (99). Međutim, u slučaju NPY-a zamijećene promjene na lokalnoj razini ne mogu biti posljedica samo katalitičkog djelovanja DPP IV/CD26. Stoga pretpostavljamo da DPP IV/CD26 svoju neuroimunomodulacijsku ulogu u upalnim procesima ostvaruje i putem ostalih djelovanja svojstvenih ovoj molekuli. Multifunkcionalnost DPP IV/CD26 očituje se i u kostimulacijskim svojstvima, osobito limfocita T, te involviranosti u kaskadnim reakcijama prijenosa signala u stanicu i u međustaničnoj komunikaciji (104). U tom smislu, možemo zaključiti da deficijencija molekule DPP IV/CD26 ima važne reperkusije

na biološku aktivnost neuroimunoendokrinih medijatora, a koje nisu posljedica samo njezinog katalitičkog djelovanja.

Tijekom dobivanja novih znanstvenih saznanja na području peptidaza, ponajprije je pokazana važna uloga egzopeptidazne aktivnosti DPP IV u aktivaciji i inaktivaciji biološki važnih peptida (226). Spektar citokina i kemokina, supstrata DPP IV, vrlo je opširan, pa je stoga uloga ovog enzima u biološkim procesima vrlo raznolika. Osobito je značajna regulacija i modulacija kemotaksije monocita i limfocita T putem kemokina RANTES, jednog od brojnih supstrata DPP IV. Među brojnim ulogama ove multifunkcionalne molekule, važno je naglasiti i ključnu ulogu DPP IV/CD26 u regulaciji rasta i diferencijacije limfocita T (227).

Prethodna su istraživanja, kako naša tako i od strane ostalih istraživača, ukazala na potencijalnu ulogu DPP IV/CD26 u patogenezi UBC (86, 88, 211). Pokazano je statistički značajno povišenje izražaja CD26 na limfocitima T u oboljelih od UBC u odnosu na kontrolnu skupinu (88). S druge strane, utvrđeno je sniženje aktivnosti DPP IV u serumu, također statistički značajno u odnosu na zdrave ispitanike (86, 88, 211). Rezultati ovog istraživanja u skladu su s navedenim podacima. Promjene u izražaju i aktivnosti DPP IV/CD26 u oboljelih od upalnih bolesti crijeva usmjerila su daljnja istraživanja na proučavanje događaja na raskrižju imunosnih funkcija te metabolizma peptidnih hormona. Međutim, današnje spoznaje još uvijek upućuju samo na korelaciju promjena izražaja i aktivnosti DPP IV/CD26 s jačinom bolesti, dok molekularni mehanizmi koji objašnjavaju ove promjene do danas ostaju nerazjašnjeni.

Upravo zbog vrlo složenih interakcija u imunosnom sustavu i izrazite multifunkcionalnosti DPP IV/CD26, uloga ove još uvijek nije sasvim poznata. Međutim, putem svoje enzimske uloge, čime dovodi do aktivacije i inaktivacije brojnih supstrata s raznolikom ulogom u organizmu, te uključenosti u procesima aktivacije limfocita T putem

svojih kostimulacijskih svojstava, zaslužna je za modulaciju imunosnog odgovora (105). Postoje i saznanja da je DPP IV/CD26 uključena u proces regulacije migracije limfocita T do mjesta upale u imunološki posredovanim bolestima (228). Stoga, na temelju dosadašnjih spoznanja, DPP IV/CD26 ima potencijalno važnu ulogu u patogenezi upalnih bolesti crijeva. Pretpostavlja se da DPP IV/CD26 može biti uključena u patogenezu upalnih bolesti crijeva putem svoje enzimske, ali i kostimulacijske uloge. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na saznanja da DPP IV/CD26 posjeduje i neuroimunomodulacijska svojstva tijekom razvoja i cijeljenja upalnih promjena u modelu kemijski inducirane upalne bolesti crijeva u miša.

Dosadašnjim je istraživanjima pokazano da stanice s Th1 profila i fenotipa izražavaju molekulu CD26 u većoj količini nego Th2 klonovi (229). Dokazano je da visoka razina izražaja CD26 definira Th1/Th0 fenotip a u korelaciji je s povećanim lučenjem citokina uključenih u Th1-imunosni odgovor, poput IFN γ (229). Korelacija između izražaja CD26 te Th1 tipa imunosnog odgovora objašnjava se putem IL-12 ovisne regulacije, obzirom da IL-12 povećava izražaj molekule CD26 na mononuklearnim stanicama periferne krvi prethodno stimuliranim fitohemaglutininom (230). Razgradnja kemokina od strane DPP IV/CD26 također sudjeluje u inhibiciji Th2-citokinskog odgovora. Pretpostavlja se da povećanje Th1-citokinskog odgovora predstavlja ukupni učinak aktivnosti DPP IV/CD26, što je djelomično i zbog razgradnje citokina Th2-odgovora, upravo zbog enzimske aktivnosti DPP IV (88). Obzirom da molekula DPP IV/CD26 sudjeluje u funkcijama imunosnog sustava, varijacije u izražaju i enzimskoj aktivnosti ove molekule mogu biti temelji kojima DPP IV/CD26 regulira razvoj limfocita T, kao i imunosni odgovor općenito.

Obzirom da je modulacija aktivnosti limfocita T putem inhibitora DPP IV vrlo važan mehanizam, pretpostavlja se da bi endogene, kao i egzogene molekule s

inhibitornim djelovanjem na DPP IV mogle imati važnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora *in vivo*. Upravo zbog svojeg suprimirajućeg učinka na aktivaciju limfocita T, pretpostavlja se da bi se inhibitori DPP IV mogli koristiti u *in vivo* imunosupresivnoj terapiji. Postoji nekoliko životinjskih modela humanih bolesti na kojima je ispitivan učinak sintetskih inhibitora DPP IV. U ovim su istraživanjima pokazani brojni ali ne i svi aspekti ove molekule u raznim fiziološkim i patološkim procesima.

Inhibicijski učinak specifičnih inhibitora DPP IV na proliferaciju leukocita te proizvodnju citokina potvrđen je različitim modelima razvoja limfocita T. Dokazano je da se antigen-specifična proliferacija stanica mišjih limfnih čvorova, T-staničnih linija i klonova može se suprimirati inhibitorima DPP IV/CD26 (85). Dosadašnja istraživanja pokazala su ključnu ulogu molekule DPP IV/CD26 u regulaciji efektorske uloge CD4⁺ limfocita T u eksperimentalnom autoimunom encefalomijelitisu. Simptomi eksperimentalnog autoimnog encefalomijelitisa djelomično su bili suprimirani nakon *in vivo* primjene specifičnog DPP IV/CD26 inhibitora I40, u preventivnim i terapijskim dozama (231). Protektivan mehanizam, odnosno zaštitni učinak inhibicije DPP IV/CD26 može se objasniti modulacijom efektorske uloge limfocita T. Inhibitori DPP IV/CD26, I40 i I49 također suprimiraju izlučivanje proupalnih citokina TNF- α te IFN- γ .

Pozitivni rezultati inhibicije DPP IV/CD26 u autoimunim bolestima usmjerila su istraživanja i na upalne bolesti crijeva. Pokazano je da inhibicija DPP IV djelomično dovodi do smanjenja simptoma kolitisa u miša (232). Rezultati ovog istraživanja također govore u prilog protektivnom učinku uvjeta nedostatka molekule DPP IV/CD26 koji se očituje u statistički značajnoj višoj koncentraciji protuupalnih citokina IL-10 i VIP-a sistemski i lokalno, uz produženo biološko djelovanje, u odnosu na C57BL/6 životinje. Štoviše, koncentracije proupalnog citokina IL-6 ne razlikuju se statistički značajno

između ispitivanih sojeva životinja u akutnoj fazi kolitisa u tkivnim ekstraktima upalno promijenjenih segmenata debelog crijeva pokusnih životinja.

Dosadašnja istraživanja nisu u potpunosti razjasnila funkciju NPY-a no sve veći broj činjenica govori u prilog njegovom proupalnom djelovanju. Naime, NPY deficijentni miševi rezistentniji su na razvoj kemijski induciranog kolitisa, koji se u uvjetima deficijencije NPY očituje blažim upalnim promjenama i kliničkim manifestacijama bolesti (183). Nadalje, životinje s genetskom inaktivacijom receptora za NPY, Y1, također su djelomično zaštićeni od razvoja kemijski induciranog kolitisa (223). Važno je naglasiti da upravo DPP IV/CD26 svojim katalitičkim djelovanjem onemogućuje vezivanje NPY-a na Y1 receptor, obzirom da NPY nakon katalitičkog djelovanja DPP IV/CD26 gubi afinitet za Y1 receptor, čime se onemogućuje njihovo vezivanje.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se upalni procesi koji se odvijaju na lokalnoj razini u debelom crijevu reflektiraju i na imunobiokemijske parametre u mozgu pokusnih životinja. Navedena je činjenica utvrđena za sve istraživane parametre obuhvaćene ovom studijom a promjene su bile izraženije u CD26 deficijentnim životinjama. Dobivenim je rezultatima potvrđena važnost crijevno-mozgovne osi u patogenezi upalnih bolesti crijeva.

Iz svega navedenoga, možemo zaključiti da DPP IV/CD26 posjeduje i neuroimunomodulacijska svojstva u procesima nastanka i cijeljenja upalne bolesti crijeva u miša. Ova su istraživanja pokazala i potvrdila da je biološka aktivnost istraživanih neuropeptida i interleukina pod izravnom modulacijom DPP IV/CD26. Rezultati dobiveni na animalnom modelu bolesti mogu se upotrijebiti kod Crohnove bolesti u osmišljavanju novih terapijskih agensa koji bi smanjili intenzitet upalnih promjena, produžili razdoblje remisije i time poboljšali kvalitetu života oboljelih. Inhibitori DPP IV/CD26 već su u kliničkoj upotrebi u cilju terapije *diabetes mellitus*a tipa 2 što nije, prema dosadašnjim

saznanjima i dostupnim podacima, rezultiralo ozbiljnijim nuspojavama korištenja ovih lijekova (165, 166). Stoga, možemo zaključiti da su opravdani prijedlozi o inhibiciji DPP IV/CD26 i u smislu neuroimunomodulacijske terapije u liječenju upalnih bolesti crijeva (164).

6. Zaključci

Temeljem rezultata dobivenih ovim istraživanjem izvedeni su slijedeći zaključci:

1. Tijekom razvoja kemijski induciranog TNBS-kolitisa u C57BL/6 i u CD26 deficijntnom soju životinja dolazi do kliničke manifestacije bolesti, statistički značajnih promjena tjelesne mase, masa jetre i slezene, makroskopskih, patohistoloških i histomorfometrijskih promjena debelog crijeva uz značajan porast mikroskopskog indeksa oštećenja. TNBS-kolitis (engl. *Crohn-like colitis*) uspostavljen je u oba soja miša, što je potvrđeno statistički značajnim promjenama kliničkih i histoloških parametara, na lokalnoj i sistemske razini.
2. Upalne promjene tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa u CD26^{-/-} životinja bile su ponajviše ograničene na određeni dio stijenke debelog crijeva. Ulceracije površinskog sloja bile su lokaliziranog karaktera uz očuvani mišićni sloj no zapažen je i određeni broj žarišnih transmuralnih upalnih promjena. Za razliku od CD26^{-/-}, kod C57BL/6 životinja nalazimo difuznu a ne žarišnu upalu koja zahvaća cijelu cirkumferenciju crijeva uz vrlo malo ili bez očuvanih dijelova sluznice.
3. Statistički značajne promjene ciljanih imunobiokemijskih parametara (enzimske aktivnosti, koncentracije neuropeptida, koncentracije interleukina) utvrđene su i na sistemske i na lokalnoj razini u oba soja pokusnih životinja kojima je induciran kolitis u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine ali i između ispitivanih sojeva životinja. Takve promjene nisu zamijećene u kontrolnim skupinama.

-
4. **Aktivnost DPP IV/CD26** statistički je značajno snižena kako u serumu tako i lokalno, u mozgu i debelom crijevu u C57BL/6 životinja kojima je induciran kolitis u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine. Aktivnosti DPP IV/CD26-sličnih enzima u CD26^{-/-} životinja nisu promijenjene, osim u debelom crijevu, što je najvjerojatnije posljedica destrukcije intestinalnih enzima potaknute upalnim procesima.
5. Koncentracije **neuropeptida Y** nisu statistički značajno različite u CD26^{-/-} životinja u serumu i na lokalnim razinama (u mozgu i debelom crijevu) u odnosu na C57BL/6 životinje. Međutim, tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa dolazi do statistički značajnih promjena u koncentraciji NPY-a i sistemski i lokalno, u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine, ali i između ispitivanih sojeva životinja.
- Koncentracije NPY-a u serumu oba soja životinja dosežu najveće vrijednosti sedmog dana od indukcije kolitisa, no porast koncentracije statistički je značajan samo za CD26^{-/-} životinje u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu. Petnaestog dana od indukcije kolitisa koncentracija NPY-a u serumu C57BL/6 životinja doseže fiziološke vrijednosti, dok kod CD26^{-/-} životinja ostaje statistički značajno povišena i u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu i u odnosu na C57BL/6 životinje. Tridesetog dana od indukcije kolitisa poprima fiziološke vrijednosti i kod CD26^{-/-} životinja.
 - Promjene koncentracija NPY-a na lokalnoj razini, u debelom crijevu, najizraženije su u akutnoj fazi kolitisa, gdje je utvrđen statistički značajan porast u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine u oba soja životinja.

Međutim, promjene su izraženije u C57BL/6 životinja gdje povišene vrijednosti koncentracija NPY-a perzistiraju i sedmog dana od indukcije kolitisa. Razlike u koncentraciji NPY-a između ispitivanih sojeva statistički su značajne drugog i sedmog dana od indukcije kolitisa.

- c. Razlike u promjeni koncentracija NPY-a tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa zapažene su i u mozgu i slijede različiti trend kod pojedinog soja pokusnih životinja. Kod C57BL/6 životinja zapažen je statistički značajan porast koncentracije NPY-a u mozgu u akutnoj fazi kolitisa, koja se sedmog dana od indukcije kolitisa vraća na fiziološke razine, a petnaestog dana poprima čak i statistički niže vrijednosti od fizioloških. Za razliku od C57BL/6 životinja, u CD26^{-/-} soju miševa zapaženo je statistički značajno sniženje koncentracije NPY-a u mozgu drugog i sedmog dana od indukcije kolitisa, u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine. Razlike u koncentraciji NPY-a između ispitivanih sojeva statistički su značajne drugog, petnaestog i tridesetog dana od indukcije kolitisa.

6. Utvrđene su statistički značajne razlike u koncentraciji **vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP)** između C57BL/6 i CD26^{-/-} životinja kako međusobno tako i u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, na sistemskoj i lokalnim razinama.

- a. CD26 deficijentne životinje konstitutivno imaju statistički značajno višu koncentraciju VIP-a u serumu u odnosu na C57BL/6 životinje. U akutnoj fazi kolitisa, dolazi do statistički značajnog povećanja VIP-a u serumu oba soja životinja, koji je izraženiji u CD26^{-/-} životinja. Koncentracije VIP-a u serumu, za razliku od C57BL/6, u CD26^{-/-} životinja ostaju statistički

značajno povišene i sedmog dana od indukcije kolitisa, u fazi oporavka sluznice.

- b. Koncentracije VIP-a u mozgu i debelom crijevu oba soja pokusnih životinja u fiziološkim uvjetima ne razlikuju se statistički značajno. Međutim, u akutnoj fazi kolitisa, u debelom crijevu dolazi do statistički značajnog povećanja koncentracije VIP-a u oba soja, a ovo je povećanje gotovo dvostruko veće u CD26^{-/-} životinja u odnosu na C57BL/6 životinje. Sličan trend povećanja koncentracije VIP-a zapažen je i u mozgu, gdje također nalazimo statistički značajno više koncentracije VIP-a u akutnoj fazi kolitisa u CD26^{-/-} životinja u odnosu na C57BL/6 životinje.

7. Utvrđene su statistički značajne razlike u koncentraciji **IL-6** između C57BL/6 i CD26^{-/-} životinja kako međusobno tako i u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, na sistemskoj i lokalnim razinama.

- a. CD26^{-/-} životinje konstitutivno sadrže statistički značajno više koncentracije IL-6 u serumu u odnosu na C57BL/6 životinje. Drugog dana od indukcije kolitisa, u oba soja dolazi do statistički značajnog povećanja koncentracije IL-6 u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine. Porast koncentracije IL-6 u serumu drugog dana od indukcije kolitisa statistički je značajno viši u CD26^{-/-} životinja u odnosu na C57BL/6 životinje. Vrijednosti se normaliziraju sedmog dana od indukcije kolitisa u oba soja pokusnih životinja.
- b. Vrijednosti koncentracije IL-6 u crijevu ne razlikuju se statistički značajno između CD26^{-/-} i C57BL/6 životinja. U akutnoj fazi kolitisa dolazi do statistički značajnog porasta koncentracije IL-6 u oba soja pokusnih

-
- životinja u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine. Vrijednosti su više u CD26^{-/-} životinja ali ne i statistički značajno.
- c. Vrijednosti koncentracije IL-6 u mozgu u fiziološkim uvjetima statistički su značajno više u CD26^{-/-} životinja u odnosu na C57BL/6 soj. U akutnoj fazi kolitisa dolazi do statistički značajnog porasta koncentracije IL-6 u mozgu u oba soja pokusnih životinja u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine. Razlike između sojeva utvrđene su sedmog dana od indukcije kolitisa, gdje je pad koncentracije IL-6 izraženiji u CD26^{-/-} životinja.
8. Utvrđene su statistički značajne razlike u koncentraciji **IL-10** između C57BL/6 i CD26^{-/-} životinja kako međusobno tako i u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa, na sistemskoj i lokalnim razinama.
- a. CD26^{-/-} životinje konstitutivno sadrže statistički značajno više koncentracije IL-10 u serumu u odnosu na C57BL/6 životinje. Drugog dana od indukcije kolitisa, u oba soja dolazi do statistički značajnog sniženja koncentracije IL-10 u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine. Porast koncentracije IL-10 u serumu zapažen je u oba soja pokusnih životinja, no u CD26^{-/-} životinja izraženiji je i za razliku od C57BL/6 soja, dostiže statistički značajno više vrijednosti u odnosu na fiziološke vrijednosti. Vrijednosti se normaliziraju petnaestog dana od indukcije kolitisa u CD26^{-/-} životinja a tridesetog dana u C57BL/6 životinja.
- b. Vrijednosti koncentracija IL-10 u debelom crijevu ne razlikuju se statistički značajno između CD26^{-/-} i C57BL/6 životinja u fiziološkim uvjetima. Međutim, tijekom razvoja i cijeljenja kolitisa zapažene su različite promjene u koncentraciji IL-10 u debelom crijevu ispitivanih sojeva
-

životinja. U akutnoj fazi kolitisa, u debelom crijevu CD26^{-/-} životinja dolazi do statistički značajnog povišenja koncentracije IL-10 u odnosu na fiziološke vrijednosti i u odnosu na C57BL/6 životinje kod kojih takva promjena nije zamijećena. Sedmog dana od indukcije kolitisa vrijednosti IL-10 u debelom crijevu CD26^{-/-} životinja se normaliziraju, a u C57BL/6 životinja dolazi do statistički značajnog sniženja njegove koncentracije, u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu i u odnosu na vrijednosti dobivene kod CD26^{-/-} životinja. Vrijednosti koncentracije IL-10 normaliziraju se kod oba soja pokusnih životinja petnaestog dana od indukcije kolitisa.

- c. Vrijednosti koncentracija IL-10 u mozgu ne razlikuju se statistički značajno između CD26^{-/-} i C57BL/6 životinja u fiziološkim uvjetima. Međutim, u akutnoj fazi kolitisa dolazi do statistički značajnog sniženja koncentracije IL-10 u mozgu zapaženog samo u C57BL/6 životinja, u odnosu na kontrolnu skupinu. Blaže sniženje koncentracije IL-10 zapaženo je u CD26^{-/-} životinja sedmog dana od indukcije kolitisa, a vrijednosti su statistički značajno više u odnosu na C57BL/6 životinje istog dana žrtvovanja. Vrijednosti se u oba soja pokusnih životinja normaliziraju petnaestog dana od indukcije kolitisa.

9. Upalne promjene na nivou debelog crijeva reflektiraju se promjenama ispitivanih imunobiokemijskih parametara u mozgu, čime je potvrđen značaj **crijevno-mozgovne osi** u patogenezi upalnih bolesti crijeva u miša.

-
10. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da DPP IV/CD26 posjeduje **neuroimunomodulacijska svojstva** u procesima nastanka i cijeljenja upalne bolesti crijeva u miša.
11. Ova su istraživanja pokazala i potvrdila da je biološka aktivnost istraživanih neuropeptida i interleukina pod izravnom modulacijom DPP IV/CD26. Osim putem katalitičke aktivnosti na sistemskoj i lokalnoj razini, u razvoj i cijeljenje upalnih promjena kolitisa uključeni su i ostali aspekti ove multifunkcionalne molekule.
12. Rezultati dobiveni na životinjskom modelu Crohnove bolesti mogu se upotrijebiti u osmišljavanju novih terapijskih agensa koji bi smanjili intenzitet upalnih promjena, produžili razdoblje remisije i time poboljšali kvalitetu života oboljelih.

7. Literatura

7.Literatura

1. Fatahzadeh M. Inflammatory bowel disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:e1-10.
2. Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12 Suppl 1:S3-9.
3. Geboes K, Colombel JF, Greenstein A i sur. Indeterminate colitis: a review of the concept--what's in a name? *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:850-857.
4. Head K, Jurenka JS. Inflammatory bowel disease. Part II: Crohn's disease--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev* 2004;9:360-401.
5. MacDonald TT, Di Sabatino A, Gordon JN. Immunopathogenesis of Crohn's disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2005;29:S118-124; discussion S124-115, S184-118.
6. Neurath MF. Mucosal immunity in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10 Suppl 1:S29-31.
7. Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 2009;58:1152-1167.
8. Head KA, Jurenka JS. Inflammatory bowel disease Part 1: ulcerative colitis--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev* 2003;8:247-283.
9. Latinne D, Fiasse R. New insights into the cellular immunology of the intestine in relation to the pathophysiology of inflammatory bowel diseases. *Acta Gastroenterol Belg* 2006;69:393-405.
10. Targan SR, Karp LC. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol Rev* 2005;206:296-305.
11. Colletti T. IBD--recognition, diagnosis, therapeutics. *Jaapa* 2004;17:16-18, 21-14.
12. Siegel CA, MacDermott RP. Is chronic pain an extraintestinal manifestation of IBD? *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:769-771.
13. Shah SA, Feller ER. Inflammatory bowel disease. *Medicine and health, Rhode Island* 2009;92:72.
14. van der Zaag-Loonen HJ, Casparie M, Taminiau JA, Escher JC, Pereira RR, Derkx HH. The incidence of pediatric inflammatory bowel disease in the Netherlands: 1999-2001. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38:302-307.
15. Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7:175-184.
16. Wilhelm Fabry (1560-1624)--the Other Fabricius. *Jama* 1964;190:933.
17. Warren S, Sommers SC. Pathology of regional ileitis and ulcerative colitis. *J Am Med Assoc* 1954;154:189-193.
18. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer. *Jama* 1984;251:73-79.
19. Thayer WR, Jr. Crohn's disease (regional enteritis). A look at the last four years. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1970;6:165-185.
20. Baumgart DC, Bernstein CN, Abbas Z i sur. IBD Around the world: Comparing the epidemiology, diagnosis, and treatment: Proceedings of the World Digestive Health Day 2010 - Inflammatory bowel disease task force meeting. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Aug 19. [Epub ahead of print]

-
21. Sands BE. Inflammatory bowel disease: past, present, and future. *J Gastroenterol* 2007;42:16-25.
 22. Sincic Mijandrusic B, Vucelic B, Persic M i sur. Incidence of inflammatory bowel disease in Primorsko-goranska County, Croatia, 2000-2004: A prospective population-based study. *Scand J Gastroenterol* 2006;41:437-444.
 23. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R i sur. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690-697.
 24. Molodecky NA, Kaplan GG. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology & hepatology* 2010;6:339-346.
 25. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369:1627-1640.
 26. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J. The genetics of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2820-2831.
 27. Satsangi J, Morecroft J, Shah NB, Nimmo E. Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:3-18.
 28. Abreu MT. The pathogenesis of inflammatory bowel disease: translational implications for clinicians. *Current gastroenterology reports* 2002;4:481-489.
 29. Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* 1993;34:517-524.
 30. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3:521-533.
 31. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clinical microbiology reviews* 2002;15:79-94.
 32. Noble C, Nimmo E, Gaya D, Russell RK, Satsangi J. Novel susceptibility genes in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006;12:1991-1999.
 33. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H i sur. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
 34. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N i sur. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-606.
 35. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER i sur. Genetics of the innate immune response in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:338-355.
 36. Schenk M, Bouchon A, Birrer S, Colonna M, Mueller C. Macrophages expressing triggering receptor expressed on myeloid cells-1 are underrepresented in the human intestine. *J Immunol* 2005;174:517-524.
 37. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347:417-429.
 38. MacDonald TT. Gastrointestinal inflammation. Inflammatory bowel disease in knockout mice. *Curr Biol* 1994;4:261-263.
 39. Rath HC, Schultz M, Freitag R i sur. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun* 2001;69:2277-2285.
 40. Herfarth HH, Mohanty SP, Rath HC, Tonkonogy S, Sartor RB. Interleukin 10 suppresses experimental chronic, granulomatous inflammation induced by bacterial cell wall polymers. *Gut* 1996;39:836-845.
 41. Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS i sur. Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* 1996;98:945-953.
-

-
42. Cucchiara S, Iebba V, Conte MP, Schippa S. The microbiota in inflammatory bowel disease in different age groups. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 2009;27:252-258.
 43. Farrell RJ, LaMont JT. Microbial factors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology clinics of North America* 2002;31:41-62.
 44. Sanz Y, De Palma G. Gut microbiota and probiotics in modulation of epithelium and gut-associated lymphoid tissue function. *International reviews of immunology* 2009;28:397-413.
 45. Klement E, Lysy J, Hoshen M, Avitan M, Goldin E, Israeli E. Childhood hygiene is associated with the risk for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2008;103:1775-1782.
 46. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Herber A. Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview. *J Physiol Pharmacol* 2009;60 Suppl 6:61-71.
 47. Sands BE, Grabert S. Epidemiology of inflammatory bowel disease and overview of pathogenesis. *Medicine and health, Rhode Island* 2009;92:73-77.
 48. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504-1517.
 49. Sonnenberg A. Occupational mortality of inflammatory bowel disease. *Digestion* 1990;46:10-18.
 50. Kaplan GG, Hubbard J, Korzenik J i sur. The Inflammatory Bowel Diseases and Ambient Air Pollution: A Novel Association. *Am J Gastroenterol*. 2010 Jun 29. [Epub ahead of print]
 51. Bernstein CN, Kraut A, Blanchard JF, Rawsthorne P, Yu N, Walld R. The relationship between inflammatory bowel disease and socioeconomic variables. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2117-2125.
 52. Henderson P, van Limbergen JE, Schwarze J, Wilson DC. Function of the intestinal epithelium and its dysregulation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Jul 19. [Epub ahead of print]
 53. Yamamoto T, Nakahigashi M, Saniabadi AR. Review article: diet and inflammatory bowel disease--epidemiology and treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30:99-112.
 54. Persson PG, Ahlbom A, Hellers G. Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology (Cambridge, Mass)* 1992;3:47-52.
 55. Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition reviews* 2010;68:280-289.
 56. Cosnes J. What is the link between the use of tobacco and IBD? *Inflamm Bowel Dis* 2008;14 Suppl 2:S14-15.
 57. van der Heide F, Dijkstra A, Weersma RK i sur. Effects of active and passive smoking on disease course of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1199-1207.
 58. Carbonnel F, Jantchou P, Monnet E, Cosnes J. Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis: an update. *Gastroenterologie clinique et biologique* 2009;33 Suppl 3:S145-157.
 59. Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:481-496.
 60. Lakatos PL. Environmental factors affecting inflammatory bowel disease: have we made progress? *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 2009;27:215-225.
-

-
61. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955;2:1041-1048.
 62. Best WR, Beckett JM, Singleton JW. Rederived values of the eight coefficients of the Crohn's Disease Activity Index (CDAI). *Gastroenterology* 1979;77:843-846.
 63. Peeters M, Joossens S, Vermeire S, Vlietinck R, Bossuyt X, Rutgeerts P. Diagnostic value of anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:730-734.
 64. de Silva S, Devlin S, Panaccione R. Optimizing the safety of biologic therapy for IBD. *Nature reviews* 2010;7:93-101.
 65. D'Haens GR. Top-down therapy for IBD: rationale and requisite evidence. *Nature reviews* 2010;7:86-92.
 66. Engel MA, Neurath MF. New pathophysiological insights and modern treatment of IBD. *J Gastroenterol* 2010;45:571-583.
 67. Carter MJ, Lobo AJ, Travis SP. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2004;53 Suppl 5:V1-16.
 68. Benchimol EI, Seow CH, Steinhart AH, Griffiths AM. Traditional corticosteroids for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane database of systematic reviews* (Online) 2008:CD006792.
 69. Vucelic B. Inflammatory bowel diseases: controversies in the use of diagnostic procedures. *Digestive diseases* (Basel, Switzerland) 2009;27:269-277.
 70. Travis SP, Stange EF, Lemann M i sur. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* 2006;55 Suppl 1:i16-35.
 71. Rutgeerts P, Van Deventer S, Schreiber S. Review article: the expanding role of biological agents in the treatment of inflammatory bowel disease - focus on selective adhesion molecule inhibition. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1435-1450.
 72. Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S. Review article: Infliximab therapy for inflammatory bowel disease--seven years on. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:451-463.
 73. Shih DQ, Targan SR. Insights into IBD Pathogenesis. *Current gastroenterology reports* 2009;11:473-480.
 74. Blumberg RS. Inflammation in the intestinal tract: pathogenesis and treatment. *Digestive diseases* (Basel, Switzerland) 2009;27:455-464.
 75. Cooney R, Jewell D. The genetic basis of inflammatory bowel disease. *Digestive diseases* (Basel, Switzerland) 2009;27:428-442.
 76. Liu ZJ, Yadav PK, Su JL, Wang JS, Fei K. Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2009;15:5784-5788.
 77. Tsianos EV, Katsanos K. Do we really understand what the immunological disturbances in inflammatory bowel disease mean? *World J Gastroenterol* 2009;15:521-525.
 78. Uhlig HH, Powrie F. Mouse models of intestinal inflammation as tools to understand the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *European journal of immunology* 2009;39:2021-2026.
 79. Wirtz S, Neurath MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Advanced drug delivery reviews* 2007;59:1073-1083.
 80. Scheiffele F, Fuss IJ. Induction of TNBS colitis in mice. *Current protocols in immunology* / edited by John E Coligan [et al 2002;Chapter 15:Unit 15 19.
-

-
81. Peters CA, Cesaretti JA, Stone NN, Stock RG. Low-dose rate prostate brachytherapy is well tolerated in patients with a history of inflammatory bowel disease. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2006;66:424-429.
 82. Broom OJ, Widjaya B, Troelsen J, Olsen J, Nielsen OH. Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease? *Clin Exp Immunol* 2009;158:272-280.
 83. Garg P, Vijay-Kumar M, Wang L, Gewirtz AT, Merlin D, Sitaraman SV. Matrix metalloproteinase-9-mediated tissue injury overrides the protective effect of matrix metalloproteinase-2 during colitis. *American journal of physiology* 2009;296:G175-184.
 84. Mentlein R. Cell-surface peptidases. *Int Rev Cytol* 2004;235:165-213.
 85. Matteucci E, Giampietro O. Dipeptidyl Peptidase-4 (CD26): Knowing the Function before Inhibiting the Enzyme. *Curr Med Chem* 2009;16:2943-2951.
 86. Varljen J, Sincic Mijandrusic B, Baticic L, Varljen N, Detel D, Lekic A. Clinical relevance of the serum dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) activity in adult patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Croatica Chemica Acta* 2005;78:427-432.
 87. Hildebrandt M, Reutter W, Arck P, Rose M, Klapp BF. A guardian angel: the involvement of dipeptidyl peptidase IV in psychoneuroendocrine function, nutrition and immune defence. *Clin Sci (Lond)* 2000;99:93-104.
 88. Hildebrandt M, Rose M, Ruter J, Salama A, Monnikes H, Klapp BF. Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1067-1072.
 89. Bank U, Bohr UR, Reinhold D i sur. Inflammatory bowel diseases: multiple benefits from therapy with dipeptidyl- and alanyl-aminopeptidase inhibitors. *Front Biosci* 2008;13:3699-3713.
 90. Sedo A, Malik R. Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities? *Biochim Biophys Acta* 2001;1550:107-116.
 91. Boonacker E, Van Noorden CJ. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur J Cell Biol* 2003;82:53-73.
 92. Liu Z, Christensson M, Forslow A, De Meester I, Sundqvist KG. A CD26-controlled cell surface cascade for regulation of T cell motility and chemokine signals. *J Immunol* 2009;183:3616-3624.
 93. Vanderheyden M, Bartunek J, Goethals M i sur. Dipeptidyl-peptidase IV and B-type natriuretic peptide. From bench to bedside. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:248-252.
 94. Hopsu-Havu VK, Glenner GG. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie* 1966;7:197-201.
 95. Morrison ME, Vijayasaradhi S, Engelstein D, Albino AP, Houghton AN. A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. *J Exp Med* 1993;177:1135-1143.
 96. Lojda Z. Studies on glycyl-proline naphthylamidase. I. Lymphocytes. *Histochemistry* 1977;54:299-309.
 97. Kullertz G, Fischer G, Barth A. [Catalytic mechanism of dipeptidyl-peptidase IV]. *Acta Biol Med Ger* 1978;37:559-567.
 98. Hanski C, Huhle T, Reutter W. Involvement of plasma membrane dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated adhesion of cells on collagen. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1985;366:1169-1176.
-

-
99. Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory peptides* 1999;85:9-24.
 100. Darmoul D, Lacasa M, Baricault L i sur. Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) gene expression in enterocyte-like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2. Cloning of the complete human coding sequence and changes of dipeptidyl peptidase IV mRNA levels during cell differentiation. *J Biol Chem* 1992;267:4824-4833.
 101. Ishii T, Ohnuma K, Murakami A i sur. CD26-mediated signaling for T cell activation occurs in lipid rafts through its association with CD45RO. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:12138-12143.
 102. Rosenblum JS, Kozarich JW. Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 2003;7:496-504.
 103. Shipp MA, Look AT. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood* 1993;82:1052-1070.
 104. Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 2001;54:249-264.
 105. Fleischer B. CD26: a surface protease involved in T-cell activation. *Immunol Today* 1994;15:180-184.
 106. Munoz E, Blazquez MV, Madueno JA, Rubio G, Pena J. CD26 induces T-cell proliferation by tyrosine protein phosphorylation. *Immunology* 1992;77:43-50.
 107. Chen T, Smyth D, Abbott CA. Cd26. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 2004;18:47-54.
 108. Bednarczyk JL, Carroll SM, Marin C, McIntyre BW. Triggering of the proteinase dipeptidyl peptidase IV (CD26) amplifies human T lymphocyte proliferation. *J Cell Biochem* 1991;46:206-218.
 109. Buhling F, Junker U, Reinhold D, Neubert K, Jager L, Ansorge S. Functional role of CD26 on human B lymphocytes. *Immunol Lett* 1995;45:47-51.
 110. Kahne T, Lendeckel U, Wrenger S, Neubert K, Ansorge S, Reinhold D. Dipeptidyl peptidase IV: a cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (review). *Int J Mol Med* 1999;4:3-15.
 111. Fleischer B, Sturm E, De Vries JE, Spits H. Triggering of cytotoxic T lymphocytes and NK cells via the Tp103 pathway is dependent on the expression of the T cell receptor/CD3 complex. *J Immunol* 1988;141:1103-1107.
 112. Jacobs R, Stoll M, Stratmann G, Leo R, Link H, Schmidt RE. CD16- CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation. *Blood* 1992;79:3239-3244.
 113. Buhling F, Kunz D, Reinhold D i sur. Expression and functional role of dipeptidyl peptidase IV (CD26) on human natural killer cells. *Nat Immun* 1994;13:270-279.
 114. Abbott CA, Baker E, Sutherland GR, McCaughan GW. Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene. *Immunogenetics* 1994;40:331-338.
 115. Bohm SK, Gum JR, Jr., Erickson RH, Hicks JW, Kim YS. Human dipeptidyl peptidase IV gene promoter: tissue-specific regulation from a TATA-less GC-rich sequence characteristic of a housekeeping gene promoter. *Biochem J* 1995;311 (Pt 3):835-843.
 116. Bernard AM, Mattei MG, Pierres M, Marguet D. Structure of the mouse dipeptidyl peptidase IV (CD26) gene. *Biochemistry* 1994;33:15204-15214.
 117. David F, Bernard AM, Pierres M, Marguet D. Identification of serine 624, aspartic acid 702, and histidine 734 as the catalytic triad residues of mouse dipeptidyl-peptidase IV (CD26). A member of a novel family of nonclassical serine hydrolases. *J Biol Chem* 1993;268:17247-17252.
-

-
118. Misumi Y, Hayashi Y, Arakawa F, Ikehara Y. Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface. *Biochim Biophys Acta* 1992;1131:333-336.
 119. Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C. Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends in immunology* 2008;29:295-301.
 120. Engel M, Hoffmann T, Wagner L i sur. The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5063-5068.
 121. Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:1723-1747.
 122. Gorrell MD. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clin Sci (Lond)* 2005;108:277-292.
 123. Bjelke JR, Christensen J, Branner S i sur. Tyrosine 547 constitutes an essential part of the catalytic mechanism of dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem* 2004;279:34691-34697.
 124. Rasmussen HB, Branner S, Wiberg FC, Wagtmann N. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV/CD26 in complex with a substrate analog. *Nat Struct Biol* 2003;10:19-25.
 125. Van Damme J, Struyf S, Wuyts A i sur. The role of CD26/DPP IV in chemokine processing. *Chemical immunology* 1999;72:42-56.
 126. Hoffmann T, Faust J, Neubert K, Ansorge S. Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) and aminopeptidase N (CD 13) catalyzed hydrolysis of cytokines and peptides with N-terminal cytokine sequences. *FEBS letters* 1993;336:61-64.
 127. Vanhoof G, Goossens F, De Meester I, Hendriks D, Scharpe S. Proline motifs in peptides and their biological processing. *Faseb J* 1995;9:736-744.
 128. Lambeir AM, Durinx C, Proost P, Van Damme J, Scharpe S, De Meester I. Kinetic study of the processing by dipeptidyl-peptidase IV/CD26 of neuropeptides involved in pancreatic insulin secretion. *FEBS letters* 2001;507:327-330.
 129. Mentlein R, Dahms P, Grandt D, Kruger R. Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV. *Regulatory peptides* 1993;49:133-144.
 130. Bouras M, Huneau JF, Luengo C, Erlanson-Albertsson C, Tome D. Metabolism of enterostatin in rat intestine, brain membranes, and serum: differential involvement of proline-specific peptidases. *Peptides* 1995;16:399-405.
 131. Nausch I, Mentlein R, Heymann E. The degradation of bioactive peptides and proteins by dipeptidyl peptidase IV from human placenta. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1990;371:1113-1118.
 132. Durinx C, Lambeir AM, Bosmans E i sur. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur J Biochem* 2000;267:5608-5613.
 133. Kato T, Nagatsu T, Fukasawa K, Harada M, Nagatsu I, Sakakibara S. Successive cleavage of N-terminal Arg1--Pro2 and Lys3-Pro4 from substance P but no release of Arg1-Pro2 from bradykinin, by X-Pro dipeptidyl-aminopeptidase. *Biochim Biophys Acta* 1978;525:417-422.
 134. Heymann E, Mentlein R. Liver dipeptidyl aminopeptidase IV hydrolyzes substance P. *FEBS letters* 1978;91:360-364.
 135. Shane R, Wilk S, Bodnar RJ. Modulation of endomorphin-2-induced analgesia by dipeptidyl peptidase IV. *Brain research* 1999;815:278-286.
-

-
136. Oravecz T, Pall M, Roderiquez G i sur. Regulation of the receptor specificity and function of the chemokine RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) by dipeptidyl peptidase IV (CD26)-mediated cleavage. *J Exp Med* 1997;186:1865-1872.
 137. Proost P, De Meester I, Schols D i sur. Amino-terminal truncation of chemokines by CD26/dipeptidyl-peptidase IV. Conversion of RANTES into a potent inhibitor of monocyte chemotaxis and HIV-1-infection. *J Biol Chem* 1998;273:7222-7227.
 138. Shioda T, Kato H, Ohnishi Y i sur. Anti-HIV-1 and chemotactic activities of human stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) and SDF-1beta are abolished by CD26/dipeptidyl peptidase IV-mediated cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6331-6336.
 139. Proost P, Struyf S, Schols D i sur. Truncation of macrophage-derived chemokine by CD26/ dipeptidyl-peptidase IV beyond its predicted cleavage site affects chemotactic activity and CC chemokine receptor 4 interaction. *J Biol Chem* 1999;274:3988-3993.
 140. Struyf S, Proost P, Schols D i sur. CD26/dipeptidyl-peptidase IV down-regulates the eosinophil chemotactic potency, but not the anti-HIV activity of human eotaxin by affecting its interaction with CC chemokine receptor 3. *J Immunol* 1999;162:4903-4909.
 141. Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem* 1993;214:829-835.
 142. Bongers J, Lambros T, Ahmad M, Heimer EP. Kinetics of dipeptidyl peptidase IV proteolysis of growth hormone-releasing factor and analogs. *Biochim Biophys Acta* 1992;1122:147-153.
 143. Drucker DJ, Shi Q, Crivici A i sur. Regulation of the biological activity of glucagon-like peptide 2 in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Nature biotechnology* 1997;15:673-677.
 144. Wang XM, Yu DM, McCaughan GW, Gorrell MD. Extra-enzymatic roles of DPIV and FAP in cell adhesion and migration on collagen and fibronectin. *Adv Exp Med Biol* 2006;575:213-222.
 145. Martinez-Navio JM, Climent N, Pacheco R i sur. Immunological dysfunction in HIV-1-infected individuals caused by impairment of adenosine deaminase-induced costimulation of T-cell activation. *Immunology* 2009;128:393-404.
 146. Pang R, Law WL, Chu AC i sur. A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell* 2010;6:603-615.
 147. Ansorge S, Bank U, Heimbürg A i sur. Recent insights into the role of dipeptidyl aminopeptidase IV (DPIV) and aminopeptidase N (APN) families in immune functions. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:253-261.
 148. Reinhold D, Goihl A, Wrenger S i sur. Review: Role of dipeptidyl peptidase IV (DP IV)-like enzymes in T lymphocyte activation: investigations in DP IV/CD26-knockout mice. *Clin Chem Lab Med* 2009.
 149. De Meester I, Scharpe S, Lambeir AM. Dipeptidyl peptidases and related proteins: multifaceted markers and therapeutic targets. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:245-247.
 150. Schon E, Eichmann E, Grunow R i sur. Dipeptidyl peptidase IV in human T lymphocytes. An approach to the role of a membrane peptidase in the immune system. *Biomed Biochim Acta* 1986;45:1523-1528.
-

-
151. Reinhold D, Kahne T, Steinbrecher A i sur. The role of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) enzymatic activity in T cell activation and autoimmunity. *Biol Chem* 2002;383:1133-1138.
 152. Franco R, Valenzuela A, Lluís C, Blanco J. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol Rev* 1998;161:27-42.
 153. Pacheco R, Martínez-Navio JM, Lejeune M i sur. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9583-9588.
 154. Weihofen WA, Liu J, Reutter W, Saenger W, Fan H. Crystal structure of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in complex with adenosine deaminase reveals a highly amphiphilic interface. *J Biol Chem* 2004;279:43330-43335.
 155. Van der Veken P, Haemers A, Augustyns K. Prolyl peptidases related to dipeptidyl peptidase IV: potential of specific inhibitors in drug discovery. *Current topics in medicinal chemistry* 2007;7:621-635.
 156. Levy MT, McCaughan GW, Abbott CA i sur. Fibroblast activation protein: a cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis. *Hepatology* 1999;29:1768-1778.
 157. Henry LR, Lee HO, Lee JS i sur.. Clinical implications of fibroblast activation protein in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:1736-1741.
 158. Rettig WJ, Garin-Chesa P, Healey JH i sur. Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin. *Cancer Res* 1993;53:3327-3335.
 159. Niedermeyer J, Kriz M, Hilberg F i sur. Targeted disruption of mouse fibroblast activation protein. *Mol Cell Biol* 2000;20:1089-1094.
 160. Abbott CA, Yu DM, Woollatt E, Sutherland GR, McCaughan GW, Gorrell MD. Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. *Eur J Biochem* 2000;267:6140-6150.
 161. Dubois V, Van Ginneken C, De Cock H i sur. Enzyme activity and immunohistochemical localization of dipeptidyl peptidase 8 and 9 in male reproductive tissues. *J Histochem Cytochem* 2009;57:531-541.
 162. Thompson MA, Ohnuma K, Abe M, Morimoto C, Dang NH. CD26/dipeptidyl peptidase IV as a novel therapeutic target for cancer and immune disorders. *Mini Rev Med Chem* 2007;7:253-273.
 163. Aytac U, Dang NH. CD26/dipeptidyl peptidase IV: a regulator of immune function and a potential molecular target for therapy. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2004;4:11-18.
 164. Yazbeck R, Howarth GS, Abbott CA. Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? *Trends in pharmacological sciences* 2009;30:600-607.
 165. Blonde L. Current antihyperglycemic treatment strategies for patients with type 2 diabetes mellitus. *Cleveland Clinic journal of medicine* 2009;76 Suppl 5:S4-11.
 166. Campbell RK, Neumiller JJ, White J, Sisson E, Kuhn C. Type 2 diabetes: epidemiology and treatment, pathophysiology, new therapeutics, and the evolving role of the pharmacist. *J Am Pharm Assoc (2003)* 2009;49 Suppl 1:S2.
 167. Palalau AI, Tahrani AA, Piya MK, Barnett AH. DPP-4 inhibitors in clinical practice. *Postgrad Med* 2009;121:70-100.
 168. 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;40:209-294.
-

-
169. Ahren B. GLP-1-based therapy of type 2 diabetes: GLP-1 mimetics and DPP-IV inhibitors. *Current diabetes reports* 2007;7:340-347.
 170. Lupi R, Del Guerra S, D'Aleo V, Boggi U, Filipponi F, Marchetti P. The direct effects of GLP-1 and GIP, alone or in combination, on human pancreatic islets. *Regulatory peptides*. 2010 May 19. [Epub ahead of print].
 171. Romijn JA, Corssmit EP, Havekes LM, Pijl H. Gut-brain axis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11:518-521.
 172. Margolis KG, Gershon MD. Neuropeptides and inflammatory bowel disease. *Current opinion in gastroenterology* 2009;25:503-511.
 173. Levite M, Chowder Y. Nerve-driven immunity: neuropeptides regulate cytokine secretion of T cells and intestinal epithelial cells in a direct, powerful and contextual manner. *Ann Oncol* 2001;12 Suppl 2:S19-25.
 174. Dockray GJ. The G.L. Brown lecture. Regulatory peptides and the neuroendocrinology of gut-brain relations. *Quarterly journal of experimental physiology (Cambridge, England)* 1988;73:703-727.
 175. Scharrer B. Neurosecretion -- comparative and evolutionary aspects. *Progress in brain research* 1976;45:125-137.
 176. Tatemoto K. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:5485-5489.
 177. Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y-a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 1982;296:659-660.
 178. Gehlert DR. Introduction to the reviews on neuropeptide Y. *Neuropeptides* 2004;38:135-140.
 179. Larhammar D. Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regulatory peptides* 1996;62:1-11.
 180. Cerda-Reverter JM, Larhammar D. Neuropeptide Y family of peptides: structure, anatomical expression, function, and molecular evolution. *Biochemistry and cell biology* 2000;78:371-392.
 181. Monks SA, Karagianis G, Howlett GJ, Norton RS. Solution structure of human neuropeptide Y. *Journal of biomolecular NMR* 1996;8:379-390.
 182. Thorsell A, Heilig M. Diverse functions of neuropeptide Y revealed using genetically modified animals. *Neuropeptides* 2002;36:182-193.
 183. Chandrasekharan B, Bala V, Kolachala VL i sur. Targeted deletion of neuropeptide Y (NPY) modulates experimental colitis. *PloS one* 2008;3:e3304.
 184. Dimitrijevic M, Stanojevic S, Mitic K i sur. The anti-inflammatory effect of neuropeptide Y (NPY) in rats is dependent on dipeptidyl peptidase 4 (DP4) activity and age. *Peptides* 2008;29:2179-2187.
 185. Said SI, Mutt V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science* 1970;169:1217-1218.
 186. Linder S, Barkhem T, Norberg A i sur. Structure and expression of the gene encoding the vasoactive intestinal peptide precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:605-609.
 187. Pozo D, Delgado M. The many faces of VIP in neuroimmunology: a cytokine rather a neuropeptide? *Faseb J* 2004;18:1325-1334.
 188. Mutt V. Chemistry of the gastrointestinal hormones and hormone-like peptides and a sketch of their physiology and pharmacology. *Vitamins and hormones* 1982;39:231-427.
 189. Delgado M, Pozo D, Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacological reviews* 2004;56:249-290.
-

-
190. Ceraudo E, Murail S, Tan YV i sur. The vasoactive intestinal peptide (VIP) alpha-Helix up to C terminus interacts with the N-terminal ectodomain of the human VIP/Pituitary adenylate cyclase-activating peptide 1 receptor: photoaffinity, molecular modeling, and dynamics. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md 2008;22:147-155.
 191. Dickson L, Finlayson K. VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol Ther* 2009;121:294-316.
 192. O'Morain C, Bishop AE, McGregor GP i sur. Vasoactive intestinal peptide concentrations and immunocytochemical studies in rectal biopsies from patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1984;25:57-61.
 193. Pozo D, Gonzalez-Rey E, Chorny A, Anderson P, Varela N, Delgado M. Tuning immune tolerance with vasoactive intestinal peptide: a new therapeutic approach for immune disorders. *Peptides* 2007;28:1833-1846.
 194. Arranz A, Abad C, Juarranz Y, Leceta J, Martinez C, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide as a healing mediator in Crohn's disease. *Neuroimmunomodulation* 2008;15:46-53.
 195. Song C, Wang H. Cytokines mediated inflammation and decreased neurogenesis in animal models of depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2010 Jun 30. [Epub ahead of print]
 196. Stanley AC, Lacy P. Pathways for cytokine secretion. *Physiology* (Bethesda, Md 2010;25:218-229.
 197. Ding C, Cicuttini F, Li J, Jones G. Targeting IL-6 in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18:1457-1466.
 198. Rose-John S, Mitsuyama K, Matsumoto S, Thaiss WM, Scheller J. Interleukin-6 trans-signaling and colonic cancer associated with inflammatory bowel disease. *Current pharmaceutical design* 2009;15:2095-2103.
 199. Ito H. IL-6 and Crohn's disease. *Current drug targets* 2003;2:125-130.
 200. Rennick DM, Fort MM. Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10^{-/-}) mice and intestinal inflammation. *American journal of physiology* 2000;278:G829-833.
 201. Lindsay J, Van Montfrans C, Brennan F i sur. IL-10 gene therapy prevents TNBS-induced colitis. *Gene therapy* 2002;9:1715-1721.
 202. Braat H, Rottiers P, Hommes DW i sur. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:754-759.
 203. Hartel-Schenk S, Gossrau R, Reutter W. Comparative immunohistochemistry and histochemistry of dipeptidyl peptidase IV in rat organs during development. *Histochem J* 1990;22:567-578.
 204. El-Karim I, Lundy FT, Linden GJ, Lamey PJ. Extraction and radioimmunoassay quantitation of neuropeptide Y (NPY) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) from human dental pulp tissue. *Archives of oral biology* 2003;48:249-254.
 205. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976;72:248-254.
 206. Ahnen DJ, Santiago NA, Cezard JP, Gray GM. Intestinal aminooligopeptidase. In vivo synthesis on intracellular membranes of rat jejunum. *J Biol Chem* 1982;257:12129-12135.
 207. Kreisel W, Heussner R, Volk B, Buchsel R, Reutter W, Gerok W. Identification of the 110000 Mr glycoprotein isolated from rat liver plasma membrane as dipeptidylaminopeptidase IV. *FEBS letters* 1982;147:85-88.
-

-
208. Yan S, Marguet D, Dobers J, Reutter W, Fan H. Deficiency of CD26 results in a change of cytokine and immunoglobulin secretion after stimulation by pokeweed mitogen. *European journal of immunology* 2003;33:1519-1527.
 209. Marguet D, Baggio L, Kobayashi T i sur. Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6874-6879.
 210. Grisham MB, Volkmer C, Tso P, Yamada T. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. *Gastroenterology* 1991;101:540-547.
 211. Rose M, Walter OB, Fliege H, Hildebrandt M, Monnikes H, Klapp BF. DPP IV and mental depression in Crohn's disease. *Adv Exp Med Biol* 2003;524:321-331.
 212. Costa-Pinto FA, Palermo-Neto J. Neuroimmune interactions in stress. *Neuroimmunomodulation* 2010;17:196-199.
 213. Ohman L, Simren M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nature reviews* 2010;7:163-173.
 214. Naito Y, Yoshikawa T. Role of matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease. *Molecular aspects of medicine* 2005;26:379-390.
 215. Detel D, Persic M, Varljen J. Serum and intestinal dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) activity in children with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;45:65-70.
 216. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European journal of immunology* 2010;40:1830-1835.
 217. Gay J, Kokkotou E, O'Brien M, Pothoulakis C, Karalis KP. Interleukin-6 genetic ablation protects from trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. Putative effect of antiinflammatory cytokines. *Neuroimmunomodulation* 2006;13:114-121.
 218. Ito H. Novel therapy for Crohn's disease targeting IL-6 signalling. *Expert opinion on therapeutic targets* 2004;8:287-294.
 219. Mahler M, Most C, Schmidtke S i sur. Genetics of colitis susceptibility in IL-10-deficient mice: backcross versus F2 results contrasted by principal component analysis. *Genomics* 2002;80:274-282.
 220. Correa I, Veny M, Esteller M i sur. Defective IL-10 production in severe phenotypes of Crohn's disease. *Journal of leukocyte biology* 2009;85:896-903.
 221. Jonsson M, Norrgard O, Hansson M, Forsgren S. Decrease in binding for the neuropeptide VIP in response to marked inflammation of the mucosa in ulcerative colitis. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1107:280-289.
 222. Umemoto N, Kakurai M, Okazaki H, Kiyosawa T, Demitsu T, Nakagawa H. Serum levels of vasoactive intestinal peptide are elevated in patients with atopic dermatitis. *Journal of dermatological science* 2003;31:161-164.
 223. Hassani H, Lucas G, Rozell B, Ernfors P. Attenuation of acute experimental colitis by preventing NPY Y1 receptor signaling. *American journal of physiology* 2005;288:G550-556.
 224. Straub RH, Herfarth H, Falk W, Andus T, Scholmerich J. Uncoupling of the sympathetic nervous system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in inflammatory bowel disease? *Journal of neuroimmunology* 2002;126:116-125.
 225. Hernanz A, Tato E, De la Fuente M, de Miguel E, Arnalich F. Differential effects of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y, somatostatin and vasoactive intestinal peptide on interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production by whole blood cells from healthy young and old subjects. *Journal of neuroimmunology* 1996;71:25-30.
-

-
226. De Meester I, Korom S, Van Damme J, Scharpe S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol Today* 1999;20:367-375.
 227. Ansorge S, Schon E, Kunz D. Membrane-bound peptidases of lymphocytes: functional implications. *Biomed Biochim Acta* 1991;50:799-807.
 228. Ludwig A, Schiemann F, Mentlein R, Lindner B, Brandt E. Dipeptidyl peptidase IV (CD26) on T cells cleaves the CXC chemokine CXCL11 (I-TAC) and abolishes the stimulating but not the desensitizing potential of the chemokine. *Journal of leukocyte biology* 2002;72:183-191.
 229. Willheim M, Ebner C, Baier K i sur. Cell surface characterization of T lymphocytes and allergen-specific T cell clones: correlation of CD26 expression with T(H1) subsets. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:348-355.
 230. Cordero OJ, Salgado FJ, Vinuela JE, Nogueira M. Interleukin-12 enhances CD26 expression and dipeptidyl peptidase IV function on human activated lymphocytes. *Immunobiology* 1997;197:522-533.
 231. Steinbrecher A, Reinhold D, Quigley L i sur. Targeting dipeptidyl peptidase IV (CD26) suppresses autoimmune encephalomyelitis and up-regulates TGF-beta 1 secretion in vivo. *J Immunol* 2001;166:2041-2048.
 232. Yazbeck R, Howarth GS, Geier MS, Demuth HU, Abbott CA. Inhibiting dipeptidyl peptidase activity partially ameliorates colitis in mice. *Front Biosci* 2008;13:6850-6858.
 233. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Eur J Biochem* 1984;138:9-37.

Prilog: Kratice aminokiselina

U ovom su radu korištene međunarodne kratice aminokiselina, prema međunarodnim pravilima IUPAC-a (engl. *International Union for Pure and Applied Chemistry*) te IUPAC-IUB-a (*Joint Commission on Biochemical Nomenclature*) nomenklature (233).

Tablica 9. Kratice aminokiselina

Puni naziv aminokiseline	Troslovna kratica aminokiseline	Jednoslovna oznaka aminokiseline
Aminokiselina općenito	Xaa	X
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginska kiselina (aspartat)	Asp	D
Cistein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminska kiselina (glutamate)	Glu	E
Glicin	Gly	G
Histidin	His	H
Izoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lizin	Lys	K
Metionin	Met	M
Fenilalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Treonin	Thr	T
Triptofan	Trp	W
Tirozin	Tyr	Y
Valin	Val	V
Asparaginska kiselina ili asparagin	Asx	B
Glutaminska kiselina ili glutamin	Glx	Z

Životopis

ŽIVOTOPIS

Lara Batičić

Datum i mjesto rođenja:

01. listopada 1981., Pula, Republika Hrvatska

Ustanova zaposlenja:

Zavod za kemiju i biokemiju
Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci
Braće Branchetta 20
51000 Rijeka

Matični broj znanstvenika: 270002

E-mail: lbaticic@medri.hr

Obrazovanje: 1988.-1996. – Osnovna škola, Labin
1996.-2000. – Opća gimnazija, Labin
2000.-2004. – Medicinski fakultet Rijeka,
diploma Studija diplomiranih sanitarnih inženjera
2004.-2007. – Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,
Poslijediplomski znanstveni studij «Biomedicina»,
2008. – Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,
magistar biomedicinskih znanosti

Zaposlenja: od 2004. – Znanstveni novak u suradničkom zvanju asistent na znanstvenom projektu broj 061-0061245-0213 (Uloga dipeptidil-peptidaze IV (CD26/DPP IV) u kroničnim bolestima), voditeljica projekta prof.dr.sc. Jadranka Varljen. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Zavod za kemiju i biokemiju.

Usavršavanje u inozemnim institucijama:

Godina 2003. Sofija, Republika Bugarska

Ustanova: Medical University of Sofia Medical Faculty, Chair of Clinical Laboratory and Clinical immunology

Područje: Biomedicinske znanosti

Trajanje: 1 mjesec

Godina 2004. Prag, Republika Češka

Ustanova: Charles University Prague, First Medical Faculty, Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics

Područje: Biomedicinske znanosti

Trajanje: 2 mjeseca

Poslijediplomski tečaj:

„New Trends in Classification, Monitoring and Management of Autoimmune Diseases», Inter-University centre, Dubrovnik, Hrvatska, 15.-16. listopada 2005.

Prisustvovanje na ljetnim školama:

1. «7th CROPBSA-CEEPUS Summer University on Tumors – a Multidisciplinary approach», Zadar, 21.-28. srpanj 2004.
2. «8th CROPBSA Summer School on Hypertension», Obonjan, 7.-14. kolovoz 2004.
3. «9th CROPBSA Summer School on Inflammation, Multidisciplinary Approach», Zadar, 24.-31. srpanj 2006.
4. Ninth International Summer School on Biophysics-Supramolecular Structure and Function, Rovinj, rujan 2006.

Sudjelovanje na znanstvenim i stručnim simpozijima:

1. Convegno “Basta celiachia; ancora celiachia!”, Università degli studi di Trieste, Padriciano, Trst, Italija, 23. siječanj 2004.
2. “The Workshop on Autoimmunity and Cell Biology”, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prag, Češka Republika, 30. kolovoz 2004.
3. Convegno «Faccia e...anima della celiachia», Università degli studi di Trieste, Padriciano, Trst, Italija, 20. siječanj 2006.
4. Simpozij «Statistička metodologija znanstvenog istraživanja», Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, Zagreb, Hrvatska, 28. siječanj 2006.
5. Convegno „Celiachia di qua e di là dal mare“, Università degli studi di Trieste, Padriciano, Trst, Italija, 25. siječanj 2008.

Hrvatska znanstvena bibliografija (CROSBİ)

<http://bib.irb.hr/lista-radova?autor=270002&print=true>

Lara Batičić

(270002)

Poglavlja u knjizi (1)
Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima (8)
Znanstveni radovi u drugim časopisima (3)
Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu (3)
Radovi u postupku objavljivanja (1)
Drugi radovi u zbornicima skupova s recenzijom (1)
Sažeci u zbornicima skupova (19)
Magistarski rad (1)
Diplomski rad (1)

Poglavlja u knjizi:

1. Batičić, Lara; Detel, Dijana; Varljen, Jadranka.
CD26/dipeptidyl peptidase IV and chronic inflammatory diseases // Biochemistry and Immunology Intersections / Markotić, Anita (ur.).
Kerala, Indija : Research Signpost, 2008. Str. 83-98.

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u časopisima koje citira *Current Contents*:

1. **Batičić, Lara**; Varljen, Neven; Žuvić Butorac, Marta; Kapović, Miljenko; Varljen, Jadranka. Potential Value of Hepatic Lipids from White Sea Bream (*Diplodus sargus*, L.) as a Good Source of Biomedical Components: Seasonal Variations. // Food Technology and Biotechnology. 47 (2009), 3 Special Issue; 260-268 (članak, znanstveni).
2. **Batičić, Lara**; Detel, Dijana; Varljen, Jadranka. Age Dependent Changes in Activity of Intestinal Disaccharidases and Alkaline Phosphatase Activity in CD26 Deficient Mice. // Croatica Chemica Acta. 81 (2008), 1; 59-65 (članak, znanstveni).
3. Detel, Dijana; **Batičić, Lara**; Varljen, Jadranka. The Influence of Age on Intestinal Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV/CD26), Disaccharidases and Alkaline Phosphatase Enzyme Activity in C57Bl/6 Mice. // Experimental Aging Research. 34 (2008); 49-62 (članak, znanstveni).
4. Varljen, Jadranka; **Batičić, Lara**; Sinčić-Modrić, Gordana; Varljen, Neven; Kapović, Miljenko. Liver and Muscle Tissue Fatty Acid Composition of the Lipid Fractions of *Diplodus vulgaris* from the North Adriatic Sea, Croatia. // Journal of food lipids. 12 (2005), 4; 286-298 (članak, znanstveni).

5. Varljen, Jadranka; Detel, Dijana; **Batičić, Lara**; Eraković, Vesna; Štrbo, Nataša; Ćuk, Mira; Milin, Čedomila. Age dependent activity of brush-border enzymes in BALB/c mice. // *Croatica chemica acta*. 78 (2005), 3; 379-432 (članak, znanstveni).

6. Varljen, Jadranka; Mijandrušić Sinčić, Brankica; **Batičić, Lara**; Varljen, Neven; Detel, Dijana; Lekić, Andrica. Clinical relevance of the serum dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) activity in adult patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. // *Croatica chemica acta*. 78 (2005), 3; 427-432 (članak, znanstveni).

7. Varljen, Jadranka; **Batičić, Lara**; Sinčić-Modrić, Gordana; Obersnel, Vojko; Kapović, Miljenko. Composition and Seasonal Variation of Fatty Acids of *Diplodus vulgaris* L. from the Adriatic Sea. // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 81 (2004), 8; 759-763 (članak, znanstveni).

8. Varljen, Jadranka; Šulić, Sanda; Brmalj, Jasminka; **Batičić, Lara**; Obersnel, Vojko; Kapović, Miljenko. Lipid Classes and Fatty Acid Composition of *Diplodus vulgaris* and Conger conger Originating from the Adriatic Sea. // *Food Tehnology and Biotehnology*. 41 (2003), 2; 149-156 (članak, znanstveni).

Znanstveni radovi u drugim časopisima:

1. Varljen, Jadranka; **Batičić, Lara**; Detel, Dijana; Varljen, Neven; Mijandrušić Sinčić, Brankica. Clinical relevance of the serum dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) activity in adult patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. // *The FEBS journal*. 272 (2005.), S2; 492-492 (kongresno priopćenje, znanstveni).

2. Varljen, Jadranka; **Batičić, Lara**; Varljen, Neven; Detel, Dijana; Mijandrušić-Sinčić, Brankica. Clinical relevance of the serum dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) activity in patients with inflammatory bowel diseases. // *Canadian journal of gastroenterology*. 19 (2005), Suppl. C; R0428-R0428 (kongresno priopćenje, znanstveni).

3. **Batičić, Lara**; Varljen, Jadranka; Sinčić-Modrić, Gordana; Obersnel, Vojko; Kapović, Miljenko. Influence of Pollution on Lipid Content and Fatty Acid Composition of *Diplodus vulgaris*, L. from the Adriatic Sea. // *Chemistry and physics of lipids*. 130 (2004), 1; 54-54 (kongresno priopćenje, znanstveni).

Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu:

1. Varljen, Jadranka; **Batičić, Lara**; Detel, Dijana; Varljen, Neven; Mijandrušić Sinčić, Brankica. Correlation of Age and Serum Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV/CD26) Activity in Patients with Inflammatory Bowel Diseases // *Journal of Crohn's & Colitis ; Abstracts of the 4th Congress of ECCO - the European Crohn's and Colitis Organisation*. Hamburg, Njemačka: European Crohn's and Colitis Organisation, 2009. 129-129 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

2. **Batičić, Lara**; Detel, Dijana; Kehler, Tatjana; Varljen, Neven; Varljen, Jadranka. Enzyme Activity of Serum Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV/CD26) in Rheumatoid Arthritis // The FEBS Journal 274 (2007) ; Abstracts of the 32nd FEBS Congress Molecular Machines / Richard Perharm (ur.). Oxford: Blackwell Publishing, 2007. 284-284 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

3. Detel, Dijana; **Batičić, Lara**; Mrakovčić-Šutić, Ines; Varljen, Jadranka. Phenotypic Analysis of Lymphatic Organs in CD26 Deficient Mice // The FEBS Journal 274 (2007) ; Abstracts of the 32nd FEBS Congress : Molecular Machines / Richard Perharm (ur.). Oxford: Blackwell Publishing, 2007. 294-294 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Radovi u postupku objavljivanja:

1. Dijana Detel, Tatjana Kehler, Sunčica Ostojić, Irena Pavačić, **Lara Batičić**, Neven Varljen and Jadranka Varljen. Is dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) activity associated with inflammation present in human rheumatoid arthritis and spondyloarthropaties? // The Journal of Rheumatology. (2010).

Drugi radovi u zbornicima skupova s recenzijom:

1. **Batičić, Lara**; Detel, Dijana; Varljen, Neven; Mijandrušić-Sinčić, Brankica; Varljen, Jadranka. Serum Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV/CD26) Activity in Patients with Inflammatory Bowel Diseases // Abstract book of the 9th CEEPUS-Biomedicine Students' Council Summer University on Inflammation, Multidisciplinary Approach / Juretić, Dubravka (ur.). Zagreb : Students' Council, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 2006. 41-41 (predavanje, domaća recenzija, objavljeni rad, znanstveni).

Sažeci u zbornicima skupova:

1. **Batičić, Lara**; Detel, Dijana; Varljen, Neven; Peršić, Mladen; Mijandrušić Sinčić, Brankica; Varljen, Jadranka. Correlation of Age and Serum Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV/CD26) Activity in Patients with Inflammatory Bowel Diseases // Book of Abstracts of EMBO Young Scientists Forum / Faculty of Science, Zagreb University (ur.). Zagreb: Faculty of Science, Zagreb University, 2009. 7-7 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

2. Detel, Dijana; Kučić, Natalia; **Batičić, Lara**; Ostojić Sunčica; Varljen, Jadranka. Activation of NK and NKT cells during experimental colitis in CD26 deficient mice // The FEBS Journal ; 34th FEBS Congress "Lifes Molecular Interactions". Prag, 2009. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

-
3. Detel, Dijana; Kučić, Natalia; **Batičić, Lara**; Ostojić, Sunčica; Varljen, Jadranka. Activation of NK and NKT Cells during Experimental Colitis in CD26 Deficient Mice // Book of Abstracts of EMBO Young Scientist Forum / Faculty of Science, Zagreb University (ur.). Zagreb: Faculty of Science, Zagreb University, 2009. 40-41 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
4. Ostojić, Sunčica; **Batičić, Lara**; Varljen, Neven; Kapović, Miljenko; Varljen, Jadranka. Fatty Acid Composition of *Diplodus Vulgaris*, L. from the Kvarner Bay // Knjiga sažetaka XXI. Hrvatskog skupa kemičara i kemijskih inženjera / Pičuljan, Katarina ; Smolec, Sonja (ur.). Kutina: Hrvatsko kemijsko društvo, 2009. 154-154 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
5. **Batičić, Lara**; Detel, Dijana; Pavačić, Irena; Varljen, Neven; Mijandrušić Sinčić, Brankica; Varljen, Jadranka. Serum Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV/CD26) Activity in Patients With Inflammatory Bowel Diseases – A New Diagnostic Marker? // Book of Abstracts of the Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology with international participation, HDBMB2008 / Strelec, Ivica; Glavaš-Obrovac, Ljubica (ur.). Osijek: Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju, 2008. 48-48 (predavanje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
6. **Batičić, Lara**; Detel, Dijana; Varljen, Neven; Kehler, Tatjana; Mijandrušić Sinčić, Brankica; Varljen, Jadranka. Evaluation of Serum Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV/CD26) Activity in Patients with Chronic Diseases // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine / Gerard Siest (ur.). Berlin/New York: Walter de Gruyter, 2008. A21-A21 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
7. **Batičić, Lara**; Varljen, Neven; Žuvić Butorac, Marta; Kapović, Miljenko; Varljen, Jadranka. Seasonal Variations in the Hepatic Fatty Acid Compositions of *Diplodus Sargus* Captured in the North Adriatic Sea, Croatia // Book of Abstracts of the Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology with international participation, HDBMB2008 / Strelec, Ivica; Glavaš-Obrovac, Ljubica (ur.). Osijek: Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju, 2008. 65-65 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
8. Detel, Dijana; Kučić, Natalia; **Batičić, Lara**; Varljen, Jadranka. Possible Modulating Role of CD26 in Immune Response During Colitis Development in Mice // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine / Gerard Siest (ur.). Berlin/New York: Walter de Gruyter, 2008. A24-A24 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
9. **Batičić, Lara**; Detel, Dijana; Kehler, Tatjana; Varljen, Neven; Jadranka Varljen. Enzyme Activity of Serum Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV/CD26) in Rheumatoid Arthritis // The FEBS Journal / Perham, Richard (ur.). Vienna: Blackwell Publishing, Oxford, 2007. 284-284 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
10. **Batičić, Lara**; Detel, Dijana; Varljen, Neven; Mijandrušić Sinčić, Brankica; Varljen, Jadranka. Age-related Changes in the Serum Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV/CD26) Activity in Patients with Inflammatory Bowel Diseases // Falk Symposium 159: IBD 2007: Achievements in Research and Clinical Practice : Book of abstracts / U. Dagli (ur.). Istanbul: Falk Foundation, 2007. 123-123 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
-

11. **Batičić, Lara**; Detel, Dijana; Varljen, Jadranka. The influence of age on intestinal dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26), disaccharidases and alkaline phosphatase enzyme activity in C57Bl/6 mice // Book of Abstracts of the Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology / Kovarik, Zrinka (ur.). Zagreb: Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju, 2006. 87-87 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

12. **Batičić, Lara**; Detel, Dijana; Varljen, Neven; Mijandrušić Sinčić, Brankica; Varljen, Jadranka. Age-related changes in serum dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) activity in patients with inflammatory bowel diseases // Book of Abstracts of the Ninth International Summer School on Biophysics-Supramolecular Structure and Function / Pifat-Mrzljak, Greta; Ilakovac Kveder, Marina (ur.). Zagreb: Institut Ruđer Bošković, 2006. 98-98 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

13. Detel, Dijana; Peršić, Mladen; **Batičić, Lara**; Varljen, Jadranka. Serum and intestinal dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) activity in children with celiac disease // Book of Abstracts of the Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology/Kovarik, Zrinka (ur.). Zagreb: Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju, 2006. 78 (predavanje, domaća recenzija, sažetak, stručni).

14. Varljen, Jadranka; **Batičić, Lara**; Detel, Dijana; Varljen, Neven; Mijandrušić Sinčić, Brankica. The serum dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) activity in patients with Crohn's disease // Book of abstracts of the 4th Congress of the Croatian Society of Gastroenterology with international participation. Zagreb: Hrvatsko gastroenterološko društvo, 2006. 13-13 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

15. Varljen, Jadranka; **Batičić, Lara**; Detel, Dijana; Varljen, Neven; Mijandrušić Sinčić, Brankica. Age-related changes in the serum dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) activity in patients with inflammatory bowel diseases // Abstract book of the 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Osaka, 2006. 461-461 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

16. Varljen, Jadranka; **Batičić, Lara**; Sinčić-Modrić, Gordana; Varljen, Neven; Kapović, Miljenko. Neutral and polar lipid fractions fatty acid compositions of *Diplodus vulgaris* liver and muscle tissue // XIX. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera: knjiga sažetaka / Rapić, Vladimir; Rogošić, Marko (ur.). Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa; Hrvatsko društvo Kemija u industriji, 2005. 269-269 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

17. Varljen, Jadranka; **Batičić, Lara**; Sinčić-Modrić, Gordana; Varljen, Neven; Kapović, Miljenko. Fatty Acid Compositions of Neutral and Polar Lipid Fractions from the Liver of the White Seabream, *Diplodus sargus*, L. // Abstracts of the 26th world congress of the international society for fat research (ISF). USA: AOCS, 2005. 28-28 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

18. Varljen, Jadranka; **Batičić, Lara**; Sinčić-Modrić, Gordana; Obersnel, Vojko; Kapović, Miljenko. Fatty Acid Composition of *Diplodus vulgaris* L. from the Kvarner Bay, North Adriatic Sea // Book of abstracts of the 2nd Central European Meeting and 5th Croatian Congress of Food Technologists, Biotechnologists, and Nutritionists / Karlović, Damir (ur.). Zagreb: Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists Society, 2004. 154-154 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

19. Varljen, Jadranka; Detel, Dijana; **Batičić, Lara**; Eraković, Vesna; Štrbo, Nataša; Čuk, Mira; Milin, Čedomila. Age Dependent Activity of Brush-border Enzymes in BALB/c Mice // Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology with International Participation : book of abstracts / Dumić, Jerka (ur.). Zagreb: Faculty of Pharmacy and Biochemistry, 2004. 130-130 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

Magistarski rad:

Batičić, Lara: „Klinička značajnost određivanja aktivnosti serumske dipeptidil-peptidaze IV (DPP IV/CD26) u oboljelih od upalnih bolesti crijeva“ / magistarski rad.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Mentor: prof.dr.sc. Jadranka Varljen

Datum obrane magistarskog rada: 15. 04. 2008.

Diplomski rad:

Batičić, Lara: „Utjecaj godišnjeg doba na sastav masnih kiselina u lipidima mesa fratara (*Diplodus vulgaris*, L.)“ / diplomski rad.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Mentor: prof.dr.sc. Jadranka Varljen

Datum obrane diplomskog rada: 16. 07. 2004.