

# Učinak azitromicina na ekspresiju TLR-4, TNFalfa i TGFbeta u crijevnoj sluznici miševa s eksperimentalnim kolitisom

---

Pleško, Sanja

Doctoral thesis / Disertacija

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:535092>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Sanja Pleško**

Učinak azitromicina na ekspresiju TLR-4, TNFalfa i  
TGFbeta u crijevnoj sluznici miševa s  
eksperimentalnim kolitisom

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2011.**

Disertacija je izrađena u Zavodu za patologiju Kliničke bolnice Dubrava,

Voditelj rada: prof. dr. sc. Branimir Anić

## Zahvale

Savjeti, pomoć i poticaj mentora prof. dr. sc. Branimira Anića u stvaranju rada uvelike su mi pomogli, na čemu se posebice zahvaljujem.

Posebno se zahvaljujem prof. dr. sc. Vandi Plečko na nesebičnim konzultacijama i brojnim stručnim savjetima.

Tijekom izrade disertacije Željko Ferenčić i Svetlana Antonini jačali su me prijateljskom pomoći i dragocjenim savjetima.

Mihaelu i Marku

SP

## POPIS KRATICA

AZ – azitromicin	MALT - zajednički limfatički sustav pridružen sluznicama
CFU – bakterije koje formiraju kolonije	M-CSF - čimbenici koji potiču rast kolonija različitih stanica
DNFB - dinitrofluorobenzen	MHC - glavni kompleks tkivne podudarnosti
DSS – dekstran sulfat natrij	MN – metronidazol
EaggEC – enteroagregativna <i>E. coli</i>	NK - stanice - stanice prirodne ubojice
EHEC – enterohemoragična <i>E. coli</i>	NO - dušični oksid
EIEC – enteroinvazivna <i>E. coli</i>	PAF - čimbenik koji aktivira trombocite
EPEC – enteropatogena <i>E. coli</i>	PAMP – molekularni obrazac povezan s parogenom
ETEC - enteropatogena <i>E. coli</i>	PCR - lančana reakcija polimeraze
FMLP - N-formil-metionil-leucil-fenilalanin	PPR – receptor koji prepoznaje obrazac
GALT - limfatičko tkivo pridruženo crijevu	SCID – teška kombinirana imunodeficijencija
GH-CSF - čimbenik stimulacije kolonija granulocita i makrofaga	slgA - sekretorni imunoglobulin klase A
HLA - DR, DP, DQ - antigeni klase II glavnog kompleksa tkivne podudarnosti	STAT-4 provođenje signala i aktivacija transkripcije-4
ICAM -intercelularne adhezijske molekule	TCR - receptor na površini T-limfocita
IEL - intraepitelni limfociti	TCR – T stanični receptor
IGF - faktor rasta sličan inzulinu	TGF – čimbenik rasta
IL - interleukin	TGF $\beta$ - transformirajući faktor rasta beta
IL-1RA - antagonist receptora za IL-1	TLR4 – receptor za LPS
LPS - lipopolisaharid	TNBS - trinitrobenzensulfonska kiselina
LT - leukotrieni	TNF $\alpha$ - čimbenik nekroze tumora alfa
M (Microfold)-stanice - specijalizirane epitelne stanice pridružene Peyеровim pločama s funkcijom predočavanja antigena	TNFB – trinitrofluorobenzenska kiselina
	UBC – upalna bolest crijeva
	VCAM - vaskularne stanične adhezijske molekule
	WASP – protein Wiscot-Aldich sindroma



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1.1. Crijevo kao imunološki organ	2
1.1.1. Imunološki sustav pridružen crijevnoj sluznici	2
1.1.2. Sastavnice imunološkog sustava crijevne sluznice	3
1.1.2.1. Imunoglobulini	3
1.1.2.2. B limfociti	4
1.1.2.3. T limfociti	5
1.1.2.4. Stanice prirodene ubojice	6
1.1.2.5. Mijelomonocitne stanice	7
1.1.2.6. Neimune parenhimne stanice	8
1.1.2.7. Glavni kompleks tkivne podudarnosti	9
1.1.3. Struktura i funkcija imunološkog sustava crijevne sluznice	9
1.1.3.1. Intraepitelni limfociti	9
1.1.3.2. Sekrecija imunoglobulina	10
1.1.3.3. Organizirane limfoidne strukture i udomljavanje limfoblata	10
1.1.3.4. Neorganizirano tkivo lamine proprije	11
1.1.4. Urođena i stečena imunost	12
1.1.4.1. Urođeni imunološki sustav	12
1.1.4.2. Stečeni imunološki sustav	14
1.2. Gastrointestinalna upala	15
1.2.1. Narušena funkcija epitelne barijere	15
1.2.2. Predočavanje antigena i značenje biljega (TLR)	16



1.2.2.1.	TLR4	17
1.2.3.	Recirkulacija imunoloških stanica i adhezijske molekule	19
1.2.4.	Normalna flora, neutrofili, proupalni citokini i upala crijevne sluznice	21
1.2.4.1.	TNF $\alpha$	25
1.2.4.2.	TGF $\beta$	26
1.3.	Upalne bolest crijeva	26
1.3.1.	Etiopatogeneza	27
1.3.2.	Klinička slika	29
1.3.3.	Terapija	31
1.3.3.1.	Konvencionalna	31
1.3.3.2.	Antibiotici	34
1.3.3.3.	Biološki lijekovi	36
1.4.	Eksperimentalni modeli crijevne upale	36
1.4.1.	Podjela eksperimentalnih modela i mehanizmi indukcije crijevne upale	39
1.4.1.1.	Spontani i inducirani modeli	39
1.4.1.2.	Modeli posredovani staničnim Th1 i humoralnim Th2 obrascem	41

1.4.1.3.	Modeli s efektornim ili regulacijskim poremećajem tolerancije	41
1.4.2.	Eksperimentalni modeli crijevne upale i translacija prema kliničkoj znanosti i praksi	46
<b>2.</b>	<b>CILJ I HIPOTEZA</b>	<b>48</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b>	<b>50</b>
3.1.	Životinje i plan pokusa	51
3.2.	Imunohistokemija	53
3.2.1.	Uvod	53
3.2.2.	Obrada parafinskih uzoraka	53
3.2.3.	Primjena protutijela i bojanja	54
3.2.4.	Analiza uzoraka	54
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>55</b>
4.1.	Klinički skor u životinja	56
4.2.	Izraženost TLR4, TNF $\alpha$ i TGF $\beta$ u sluznici debelog crijeva miševa (mjereno imunohistokemijskom metodom)	57
4.2.1.	Izraženost TLR4, TNF $\alpha$ i TGF $\beta$ u kontrolnoj grupi bez eksperimentalnog kolitisa u usporedbi s grupom sa netretiranim eksperimentalnim kolitisom - OSOBINA MODELA	57
4.2.1.1.	Izraženost TNF $\alpha$ u kontrolnoj grupi bez eksperimentalnog kolitisa u usporedbi s grupom sa netretiranim eksperimentalnim kolitisom	57

4.2.1.2. Izraženost TGF $\beta$ u kontrolnoj grupi bez eksperimentalnog kolitisa u usporedbi s grupom sa netretiranim eksperimentalnim kolitisom	61
4.2.1.3. Izraženost TLR4 u kontrolnoj grupi bez eksperimentalnog kolitisa u usporedbi s grupom sa netretiranim eksperimentalnim kolitisom	64
4.2.2. Izraženost TLR4, TNF $\alpha$ i TGF $\beta$ u grupi sa netretiranim eksperimentalnim kolitisom u usporedbi sa skupinama s eksperimentalnim kolitisom tretiranih s azitromicinom ili metronidazolom ili metilprednizolonom - UČINAK TERAPIJE	69
4.2.2.1. Izraženost TNF $\alpha$ u grupi sa netretiranim eksperimentalnim kolitisom u usporedbi sa skupinama s eksperimentalnim kolitisom tretiranih s azitromicinom ili metronidazolom ili metilprednizolonom	68
4.2.2.2. Izraženost TGF $\beta$ u grupi sa netretiranim eksperimentalnim kolitisom u usporedbi sa skupinama s eksperimentalnim kolitisom tretiranih s azitromicinom ili metronidazolom ili metilprednizolonom	72
4.2.2.3. Izraženost TLR4 u grupi sa netretiranim eksperimentalnim kolitisom u usporedbi sa skupinama s eksperimentalnim kolitisom tretiranih s azitromicinom ili metronidazolom ili metilprednizolonom	76
4.2.3. Razlika u izraženost TLR4, TNF $\alpha$ i TGF $\beta$ u skupinama s eksperimentalnim kolitisom tretiranih s azitromicinom ili metronidazolom ili metilprednizolonom - RAZLIKA UČINKA TERAPIJE	79

4.2.3.1. Razlika u izraženost TNF $\alpha$ u skupinama s eksperimentalnim kolitisom tretiranih s azitromicinom ili metronidazolom ili metilprednizolonom	79
4.2.3.2. Razlika u izraženost TGF $\beta$ u skupinama s eksperimentalnim kolitisom tretiranih s azitromicinom ili metronidazolom ili metilprednizolonom	82
4.2.3.3. Razlika u izraženost TLR4u skupinama s eksperimentalnim kolitisom tretiranih s azitromicinom ili metronidazolom ili metilprednizolonom	84
<b>5. RASPRAVA</b>	<b>87</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	<b>100</b>
<b>7. SAŽETAK</b>	<b>103</b>
<b>8. SUMMARY</b>	<b>105</b>
<b>9. LITERATURA</b>	<b>107</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS</b>	<b>128</b>

## **1. UVOD**

## 1.1. Crijevo kao imunološki organ

Imunološki sustav crijevne sluznice predstavlja najveći imunološki odjeljak u ljudskom tijelu. Taj se sustav sastoji od epitelnih stanica, limfoidnih stanica (B i T stanica), mijeloidnih stanica (makrofaga, neutrofila, dentritičkih stanica, eozinofila i mastocita) i ima zadatak održavanja imunološke i protuupalne homeostaze crijevne sluznice. Sustav ima zadaću obrane od patogenih mikroorganizama i toksičnih antigena koji mogu proći epitelnu barijeru i izazvati oštećenje, uz istovremenu ulogu održavanja tolerancije prema mnoštvu komenzalnih mikroorganizama i prehrambenih antigena prisutnih u crijevu domaćina. Tako imunološki sustav pridružen crijevu ima važnu ulogu u održavanju homeostaze između stranih i vlastitih antigena, uključivši i vlastitu crijevnu floru, čuvajući ravnotežu unutarnjeg okoliša organizma na vrlo specifičan način (1).

### 1.1.1. Imunološki sustav pridružen crijevnoj sluznici

Imunološki sustav crijevne sluznice (ISC), poznat kao GALT engl. "Gut Associated Lymphoid Tissue", može se podijeliti u nekoliko funkcionalno i anatomski različitih odjeljaka.

1. rahlo organizirana efektorska mjesta (intestinalni epitel i lamina proprija)
2. makroskopske limfoidne strukture (Peyerove ploče i mezenterični limfni čvorovi)
3. mikroskopske crijevne limfne strukture engl. "cryptopatches" i izolirani limfoidni folikuli)

Peyerove ploče su zaokruženi limfoidni folikuli koji se nalaze pretežito u mukozi i submukozi te predstavljaju aferentni krak ISC-a koji prepoznaje antigene putem specijaliziranih mehanizama uzorkovanja putem M engl. "Microfold" stanica koje se nalaze u epitelu pridruženim folikulu Peyerove ploče. U aferentni krak su uključene i dendritičke stanice koje pružaju svoje izdanke kroz otvorene uske veze engl. "tight junctions" između epitelnih stanica. Luminalni antigeni bivaju predočeni putem M stanica i prepoznati od B i T limfocita uz posljedičnu recirkulaciju i diseminaciju B i T limfoblasta u druga limfna tkiva povezana sa sluznicom engl. "Mucosal Associated Lymphoid Tissue – MALT", primjerice pluća, dojke, genitourinarni trakta i samog crijeva. Tako antigen-specifični efektorski B i T limfoblasti naseljavaju rahlo organizirano tkivo lamine proprije sluznice koja predstavlja eferentni krak imunološkog sustava crijeva jer biva naseljena i drugim efektorskim stanicama (plazma stanice, NK stanice mononuklearnim i polimorfonuklearnim fagocitima te mastocitima). Plazma stanice u lamini propriji luče IgA imunoglobulin u obliku sekretornog IgA (sIgA) koji osigurava zaštitu protiv bakterija, virusa i luminalnih antigena. Imunološki odjeljak unutar epitela sastoji se od intraepitelnih limfocita (IEL) koji predstavljaju jedinstvenu populaciju rezidentnih T limfocita i za razliku od perifernih T limfocita predominantno izražavaju receptor T-limfocita  $\gamma\delta$  ( $\gamma\delta$  TCR). Intestinalni intraepitelni limfociti sudjeluju u održavanju cjelovitosti i funkcije epitelne barijere putem citotoksičnog efekta prema promijenjenim epitelnim stanicama (1).

### 1.1.2. Sastavnice imunološkog sustava crijevne sluznice

#### 1.1.2.1. Imunoglobulini

Imunoglobulini su protutijela koja su izražena na površini B stanica i služe kao njihov klonotipni receptor za antigene slično kao TCR na T stanicama (2). Nakon vezanja na odgovarajući antigen površinski imunoglobulini započinju kaskadu signalnih događaja koji aktiviraju B stanice, potiču klonalnu proliferaciju i generiraju plazma stanice. Opisano zbivanje rezultira stvaranjem protutijela koja putuju kroz tjelesne tekućine i otkrivaju i vežu se antigenske molekule koje su i pokrenule njihovu produkciju. Svaka B stanica izražava jedinstvenu molekulu imunoglobulina koja sadrži varijabilne regije koje nose specifičnost za taj antigen. Stvorena protutijela se sastoje od dva identična laka lanca spojena disulfidnim mostom na dva identična teška lanca koja su međusobno križno povezana s disulfidnim mostovima. Svaka od pet klasa imunoglobulina su pojedinačno definirana razlikama u efektorskoj funkciji i jedinstvenim izotipom teškog lanca, nazvanog  $\alpha$  (IgA),  $\delta$  (IgD),  $\epsilon$  (IgE),  $\gamma$  (IgG) i  $\mu$  (IgM). Ovih 5 izotipova teških lanaca se na opisani način veže s lakim lancima dva izotipa  $\kappa$  i  $\lambda$ . U ljudi postoje 4 različite IgG potklase (IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4) i dvije različite IgA potklase (IgA1 i IgA2). Dio se imunoglobulinske heterogenosti može pripisati različitim klasama i potklasama razlike većinom potječu iz varijabilnih regija lociranih na amino kraju lakih i teških lanaca i kodiranih V-, D- I J-regijom na segmentima pojedinih gena (1).

#### 1.1.2.2. B limfociti

B limfociti posreduju u humoralnu imunost, odnosno stvaranje protutijela kao kao odgovor na prisutnost antigena što predstavlja dio stečene imunološke reakcije. Za razliku od T stanica B limfociti nastaju i sazrijevaju u koštanoj srži. Zreli B limfociti na svojoj površini izražavaju B-stanični receptor za antigene (BCR) koji se sastoji od površinskih imunoglobulina nekovalentno vezanih s disulfidno povezanim Ig- $\alpha$  i Ig- $\beta$



heterodimerima. Imunoglobulin vezan za membranu predstavlja komponentu BCR koja prepoznaje antigen, a Ig- $\alpha$ /Ig- $\beta$  heterodimer je BCR signalna komponenta (3). Ig- $\alpha$  i Ig- $\beta$  povezuju površinski imunoglobulin s citoplazmatskom enzimom - protein kinazom koja postaje funkcionalna nakon vezanja antigena. Funkcionalni odgovor ovisi o specifičnoj signalnoj kaskadi koja se zatim aktivira kao i jačini signala, trajanju i modulaciji od strane koreceptorskih molekula (CD19/21 kompleks, CD22 i CD 72) (4, 5).

Antigenska stimulacija zrelih B limfocita uzrokuje klonsku ekspanziju specifičnih B limfocita i stvaranje specifičnog imunoglobulina identičnom onom koji je vezan za membranu i specifičan za antigen. Neki od B limfocita ekspanziranog klona se diferenciraju u B stanice pamćenja. Nakon daljnje modulacije s antigen specifičnim T limfocitima, B limfociti se mijenjaju u formu izotipa povezanu s antigen specifičnom V regijom (obično u izotip IgG na periferiji i IgA u limfoidnom tkivu gastrointestinalnog sustava i diferenciraju se u plazma stanice koje stvaraju i luče izuzetno velike količine imunoglobulina specifičnog za antigen koji je potaknuo klonsku ekspanziju.

#### 1.1.2.3. T limfociti

T limfociti su predstavljaju važnu sastavnicu crijevnog imunološkog sustava koja ima ulogu vrlo fine regulacije urođenog i stečenog imunološkog sustava usmjerenog protiv infektivnih mikroorganizama i tumora, u okolišu koji je bogat nevlastitim antigenima. T limfociti kao važni regulatori efektorske funkcije prepoznaju i eliminiraju infektivne mikroorganizme i tumorske stanice i istovremeno koordinirajući imunološku obranu putem regulacijskih učinaka na druge stanične populacije koje sudjeluju u imunološkoj reakciji. T limfociti nastaju iz matičnih stanica u koštanoj srži,

a potom migriraju u timus gdje sazrijevaju i uče prepoznavati vlastiti antigen. Nakon sazrijevanja T limfociti, koji toleriraju vlastiti antigen migriraju u sekundarno limfno tkivo u organizmu, uključivši i Peyerove ploče u crijevu. Ovakve naivne T stanice koje se još nisu susrele s antigenom nastanjuju Peyerove ploče, očekujući senzibilizaciju luminalnim antigenima koji su transportirane u Peyerove folikule putem specijaliziranih epitelnih M stanica. Tim događajem započinje specifični imunološki odgovor u sluznici koji naivne T limfocite usmjerava u funkcionalno aktivirani fenotip (1).

#### 1.1.2.4. Stanice prirodene ubojice

Stanice prirodene ubojice (NK stanice) koji čine oko 10% limfocita periferne krvi imaju vrlo važnu ulogu u ranom urođenom imunološkom odgovoru. NK stanice su veliki granulirani limfociti koji ne posjeduju receptore za prepoznavanje, ali izražavaju Toll-like receptore na svojoj površini koji prepoznaju molekularne obrasce povezane s patogenom (PAMP) što govori u prilog tome da NK stanice čine nespecifičnu prvu liniju obrane putem njihove sposobnosti ubijanja transformiranih stanica domaćina i stanica inficiranih patogenom (6). Stanice prirodene ubojice imaju i određenu ulogu i u stečenoj imunološkoj reakciji putem interakcije s dendritičkim stanicama koje prezentiraju antigen. NK stanice sudjeluju u citotoksičnosti posredovanoj stanicama ovisnoj o antigenu preko vezanja na ciljnu stanicu opsoniziranu s IgG na CD16 NK stanice. Funkcija NK stanica najbolje se može karakterizirati preko njihovog citotoksičnog efekta koji se precizno regulira balansom klase I HLA specifičnih inhibitornih i aktivatorskih signalnih receptora u koje spada i TLR. Tijekom prirodnog imunološkog odgovora, NK stanice prepoznaju ciljnu stanicu kojoj nedostaje površinska ekspresija klase I MHC molekule. Budući da brojni virusi i tumori, uključivši crijevne karcinome potiskuju klasu I MHC molekula kako bi

izbjegli stečeni imunološki odgovor, NK stanice imaju važnu ulogu u obrani organizma. Nakon kontakta s ciljnom stanicom NK stanice otpuštaju proteine koji stvaraju pore (Perforini), proteolitičke enzime (Granzimi) i kemokine u ciljnu stanicu, što dovodi do destrukcije proteina citoskeleta, degradacije kromosoma i apoptoze crijevne sluznice (1).

#### 1.1.2.5. Mijelomonocitne stanice

Stanice mijelomonocitnog reda uključuju monocite i njihovo "potomstvo" (makrofage i dendritičke stanice) i polimorfonuklearne leukocite (neutrofile, eozinofile i bazofile) Stanice mijelomonocitnog reda se razvijaju iz zajedničkih mijeloidnih progenitorskih stanica u koštanoj srži uz poticaj na citokina, uključivši interleukine (IL-1, IL-3 i IL-6) i čimbenika stimulacije kolonija (G-CSF, GM-CSF i M-CSF).

Monociti-mononuklearni fagociti koji sazrijevaju u makrofage kad se nalaze u tkivu i dendritičke stanice imaju središnju ulogu u urođenoj i stečenoj imunosti. U urođenoj imunosti njihova fagocitna funkcija i sekrecija upalnih citokina su vrlo važne za akumulaciju upalnih stanica i uništavanje patogena. S druge strane, u stečenoj imunosti uglavnom pokazuju učinak kroz njihovu sposobnost endocitoze, procesuiranja i predočavanja stranih antigena prema T limfocitima. (7). Monociti koji uđu u tkiva razvijaju se u tkivne makrofage koji, osim što imaju aktivnu fagocitnu ulogu u eradikaciji mikroorganizama čine i prvi korak u predočavanju antigena i putem MHC II spregnutog prepoznavanja i tim načinom aktiviraju CD4 T limfocite koji reguliraju daljnji imunološki odgovor. Makrofagi podržavaju upalu lučeći IL-12 i IL-23 koji stimuliraju nastanak Th 1 fenotipa iz CD4 T limfocita. To dovodi do sekrecije INF- $\gamma$  i aktivacije fagocitnih i antigen predočavajućih funkcija makrofaga (1). Dendritičke stanice predočavaju antigen i nalaze se u Peyerovim pločama, lamini proprijii i epitelu

gastrointestinalne sluznice (8). Kada su izložene mikrobnim produktima, posebice specifičnim, očuvanim PAMP-ovima dendritičke stanice sazrijevaju i migriraju u sekundarne limfne organe, uključivši mezenterijalne limfne čvorove. Tamo dalje sazrijevaju, jače izražavaju svoje funkcije za predočavanje antigena preko ekspresije: kostimulacijskih molekula kao što su CD80 i CD86 i tako aktiviraju naivne T limfocite (9).

Neutrofilni polimorfonuklearni leukociti su presudna komponenta urođene imunosti i djeluju kao prvi odgovor na infekciju. Neprestano se stvaraju u koštanoj srži i cirkuliraju u krvi. Kod infekcije, aktivirani neutrofili uz pomoć adhezijskih molekula izraženih na njihovoj površini, brzo izlazi iz krvnih žila u zahvaćenu sluznicu. Infiltriraju zahvaćeno tkivo i ubijaju patogene (10).

#### 1.1.2.6. Neimune parenhimne stanice

Ovi tipovi stanica uključuju intestinalne epitelne stanice, mezenhimne stanice (npr. fibroblaste), stanice glatkih mišića i endotelne stanice. U svojoj osnovi to nisu klasične imunološke stanice već imaju važne pomoćne imunološke funkcije unutar probavnog sustava. Ove stanice ne započinju specifični imunološki odgovor već se integriraju i poboljšavaju imunološke odgovore koji su u tijeku. Intestinalne epitelne stanice čine barijeru između crijeva i lumena i imaju sposobnost ekspresije citokina i kemokina. Fibroblasti putem ekspresije molekula na površini stanice, komponenti vezivnog tkiva i citokina reguliraju lokalno preživljavanje limfocita i doprinose TGF- $\beta$  posredovanom fibroziranju, povezanom s kroničnom upalom. Stanice glatkih mišića mogu predočavati antigen putem MHCII spregnutog načina u kontekstu upale i odgovoriti na poticaj citokina upale kao što je IL-4. Promjena peristaltike crijeva ima ulogu u eliminaciji patogena. Endotelne stanice imaju važnu ulogu u regulaciji tkivne

upale usmjeravanjem i regrutacijom leukocita i mijeloidnih stanica, te sekrecijom različitih topivih medijatora koji pojačavaju upalu (1)

#### 1.1.2.7. Glavni kompleks tkivne podudarnosti

Glavna razlika između CD4+ i CD8+ limfocita je u načinu prepoznavanja antigena u kontekstu klase I i klase II MHC (engl. "Major histocompatibility complex": glavni kompleks tkivne podudarnosti). Glavnom kompleksu tkivne podudarnosti u miševa odgovara HLA-2 na kromosomu 17, a u ljudi je to HLA (engl. "human leukocyte antigen complex": kompleks humanog leukocitnog antigena). MHC ili HLA produkti i geni koji ih kodiraju su podijeljeni u tri klase. MHC klasa I i MHC klasa II su glikoproteini i uključeni su u prezentaciju antigena T limfocitima. Tri gena u ljudi lociranih na kromosom 6 koji su ekvivalentni genu za MHC klasa I su *HLA-A*, *HLA-B* i *HLA-C*, a *HLA-DP*, *HLA-DQ* i *HLA-DR* su ekvivalenti MHC klase II. Klasa III MHC gena kodira brojne proteine kao što su npr. komponentne komplekta, "Heat shock" proteini i TNF. Antigeni koji su izraženi na površini stanice s klasom I MHC predstavljaju endogeno sintetizirane peptide kao što su antigeni virusa, a prepoznaje ih prvenstveno CD8 subpopulacija T-limfocita s citolitičkim djelovanjem prema ciljnoj stanici. Razgrađene i preformirane egzogene antigene zajedno s klasom II MHC, prvenstveno na površini stanica koje predočuju antigen (APC-"antigen presenting cells": makrofagi dendritičke stanice, Kupfferove stanice i epidermalne Langerhansove stanice); prepoznaje CD4 subpopulacija T-limfocita s pomoćničkim djelovanjem koja stvaranjem i lučenjem limfokina aktivira B-limfocite na lučenje protutijela specifičnih za isti egzogeni antigen (1).

#### 1.1.3. Struktura i funkcija imunološkog sustava crijevne sluznice

##### 1.1.3.1. Intraepitelni limfociti

Crijevni epitel ljudskog organizma sadrži jedinstvenu populaciju limfnih stanica-intraepitelne limfocite (IEL) koji se nalaze razbacane između crijevnih epitelnih stanica uzduž bazolateralne površine (11). Oko 10-20 IEL se nalazi na oko 100 resica unutar tankog crijeva. S obzirom na veliku površinu crijevnog epitela IEL predstavljaju vrlo značajnu subpopulaciju T limfocita u ljudskom tijelu (12). Za razliku od cirkulirajućih T limfocita, IEL populacijom su većinom CD8+ T limfociti (>70 % u tankom crijevu) uglavnom eksprimiraju CD8 $\alpha\alpha$  homodimer koji nije uobičajen među cirkulirajućim T limfocitima (13). Više od 10% IEL-a mišjeg tankog crijeva predstavljaju T limfociti koje nemaju CD 8 niti CD 4 biljeg (14, 15).

#### 1.1.3.2. Sekrecija imunoglobulina

Stvaranje i lučenje IgA dimera predstavlja glavne zaštitne činitelje probavnog sustava. trakta. Plazma stanice proizvode IgA dimer – dva IgA monomera spojena sa polipeptidnim J lancem. J-lanac participira u transportu IgA i IgM molekula kroz intestinalni epitel. Glavna funkcija sekretornih IgA u obrani domaćina je zaštita od bakterija virusa i luminalnih antigena (16).

#### 1.1.3.3. Organizirane limfoidne strukture i udomljavanje limfoblasta

Peyerove ploče su organizirane nakupine limfnog tkiva u sluznici koje se vezane uz jedan ili više limfnih folikula protežu do lamine proprije, a katkad i do submukoze crijeva. Okružene su specijaliziranim epitelom engl. "Follicle-associated epithelium" (FAE) koji sadrži specijalizirane M-stanice. M-stanice igraju važnu ulogu u nadzoru sluzničke imunosti jer isporučuju odabrane uzorke intraluminalnih antigena organiziranim sluzničkim limfnim tkivima. M stanice nastaju direktno iz

nediferenciranih, nezrelih epitelnih matičnih stanica u kriptama crijeva (17).

Dendritične stanice koje se nalaze neposredno uz crijevne epitelne stanice mogu također uzorkovati luminalne antigene kroz epitel otvarajući uske veze i širenjem dendrita u lumen (18). M-stanice osim potencijalnih patogena također transportiraju i komenzalne bakterije u Peyerove ploče i na taj način iniciraju proizvodnju i lučenje IgA protutijela i toleranciju. "Cryptopatches" su nakupine nezrelih T limfocitnih prekursora koji se nalaze neposredno uz kripte u mišjem tankom crijevu i predstavljaju ekstratimičnu lokaciju razvoja T limfocita (19). Izolirani limfoidni folikuli engl. "Isolated lymphoid follicle" (ILF) su organizirana limoidna struktura nerazjašnjene uloge. Pokriveni su s FAE koji sadrži M stanice, a sastoji se primarno od zrelih B2 B limfocita i CD4+ T limfocita (20).

Naivni B i T limfociti na površini stanica izražavaju kombinaciju receptora koja ih usmjerava u limfoidne nakupine kao što su Peyerove ploče. Nezrele dendritične stanice zadržavaju luminalne antigene i prezentiraju ih tim naivnim limfocitima u crijevnim limfoidnim folikulima. Tim interakcijama započinje specifični imunološki odgovor i usmjerava naivne T limfocite Th2, Th3 ili Th1 iznad Th1 fenotipa (20). Aktivirani limfociti iz crijevnih limfoidnih folikula započinju put tijekom kojeg sazrijevaju i migriraju u aferentne limfne puteve i u mezenterične limfne čvorove. Tijekom tog procesa limfociti sazrijevaju u T i B limfoblaste obogaćeni B limfocitima koji nose IgA. Ti limfociti ponovno ulaze u rahlo organiziranu laminu propriju. Limfoblasti recirkuliraju i udomljavaju se na mjestima početne antigenske stimulacije (21)

#### 1.1.3.4. Neorganizirano tkivo lamine proprije

Lamina proprija leži ispod intestinalnog epitela i služi kao rahlo povezan efektorski odjeljak T i B limfocita, plazma stanica, NK stanica, makrofaga, dendritičkih stanica i

mastocita. Većina T limfocita unutar lamine proprije izražava  $\alpha\beta$ TCR kao i CD45 površinski marker koju ukazuje na to da su to stanice pamćenja, odnosno da su se susrele s antigenom, vjerojatno u Peyerovim pločama (22).

#### 1.1.4. Urođena i stečena imunost

Dva se tipa imunosti isprepliću u sluznici: urođena (prirodna) imunost i adaptivna (stečena) imunost. Urođena je imunost nespecifična i brzo se mobilizira dok je stečena imunost specifična za strane antigene i mobilizira se polako tijekom nekoliko dana i tjedana nakon početne ili primarnog izlaganja antigenu. Specifična imunost pojačava početnu zaštitu koju pruža urođena imunost na antigen specifični način daljnjom mobilizacijom prirodnih imunoloških komponenti. U stečenom imunološkom sustavu limfociti reagiraju s antigenima preko receptora (T i B stanični receptor) koji su specifični za upravo taj antigen. Kad se specifični antigen predoči limfocitu s receptorom koji ga je u stanju prepoznati takav limfocit kreće u klonsku ekspanziju. Za razliku od urođene imunosti, stečena je imunost karakterizirana usvajanjem pamćenja tijekom specifičnog imunološkog odgovora koji omogućuje bržu mobilizaciju specifične imunosti u slučaju ponovnog susreta s tim antigenom u budućnosti (23).

##### 1.1.4.1. Urođeni imunološki sustav

Tijekom filogeneze živih bića, rast drevnih, vodenih, metazoa poput blastule je dosegao stacionarnu fazu kada je endofagocitoza hranjivih tvari iz okoliša iz primordijalne juhe postala nedovoljna za održavanje života (24). Stoga je nastao probavni sustav s površinskim epitelom kao učinkovitiji nutritivni sistem. Takav sustav



koji se razvio u primitivno crijevo omogućio je kolonizaciju crijeva bakterijama iz okoliša. Takva usporedna ko-evolucija domaćina i mikroflore predstavlja mutualističkim principom u kojem svi partneri imaju koristi. Domaćin predstavlja savršeni inkubator, a mikroflora je između ostalog pružala svoju fermentativnu mašineriju koja je olakšavala ekstrakciju nutritivenata iz lumena primitivnog crijeva (25). Budući, neki mikroorganizmi koji su dio mikroflore mogu inficirati svog domaćina, u nižih je vrsta glavni mehanizam za obranu urođena imunost. Urođeni imunološki sustav se pokreće različitim mikrobnim ligandima domaćin prepoznaje putem receptora za prepoznavanje obrasca (PRR). Humani probavni sustav sadrži više od 500 različitih mikrobnih vrsta s ukupnim brojem  $10^{14}$  mikroba, što je zajedno otprilike 100 puta više gena od gena domaćina (26).

Urođeni imunološki odgovor nema samo ulogu zaštite domaćina od potencijalnih patogena već interakcijom s mikroflorom crijeva doprinosi homeostazi i funkciji probavnog sustava. Istraživanja pokazuju da aktivacija urođene imunosti :

1. Utječe na sastav crijevnog flore
2. Poboljšava cjelovitost i funkciju crijevnog barijere između intestinalnih epitelnih stanica (IEC) indukcijom bjelancevina uskih međustaničnih veza (engl, "Tight junction-related proteins")
3. Povećava proliferacijski odgovor i smanjuje apoptozu IEC

ubrzava proces cijeljenja oštećenog epitela (27, 28, 29, 30, 31, 32).

Sastavnice urođene imunosti značajne za fiziologiju crijeva uključuju stanične i topive činitelje. Stanični činitelji su makrofagi, eozinofili, mastociti, stanice prirodne ubojice (NK stanice) i neutrofili. Makrofagi su fagociti i čistači, ali su isto tako uključeni i u

reakciju stečene imunosti jer predočavaju antigen. Makrofagi su zapravo stanice iz krvi-monociti i koje se diferenciraju u vrlo učinkovite stanice za prepoznavanje i eliminaciju mikroorganizama u– procesu koji je posredovan specijaliziranim receptorskim sistemima. Produkti gram negativnih bakterija kao što su lipopolisaharidi se vežu za receptore (TLR4) (33).

#### 1.1.4.2. Stečeni imunološki sustav

Stečeni imunološki sustav ima dvije sastavnice: humoralnu i staničnu imunološku reakciju. Humoralna imunost je posredovana protutijelima koje luče B limfociti i predstavlja obranu protiv ekstracelularnih antigena/patogena. Stanična imunost je posredovana djelovanjem T limfocita i osigurava zaštitu od intracelularnih antigena/patogena koji nisu dostupni protutijelima. Oba tipa stečene imunosti posjeduju nekoliko karakteristika koje ih razlikuju od urođene imunosti:

1. Kako bi odgovorili na širok spektar potencijalnih antigena kojima domaćin može biti izložen tijekom života, potreban je veliki broj različitih klonova limfocita specifičnih za pojedine antigenske determinante ili epitope. Molekularna osnova klonotipne specifičnosti je određena receptorom na staničnoj površini (imunoglobulin na B stanicama ili TCR na T stanicama koji je jedinstven za svaku stanicu ili klon.
2. Svaka stanica ili klon izražava svoj jedinstven ili klonotipni receptor u svrhu razlikovanja vlastitih od ne vlastitih antigena. Taj proces je prvenstveno rezultat pozitivne selekcije i negativne selekcije B limfocita u koštanoj srži i T limfocita u timusu što rezultira produkcijom mnoštva receptora različite specifičnosti koji su tolerantni prema vlastitim antigenima (34).

## 1.2. Gastrointestinalna upala

### 1.2.1. Narušena funkcija epitelne barijere

Epitel predstavlja barijeru koja fizički odjeljuje luminalne antigene od imunoloških i upalnih stanica koje se nalaze u lamini proprijii i na taj način sprječava njihov međusobni neposredni kontakt i aktivaciju procesa upale. U funkciju su epitelne barijere utkani vrlo složeni mehanizmi koji reguliraju i nadziru putovanje makromolekula između okoliša i domaćina. Navedeni prolaz se prvenstveno odvija kroz paracelurne puteve koje nadziru međustanične uske veze (35, 36). Danas je poznato da se međustanične uske veze sastoje se od nekoliko proteina (okludin, povezujuća adhezijska molekula, ZO-1, ZO-2 i ZO-3) koji zajednički funkcioniraju kao kompleks i reguliraju selektivnu intestinalnu propusnost kroz epitelnu barijeru. Tako međustanične uske veze predstavljaju dinamičke strukture koje brzo mijenjaju propusnost kao odgovor na izvanstanični poticaj. Oštećenje epitelne barijere je opisano u crijevnoj upali (37, 38) uz posljedično povećano stvaranje proupalnih citokina, uključivši  $TNF\alpha$  i  $IFN\gamma$ . Navedena zbivanja za posljedicu imaju povećanu propusnost kroz međustanične uske veze. Disfunkcija crijevne epitelne barijere se smatra glavnim mehanizmom patogeneze upalnih bolesti crijeva i postoje mišljenja da ovaj mehanizam predstavlja primarni poremećaj u tim bolestima (39).

Osim u kroničnim idiopatskim upalnim bolestima crijeva, "napukline" epitelne barijere uslijed "ljuštenja" epitela u lumen su opisane u celijakiji, crijevnim infekcijama i oštećenjima crijeva izazvanima zračenjem i kemoterapijom. Organizirani odgovor na takovu vrst oštećenja započinje brzom migracijom i promjenom oblika epitelnih stanica sa svrhom pokrivanja defekta (1).

### 1.2.2. Predočavanje antigena i značenje biljega (TLR)

U stanice koje predočuju antigen ubrajamo prvenstveno makrofage i u posebnim okolnostima intestinalne epitelne stanice. Makrofagi predstavljaju cirkulirajuće i tkivne nelimfatičke mononuklearne stanice, a osim sposobnosti predočavanja antigena posjeduju mikrobicidnu i tumoricidnu aktivnost te luče regulacijske medijatore i enzime. Tijekom upale veliki broj monocita periferne krvi biva regrutiran na mjesto tkivne upale. Imunohistološka istraživanja na upalnim bolestima crijeva bilježe povećan broj makrofaga čistača ("scavenger macrophages") u površinskim lezijama, primjerice u bazama ulkusa i fisura, koji fagocitiraju i razlažu strani materijal. Istraživanja također bilježe povećan broj dendritičkih stanica oko spomenutih lezija i granuloma što ukazuje na pojačano predočavanje antigena i povećano stvaranje interleukina – 1 (IL-1). Za razliku od makrofaga iz zdrave sluznice, makrofagi izolirani iz sluznice bolesnika s upalnom bolesti crijeva pretežito selektivno potiču i povećavaju stvaranje IgG u B-limfocitima. Navedena opažanja govore u prilog hipotezi o povišenoj aktivnosti makrofaga u upalnoj bolesti crijeva koja bitno pridonosi razvoju kronične upale (40).

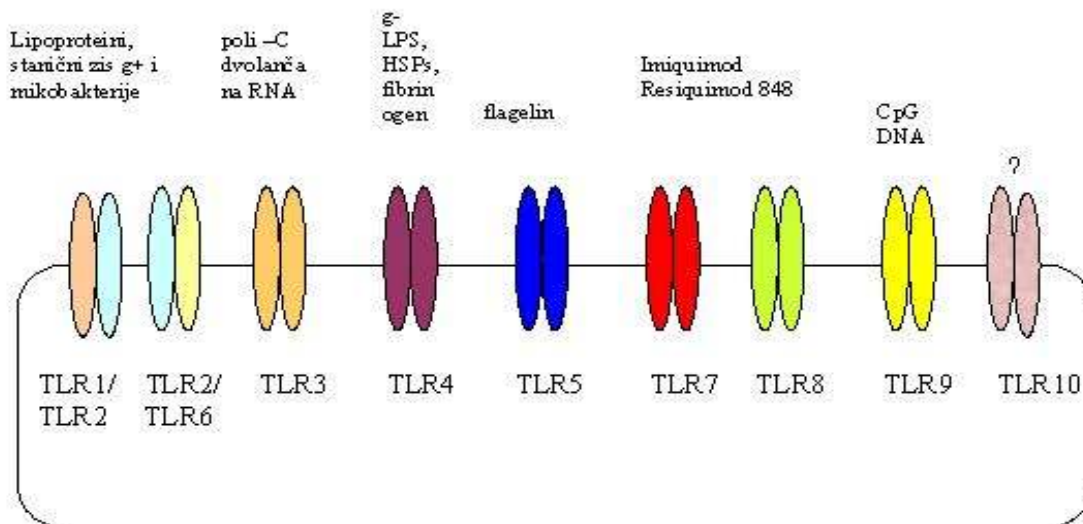
Intestinalne epitelne stanice (IES) koje prvenstveno imaju uloge resorpcije hranidbenih sastojaka u posebnim okolnostima mogu imati i ulogu stanica stanica koje predočavaju antigen. Epitelne stanice tankog crijeva na svojoj površini konstitutivno iskazuju klasu molekula MHC II, moguće kao posljedicu sekrecije interferona – gama (IFN- $\gamma$ ) od strane intraepitelnih limfocita (IEL) (41). U normalnim okolnostima epitelne stanice debelog crijeva na svojoj površini ne izražavaju biljeg klase MHC II. Nasuprot tome, u slučaju upale sluznice debelog crijeva istraživanja bilježe izraženost molekula klase MHC II na površini kolonocita, vjerojatno kao posljedicu lokalnog stvaranja proupalnih citokina (42). Rezultati in vitro istraživanja

pokazuju da stanice intestinalnog epitela imaju sposobnost predočenja topivih antigena prema CD4+ T limfocitima, spregnutog s klasom molekula MHC II (43).

#### 1.2.2.1. TLR4

Toll-like receptori (TLR) predstavljaju obitelj transmembranskih glikoproteina koja ima 10 članova u ljudi i 13 u miševa. Nalaze se na površini stanica ili na endosomima gdje imaju funkciju prepoznavanja mikroorganizama preko molekularnih obrazaca povezanih s patogenima (PAMP) i preko molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjem (SLIKA 1),( 44).

**Slika 1** Toll like receptori (Prilagođeno prema "Basu AND Fenton, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L887-L892, 2004")



U fiziološkim okolnostima, humane IES konstitutivno izražavaju TLR3 i TLR5 i tek male količine TLR2 i TLR4 (45). Spektar patogena koji prepoznaju TLR uključuje gram pozitivne i gram negativne bakterije, kvasce i viruse. Smještaj TLR-a je presudan za njihovu funkciju: TLR 1,2,4,5 i 6 se nalaze na površini stanice i prepoznaju ekstracelularne mikroorganizme, a za TLR 3,7,8 i 9 se smatra da otkrivaju prisutnost virusnih čestica i nalaze se na ranim endosomalnim membranama. TLR-4 reagira s bakterijskim lipopolisaharidom (LPS) što za posljedicu ima pojačano stvaranje i aktivnost adapterske molekule MyD88. Za razliku od fizioloških okolnosti, u Crohnoj bolesti i ulceroznom kolitisu je zabilježena općenito povećana ekspresija TLR4, uz činjenicu da je ekspresija i TLR2 i TLR4 selektivno

povećana na intestinalnim makrofagima (45, 46) S druge strane, u navedenim bolestima nije zabilježena promjena ekspresije TLR2 i TLR 5 (46, 47, 48).

Proupalni citokin, primjerice IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  povećavaju ekspresiju TLR4 što za posljedicu ima pojačani odgovor na LPS (49, 50, 51). Nije posve jasno da li povećana ekspresija TLR u upalnoj bolesti crijeva predstavlja posljedicu djelovanja proupalnih medijatora ili pak, predstavlja primarni događaj u smislu poremećenog, konstitutivno aktivnog signala putem TLR (49) .

Brojni modeli u objavljenim radovima opisuju povezanost odstupanja odgovora posredovanog TLR i sklonosti crijevnoj upali. Transgenični miševi koji ne posjeduju aktivnost TLR5 (TLR5<sup>-/-</sup>) su skloni spontanom kolitisu i osjetljiviji su na inducirani kolitis (52). Najviše je istraživana TLR4 s obzirom na zabilježenu važnu ulogu u ograničavanju bakterijske translokacije i pospješenoj cijeljenju epitela u eksperimentalnim modelima crijevne upale (31) U prilog tome govore i rezultati istraživanja koji bilježe smanjenu epitelnu proliferaciju u miševa deficijentnih za TLR4 ili MyD88 (30, 31, 53) Navedena istraživanja ukazuju na važnu ulogu TLR4 u etiopatogenezi i mehanizmima cijeljenja crijevne upale.

### 1.2.3. Recirkulacija imunoloških stanica i adhezijske molekule

Važan korak u reakciji upale koji prethodi oštećenju tkiva predstavlja izmještanje cirkulirajućih neutrofila, makrofaga i limfocita u laminu propriju, putem posebnih mehanizama u postkapilarnim venulama, u blizini upalom zahvaćenog tkiva.

Navedeni mehanizmi uključuju aktivaciju i međudjelovanje različitih obitelji adhezijskih molekula koje se nalaze na površini spomenutih stanica i endotelnih stanica krvnih žila (1).

Neutrofili nakon vezanja na adhezijske molekule endotela postkapilarnih venula prolaze u laminu propriju crijeva i nakon 24 – 48 sati prolaze između epitelnih stanica u lumen crijeva gdje odumiru i bivaju izbačeni stolicom. Važna je činjenica da se neutrofili diferenciraju u koštanoj srži, a sazrijevaju i aktiviraju se u lamini propriji. Budući ne posjeduju sposobnost proliferacije povećani broj neutrofila na mjestu upale odraz je njihove pojačane migracije iz cirkulacije u laminu propriju crijeva (54).

Osim već prisutnih tkivnih monocita-makrofaga populacija gastrointestinalnih makrofaga se novači iz cirkulirajućih monocita koji nastaju u koštanoj srži (55, 56) Cirkulirajući se monociti poput neutrofila vežu na adhezijske molekule na endotelnim stanicama postkapilarnih venula i prolaze u laminu propriju crijeva, gdje se odvija njihova promjena u zrele makrofage. Sazrijevanje makrofaga je kontrolirano citokinima i drugim topivim tvarima koje su prisutne u lamini propriji. Tako okoliš citokina i topivih medijatora u lamini propriji utječe na razvoj u pojedini tip zrelog makrofaga.

Migracija neutrofila i monocita kroz stijenku postkapilarne venule u lamini propriji crijeva odvija se putem međudjelovanja adhezijskih molekula na cirkulirajućim stanicama i površini endotela krvnih žila (57, 58). Među adhezijskim molekulama razlikujemo tri skupine: selektine,  $\beta_2$  integrine i adhezijske molekule iz obitelji imunoglobulina. Početna adherencija leukocita na endotel je posredovana selektinima koji se nalaze na površini cirkulirajućih leukocita i na endotelnim stanicama. Integrini čine veliku grupu adhezijskih molekula, a svaki od njih je heterodimer koji se sastoji od nekovalentno povezanih  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica.  $\beta_1$  i  $\beta_2$  podjedinice su najvažnije u upali (npr. CD18, VLA,  $\alpha_4\beta_7$ ).  $\beta_1$  integrini su uključeni u prolaz limfocita kroz krvnu žilu, a  $\beta_2$  integrini sudjeluju u adheziji monocita i neutrofila na endotelne stanice. Obitelj selektina čine tri člana: E-selektin (LAM-1), E-selektin



(ELAM-1) i P-selektin (59). Slabe selektinske veze su razlog kotrljanju leukocita koje traje dok se ne stvore čvrste veze između  $\beta_2$  integrina koji se nalaze na površini leukocita i adhezijskih molekula iz obitelji imunoglobulina (intracelularna adhezijska molekula-1: ICAM-1; vaskularna stanična adhezijska molekula-1: VCAM-1 i mukozna adresinak stanična adhezijska molekula -1: MAdCAM-1) koje se nalaze na endotelnim stanicama. Važna je činjenica sa povećano lučenje IL-1, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  za posljedicu ima pojačanu izraženost ICAM-1 što govori u prilog važnosti adhezijske molekule u patogenezi crijevne upale (1).

Završni korak u recirkulaciji upalnih stanica tijekom crijevne upale je prolaz upalnih stanica između epitelnih stanica u lumen crijeva. Raspadni produkti leukocita koji ulaze u lumen crijeva mogu se naći u stolici što predstavlja patogenetski znak upale koji se koristi u kliničkoj praksi uporabom laboratorijskih testova za dokazivanje koncentracije laktoferina i kalprotektina iz uzoraka stolice bolesnika s aktivnom crijevnom upalom (60).

#### 1.2.4. Normalna flora, neutrofili, proupalni citokini i upala crijevne sluznice

Prema definiciji, termin normalna flora se odnosi se na zajednicu živućih mikroorganizama u nekoj ekološkoj niši domaćina (61). Ljudski probavni sustav je prirodno stanište velike, raznolike i dinamične populacije mikroorganizama (uglavnom bakterija) koje su se prilagodile životu na površini sluznica ili u lumenu (62).

Fiziološka mikroflora crijeva uključuje više vrsta bakterija koje stalno koloniziraju probavni sustav i crijevo te različite vrste mikroorganizama koje privremeno prolaze kroz probavni sustav.

Bakterijske vrste koje čine stalnu (rezidentnu) crijevnu floru uglavnom budu akvirirane po rođenju i sastav rezidentne flore specifičan je za svaku jedinku, a prolaznu bakterijsku floru čine bakterije koje konstantno pristižu iz okoliša (primjerice putem

putem hrane i pića). Debelo crijevo predstavlja odsječak probavnog sustava koji je izrazito napučen bakterijskim vrstama, primarno anaerobima i broj bakterijskih stanica dostiže gustoću od  $10^{12}$  CFU/mL po gramu luminalnog sadržaja koja je 100 000 puta veća od koncentracije bakterija u lumenu ileuma. U crijevnom sadržaju nalazimo 300-500 različitih bakterijskih vrsta, uz napomenu da samo 30-40 vrsta čini oko 99% sveukupne populacije. Standardna bakteriološka analiza flore crijeva pokazuje da striktno anaerobnih bakterija ima 100-1000 puta više od aerobnih bakterija. Dominantne vrste su *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium* i razni anaerobni koki. Bakterije koje su prisutne u manjem broju uključuju *Enterococcus* i *Enterobacteriaceae*. Neke od bakterija koje se nalaze u crijevu su patogeni ili potencijalni patogeni ukoliko integritet sluzničke barijere bude narušen. Važno je istaknuti da je normalna interakcija između bakterija koje se nalaze u crijevu i njihovog domaćina predstavlja simbiotski odnos koji donosi korist bakterijama i domaćinu (63).

Crijevne bakterije imaju važnu i specifičnu ulogu u domaćinu koja se u funkcionalnom smislu može svrstati u tri kategorije: metaboličku, protektivnu i trofičku.

**Metabolička funkcija** crijevne flore se očituje u fermentaciji neprobavljivih sastojaka hrane i endogene sluzi. Različitost gena u zajednici mikroorganizama omogućava prisutnost različitih enzima i biokemijskih puteva koji dopunjavaju domaćinove mogućnosti probave (64). **Protektivnu funkciju** mikroflore zapravo predstavlja učinak barijere koja sprječava invaziju crijevne sluznice patogenim mikroorganizmima. Rezydentne bakterije predstavljaju jednu od najvažnijih linija obrane od egzogenih mikroba ili oportunističkih bakterija koje su prisutne u crijevu, ali im je rast spregnut i ograničen. Ravnoteža između vrsta rezydentnih bakterija je preduvjet stabilnosti

mikrobne populacije sluznice. Učinak barijere se zasniva na svojstvu i sposobnosti određenih bakterija za lučenje antimikrobnih supstanci (bakteriocina), a također i na kompeticiji za hranjive tvari kao i na vezanju u ekološke niše (65, 66, 67).

**Trofička funkcija** crijevne mikroflore je predmet intenzivnih istraživanja tijekom prethodnih nekoliko godina. Rezultati objavljenih istraživanja govore o specifičnom svojstvu crijevne flore koja se očituju u regulaciji rasta, diobe i diferencijacije epitelnih stanica. Rast, dioba i diferencijacija (engl. "Turnover") epitelnih stanica kripti debelog crijeva je smanjen u životinja koje su uzgojene bez crijevne flore ("germ-free animals"), u usporedbi s kontrolnim životinjama uzgojenim u normalnom okolišu (61). Postoje dokazi da je diferencijacija epitelnih stanica pod izrazitim utjecajem rezidentnih mikroorganizama što se očituje u smanjenoj ekspresiji gena koji su isključivo povezani sa specifičnim bakterijskim vrstama, zabilježenoj u germ-free životinja (68). Bakterije također igraju izrazito važnu ulogu u razvoju imunološkog sustava. U životinja koje su uzgojene bez crijevne flore bilježi se smanjen broj i gustoća limfoidnih stanica i limfnih folikula u crijevnoj sluznici, a koncentracije cirkulirajućih imunoglobulina su niske. S druge strane, u istih se životinja nakon akvizicije crijevne flore u normalnim uvjetima bilježi porast broja limfocita u sluznici, u limfnim se folikulima pojavljuju germinalni centri i limfoblasti, plazma stanice koje luče imunoglobuline, a zabilježen je i značajan porast koncentracije imunoglobulina u serumu. (61, 69, 70). Višestruke i različite interakcije između mikroba, epitela i limfoidnog tkiva pridruženog crijevu u dinamičkoj ravnoteži neprestance iznova preoblikuju lokalne imunološke mehanizme, a mogu utjecati i na sistemnu imunost.

Osnovni patogenetski mehanizam koji leži u podlozi upalne bolesti crijeva je slom tolerancije imunološkog sustava crijeva na vlastitu crijevnu floru. Tako rezidentna

bakterijska flora postaje činitelj aktivacije imunološkog sustava uz posljedično oštećenje tkiva i perpetuaciju upale (64, 71). U bolesnika s upalnom bolesti crijeva se bilježi pojačano sluzničko lučenje proupalnih IgG, upravljenih prema komenzalnim bakterijama, a također je zabilježena hiperreaktivnost T limfocita sluznice na antigene normalne flore što ukazuje na oštećenje mehanizama lokalne tolerancije (72, 73). Citokini su proteini male molekularne težine koje luče različiti tipovi stanica. Prvenstveno ih stvaraju mononuklearni fagociti i limfociti, ali i druge različite stanice kao što su fibroblasti, mezenhimalne stanice koštane srži, endotelene i epitelne stanice. Citokini imaju autokrina, parakrina i endokrina svojstva, reguliraju imunološku i upalnu reakciju, stvarajući kompliciranu mrežu signala između imunoloških i neimunoloških stanica. Spomenuta komunikacija se odvija preko specifičnih receptora čija izraženost i gustoća na površini stanica nije stalna već se ekspresija receptora istih može značajno potaknuti ili posve dokinuti. Osim posredovanja i regulacije imunološke reakcije i upale, citokini imaju značajnu ulogu u hematopoezi i reparaciji tkiva.

Prema osnovnom načinu djelovanja citokini se dijele u tri skupine:

1. upalne, koji uzrokuju aktivaciju mijeloidnih stanica

(IL-1, IL-6, IL-8,  $TNF\alpha$ ,  $TGF\beta$ )

2. regulatorne, koji utječu na proliferaciju i diferencijaciju limfocita

(IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13,  $IFN\gamma$ ,  $TGF\beta$ )

3. hematopoetske, koji utječu na rast progenitorskih stanica

(IL-1, IL-6, IL-7,  $TNF\alpha$ , M-CSF, GM-CSF, MULTI-CSF/ IL-3) (74).

U imunološkoj reakciji tipa Th 1 ili staničnom obrascu imunološkog odgovora pretežito se luče IL-2 i IFN- $\gamma$ , a u imunološkoj reakciji tipa Th 2 ili humoralnom obrascu imunološkog dogovora pretežito se luče IL-4, IL-5, IL-10, i IL-13. S druge strane, populacija regulacijskih T-limfocita (Treg stanice) je povezana s fiziološkom regulacijom i ograničavanjem (supresijom) imunološkog odgovora (hiperreakcije) i tijekom tog procesa pretežito se luče IL-10 i TGF- $\beta$  (75)

#### 1.2.4.1. TNF $\alpha$

ČIMBENICI NEKROZE TUMORA (TNF $\alpha$ : kahektin i TNF $\beta$ :limfotoksin). TNF $\alpha$  je izvorno izoliran i opisan kao slobodni čimbenik iz makrofaga koji ima sposobnost izazivanja hemoragične nekroze tumora i kaheksije udružene s kroničnom upalom te uzrokuje inhibiciju sinteze lipoproteinske lipaze. TNF $\beta$  je opisan kao produkt aktiviranih limfocita sa sposobnošću lize ciljnih stanica i nazvan je limfotoksin. Kahektin i limfotoksin pokazuju 26% identičnosti i 51% homologije pa je na temelju opisane sličnosti strukture i funkcije predložen naziv TNF $\alpha$  za čimbenik kojeg stvaraju makrofagi i TNF $\beta$  za onaj koji stvaraju limfociti (76). Poznato je da su mnogi učinci bakterijskih produkata i LPS posredovani lučenjem TNF $\alpha$ . Štoviše, LPS predstavlja moćan poticaj za lučenje TNF $\alpha$ . Visoke doze TNF $\alpha$  imaju učinak sličan endotoksičnom šoku te se smatra da je ovaj protein iz makrofaga glavni posrednik djelovanja endotoksina. TNF $\alpha$  je također središnji medijator propadanja (konsumpcije) koje prati kronične iscrpljujuće bolesti i također, poput IL-1 ima svojstvo endogenog pirogena djelujući direktno na hipotalamus stimulira stvaranje IL-1 (77). TNF $\beta$  posjeduje učinak na ljudske limfocite B i fibroblaste sličan učinku faktora rasta. Učinci TNF $\alpha$  i TNF $\beta$  su dijelom rezultat njihovog pospješivanja lučenja drugih citokina kao što su IL-1, GM-CSF i IFN- $\beta$ <sub>2</sub>, i obrnuto, lučenje je TNF

stimulirano IFN $\gamma$  i lipopolisaharidom. Štoviše, antitumorski učinak TNF-a izrazitiji je u prisutnosti IFN $\gamma$ . Poglavitito TNF $\alpha$ , i u manjoj mjeri IL-1 predstavljaju glavne proupalne citokine čija svojstva uključuju kemotaksiju neutrofila i poticaj za endotelne stanice na ekspresiju adhezijskih molekula što predstavlja presudan korak u početnoj upalnoj reakciji. (74, 78).

#### 1.2.4.2. TGF $\beta$

TGF- $\beta$  predstavlja inhibitorni citokin koji se prepoznaje kao ključni regulator imunološke homeostaze i upalnog odgovora. Smanjena TGF- $\beta$  aktivnost se smatra odgovornom za razvoj proupalnih stanja bolesti u više kroničnih bolesti, uključivši UBC. Oštećena TGF- $\beta$ 1 signalizacija zbog visokih razina Smad7 je jedno od obilježja UBC. Bolesnici s ulceroznim kolitisom iskazuju povećanu produkciju TGF- $\beta$ 1 od strane mononuklearnih stanica lamine proprije, (LPMC) u usporedbi s bolesnicima s Crohnovom bolešću i zdravim ispitanicima. TGF beta djeluje na sistemski imunološki odgovor u smislu snažnog imunosupresivnog djelovanja no lokalno može imati proupalna svojstva (79). U istraživanjima je dokumentirano da TGF- $\beta$  može djelovati u suglasju s epidermalnim, faktorima rasta fibroblasta kao i VEGF da se sačuva tkivo domaćina od luminalnih izazova i potakne cijeljenje oštećenja sluznice u UBC. (74)

#### 1.3. Upalne bolesti crijeva

Upalne bolesti crijeva (UBC engl. inflammatory bowel disease – IBD) predstavljaju značajan javnozdravstveni i klinički problem. Prema definiciji, UBC su idiopatske, upalne, kronične bolesti probavnog sustava, nepredvidljiva tijeka, a uključuju Crohnovu bolest, ulcerozni kolitis, intermedijarni kolitis i mikroskopski kolitis. Osim upale probavne cijevi UBC mogu prouzročiti i patološke promjene na drugima organima (ekstraintestinalne manifestacije) kao što su koža, jetra, oči i zglobovi. U

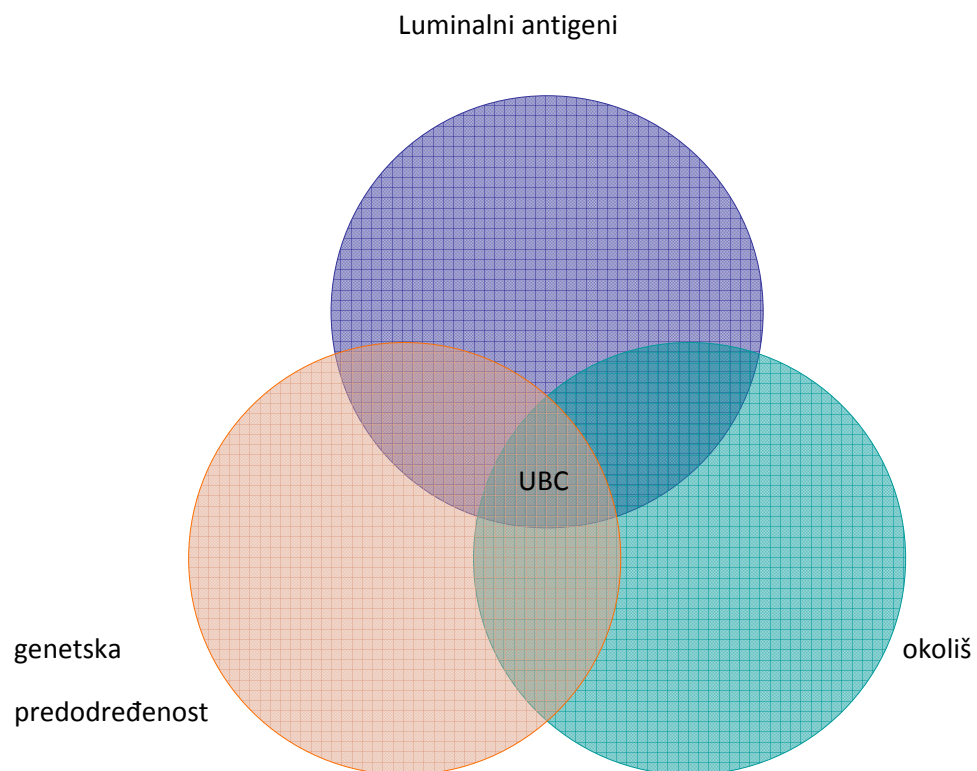
etiopatogenezi bolesti su prepoznati genetski činitelji i činitelji okoliša. Pravi uzrok UBC nije do kraja poznat no pretpostavka je da je bolest posljedica agresivnog stečenog imunološkog odgovora crijeva na mnoštvo bakterijskih antigena normalne flore, u genetski osjetljivog domaćina (80).

### 1.3.1. Etiopatogeneza

U Crohnovoj bolesti prevladava stanično posredovani Th1 obrazac imunološkog odgovora koji je karakteriziran povećanim stvaranjem i lučenjem proupalnih citokina  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-2$ ,  $IL-12$  i  $IL-18$ , ulcerozni kolitis je pretežito obilježen humoralno posredovanim Th2 obrascem imunološkog odgovora koji je karakteriziran povećanim stvaranjem i lučenjem  $IL-4$ ,  $IL-5$ ,  $IL-10$ , i  $IL-13$ . Važno je istaknuti da pojedini citokini koji su uključeni u oba obrasca reakcije mogu imati različite učinke tijekom akutne i kronične faze Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa, odnosno činjenica je da ne postoji uvijek oštra podjela na različite tipove imunološkog odgovora već se mogu uočiti preklapanja (81).

Kronična je faza Crohnove bolesti obilježena nekontroliranom, produženom i perpetuiranom transmuralnom upalom uz stvaranje granuloma koja je posljedica neodgovarajućeg, agresivnog stečenog imunološkog odgovora no akutna je faza obilježena slomom tolerancije na antigene vlastite flore koji se povezuje s defektima u prirođenoj imunosti. Stoga se smatra da je bolest rezultat poremećena imunološkog odgovora u genetički predisponiranih bolesnika. (Slika 2)

**Slika 2.** Etiopatogeneza upalne bolesti crijeva (Prilagođeno prema " Siminovitch KA. Advances in the molecular dissection of inflammatory bowel disease. Semin Immunol 2006;18(4):244-53. ")





Uvažavajući činjenicu da je Crohnova bolest poligeniski uvjetovana, žarište interesa u vezi s povezanosti genske podloge i urođene imunosti u etiopatogenezi bolesti je istraživanje *NOD2/CARD15*, kao prvog gena koji može dijelom objasniti osjetljivost/sklonost za razvoj bolesti (82, 83). Gen *CARD15* na 16. kromosomu (lokus UBC1) i njegov produkt – intracelularni protein NOD2 umiješani su u prepoznavanje bakterijskog muramil-peptida (MDP) i potiču sekreciju antimikrobnih peptida, poglavito defenzina koji štite domaćina od bakterijske invazije. NOD2 protein se nalazi intracelularno, u makrofagima, epitelnim stanicama i Panethovim stanicama. U bolesnika su mutacije NOD2 uzrok pogrešnog prepoznavanja vlastite crijevne flore uz posljedicu neodgovarajuće imunološke reakcije i upalu crijevne sluznice. Važno je istaknuti činjenicu o nedavno dokumentiranom međudjelovanju između NOD receptora (NLR) i TLR signalnih puteva što dovodi do aktivacije NF $\kappa$ B. (84)

Intestinalni epitel ima presudnu ulogu u održavanju imunološke ravnoteže crijeva budući predstavlja zaštitnu barijeru između intestinalnih patogena, fiziološke crijevne flore i sluzničkih odjeljaka ispod epitela, prvenstveno lamine proprije. Epitel također ima ulogu u prezentaciji antigena i luči citokine i kemokine kao odgovor na interakciju s bakterijama. Poremećaj epitelne barijere i njezina povećana propusnost mogu predstavljati primarni defekt koji dovodi do gubitka imunološke tolerancije uz posljedični gubitak normalnog obrasca kontrolirane upale.

### 1.3.2. Klinička slika

U Crohnoj bolesti je upala transmuralna i može zahvatiti bilo koji odsječak probavne cijevi, uz česte lokalne komplikacije izvan crijeva. Incidencija CB je 0,5 – 11,6 novih bolesnika na 100 000 stanovnika, uz tendenciju porasta tijekom nekoliko prethodnih desetljeća. Bolest najučestalije započinje između 15. i 30 godine života,

učestalija je u bijelaca nego u crnaca i orijentalnih rasa. Također je učestalija u određenim obiteljima. Najčešće se od simptoma javljaju proljev, bol u trbuhu i gubitak na težini. Transmuralna je upala često uzrok lokalnih komplikacija: striktura, fistula i intraabdominalnih apscesa. Fistule mogu postojati između vijuga crijeva, širiti se između crijeva i kože, prodirati u okolne strukture ili se prezentirati kao perianalna bolest. Ekstraintestinalne manifestacije kao što su periferni artritis, nodozni eritem, pioderma gangrenozum i episkleritis koreliraju s aktivnošću crijevne bolesti.

Ulcerozni kolitis zahvaća isključivo debelo crijevo i simptomi prvenstveno ovise o proširenosti bolesti u debelom crijevu i aktivnosti upale. Upalne promjene zahvaćaju poglavito sluznicu i u manjoj mjeri submukozu i nalazimo ih uvijek u kontinuitetu od rektuma prema proksimalnijim dijelovima debelog crijeva. Incidencija se bilježi sa različitom učestalošću: od 0,6 do 24,5 bolesnika na 100 000 stanovnika. Distribucija bolesti je bimodalna uz dvije vršne incidencije: u dobnim skupinama 20-40 godina i 60-80 godina starosti. Etničke i genetske studije pokazuje slične rezultate kao kod Crohnove bolesti. Glavni klinički simptom je bol u trbuhu i pojava učestalih stolica uz primjese krvi, sluzi i gnoja. Učestale stolice su često praćene bolnim naponima uz lažne pozive na stolicu. Pušenje predstavlja izraziti čimbenik rizika za pogoršanje i teži klinički tijek Crohnove bolesti dok je u ulceroznom kolitisu zaštitni čimbenik. U pušača je dokumentiran povećan sadržaj sluzi na sluznici debelog crijeva što predstavlja mogući zaštitni čimbenik. U literaturi su opisana opažanja da je prethodna apendektomija rijetkost u bolesnika s ulceroznim kolitisom.

Ekstraintestinalne manifestacije koje koreliraju s aktivnošću ulceroznog kolitisa su periferni artritis, nodozni eritem, pioderma gangrenosum i episkleritis. Bolesti koje su povezane s određenim biljezima u HLA sustavu i ne koreliraju s aktivnošću crijevne upale su primarni sklerozirajući kolangitis, ankilozantni spondilitis i sakroileitis (85).

### 1.3.3. Terapija

U ciljevima terapije upalnih bolesti crijeva razlikujemo kliničke ciljeve koji se odnose na postizanje i održavanje remisije bez steroida i trajno zatvaranje fistula; ciljeve na razini crijeva u koje ubrajamo potpuno zacijeljenje crijevne sluznice i fistula uz održavanje zacijeljenja te ciljeve u vezi s tijekom bolesti koji se odnose na sprječavanje i smanjenje broja komplikacija, hospitalizacija i kirurških zahvata.

Činjenica je da postignuta i održana klinička remisija bolesti smanjuje učestalost hospitalizacija i potrebu kirurških zahvata te poboljšava opću kvalitetu života, radnu, seksualnu i reproduktivnu sposobnost. S druge strane, upalne bolesti crijeva su poligenski uvjetovane uz utjecaj različitih činitelja iz okoliša te ne postoji jedinstveni lijek, u većini je slučajeva terapija obično sekvencijska, kombinirana i dugotrajna što za posljedicu ima nastanak značajnih nuspojava terapije koje se pojavljuju s različitom učestalosti.

#### 1.3.3.1. Konvencionalna terapija

U konvencionalnoj terapiji upalnih bolesti crijeva se rabe kortikosteroidi, 5-aminosalicilati i imunomodulatori: azatioprin i 6-mekaptopurin te metotreksat.

Navedeni lijekovi se zavisno o svojim svojstvima te opsegu, sijelu i aktivnosti bolesti koriste u obliku različitih pripravaka i putem različitih načina primjene: peroralno, parenteralno ili topički (u obliku klizme ili supozitorija).

Glukokortikoidi (GK) posjeduju snažno protuupalno djelovanje putem mnogih mehanizama i koriste se kao parenteralni (intravenski), peroralni i topički pripravci.

GK se vežu na unutarstanično smješteni receptor i kompleks GK-receptor migrira u

jezgru gdje povećava transkripciju pojedinih gena čiji proizvodi imaju protuupalni učinak i obratno, smanjuje transkripciju gena čiji proizvodi imaju proupalni učinak. Vežanje kompleksa GK-citoplazmatski receptor za genom rezultira sintezom inhibicijskog čimbenika za NFkappaB (IkappaBalfa) što rezultira kompetitivnim sprječavanjem vežanja aktivatora NFkappaB na transkripcijski čimbenik. Istodobno IkappaBalfa u jezgri odvaja NFkappaB od genoma nakon čega se NFkappaB vraća u citoplazmu, a transkripcija mRNA za proupalne se činitelje prekida. Štoviše, GK se vežu na NFkappaB u jezgri i time inhibiraju njegove učinke. Opisano djelovanje glukokortikoida dokazano je za T-limfocite i stanice monocitno-makrofagnog reda. Konačni protuupalni učinci GK su rezultat djelovanja na NFkappaB koji regulira sintezu različitih proupalnih citokina, primjerice TNFalfa, IL-1, IL-2. Učinci GK na krvne stanice *in vivo* uključuju polimorfonuklearnu leukocitozu, pad apsolutnog broja limfocita T i B, porast relativnog udjela stanica CD8 i NK stanica te pad broja monocita. Primjena GK također rezultira smanjenjem izraženosti adhezijskih molekula na površini endotelnih stanica, smanjenjem migracije neutrofila, eozinofila i monocita-makrofaga što za posljedicu ima leukocitozu i lokalni protuupalni učinak. GK su učinkoviti u postizanju remisije i liječenju relapsa upalnih bolesti crijeva, ali nisu učinkoviti u održavanju remisije i imaju relativno slab učinak u postizanju zacjeljenja sluznice. S druge strane, dugotrajna sustavna primjena GK u bolesnika s upalnim bolestima crijeva nosi visoki rizik ranih (akne, edemi, nepodnošenje glukoze) i kasnih (katarakta, povećana sklonost infekcijama, osteoporoza, miopatija, zastoj rasta u djece) nuspojava. Zbog toga su razvijeni nesustavni oblici GK, primjerice budesonid koji imaju značajno manje nuspojava (86).

Mesalazin (5-ASA) je aktivna supstanca koja djeluje protuupalno inhibicijom stvaranja i lučenja citokina i proupalnih medijatora te putem pojačane izraženosti

PPARgamma (engl. peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) u epitelnim stanicama crijeva. Derivati 5-ASA se koriste u terapiji UBC-a kao peroralni i topički pripravci, u obliku klizme ili supozitorija. Budući aminosalicilati djeluju topički na bolesno crijevo neophodno je omogućiti dostavu adekvatne doze lijeka u oboljeli segment crijeva i s tim su razlogom razvijeni različiti pripravci: primjerice azo-konjugati iz kojih se djelatna 5-ASA oslobađa djelovanjem bakterijskih azo-reduktaza u kolonu (sulfasalazin, olsalazin, balsalazid); oblaganje ovojnicom koja se otapa kod određenog pH ili se lijek nalazi u mikrogranulama obloženim etilceluloznom semipermeabilnom membranom koja se kontinuirano otapa duž prolaska kroz čitavo tanko i debelo crijevo; primjena lijeka lokalno u obliku klizmi ili supozitorija (86).

Nuspojave sulfasalazina ovisne su o dozi lijeka, pojavljuju se u 10-45% bolesnika i uključuju oligospermiju, deficit folata i rjeđe pankreatitis, agranulocitozu, alveolitis, sindrom Stevens-Johnson, hemolitičku anemiju. Nuspojave na mesalamin su rijetke, pojavljuju se u oko 2% bolesnika i uključuju proljev, mučninu, glavobolju, alergijski osip i rijetke idiosinkratične reakcije kao što su intersticijski nefritis i nefrotski sindrom. Meta-analize objavljenih randomiziranih kontroliranih istraživanja pokazuju da su aminosalicilati učinkovitiji od placeba u liječenju upalnih bolesti crijeva, poglavito Crohnove bolesti no nemaju učinka u terapiji održavanja nakon lijekovima postignute remisije. Indicirani su kao terapija održavanja nakon resekcije tankog crijeva, u dozi većoj od 2 grama dnevno. Čini se da aminosalicilati imaju svoje mjesto u kemoprevenciji nastanka kolorektalnog karcinoma u bolesnika s kolitisom.

Imunosupresijski lijekovi azatioprin (AZA) i 6-merkaptopurin (6-MP) te metotreksat (MTX) pripadaju skupini antimetabolita. AZA koji kao i 6-MP pripada skupini tiopurina je imidazolski derivat merkaptopurina koji se u svom aktivnom obliku ugrađuje u DNK i inhibira sintezu purina te proliferaciju limfocita T i B. Djeluje

citotoksično i razara podražene limfoidne stanice, na taj način blokira primarnu imunološku reakciju i sekundarnu proizvodnju protutijela. AZA i 6-MP su učinkoviti u postizanju i održavanju remisije te u zacjeljenju sluznice kod bolesnika s upalnom bolesti crijeva. Indicirano je uvesti ih u terapiju kod bolesnika ovisnih o GK, rezistentnih na GK i u bolesnika s ekstenzivnom bolešću tankog crijeva i prvenstveno se koriste kao lijekovi koji omogućuju smanjivanje i ukidanje GK i održavanje stabilne remisije bolesti. AZA je prolijek koji se koji se konvertira u 6-MP te dalje u eritrocitima metabolizira u 6-tiogvanin (6-TG) djelovanjem enzima tiopurin-metiltransferaze (TPMT). Genski polimorfizam TPMT je klinički važan zbog prepoznavanja moguće predisponiranosti za razvoj nuspojava. AZA djeluje odgođeno zbog duga poluvremena 6-TG u eritrocitima (nekoliko tjedana ili mjeseci) (86).

Metotreksat se primjenjuje u istim indikacijama kao tiopurini, ali u bolesnika koji su refraktorni na AZA ili 6-MP ili ih ne podnose. MTX kao antimetabolit djeluje kao antagonist folne kiseline. U indukcijskoj fazi se daje parenteralno (25 mg/kg u i.m. ili s.c. primjeni), a u fazi održavanje je moguće nastaviti s peroralnom primjenom lijeka. Rana toksičnost MTX je povezana sa simptomima probavnog sustava, a ozbiljnije nuspojave predstavljaju hepatotoksičnost i pneumonitis.

Ciklosporin ciklički undekapeptid koji se koristi u teškom obliku ulceroznog kolitisa refrakternog na GK. Primjena lijeka zahtjeva nadzor bolesnika zbog moguće nefrotoksičnosti i neurotoksičnosti (86).

#### 1.3.3.2. Antibiotici

U konvencionalnu antibiotsku terapiju upalnih bolesti crijeva prvenstveno ubrajamo primjenu metronidazola (MN) i ciprofloksacina (CF) u liječenju septičnih komplikacija, bakterijskog prerastanja u crijevu i liječenju perianalne bolesti. Prema rezultatima

objavljenih kliničkih istraživanja antibiotici u monoterapiji nisu učinkoviti u postizanju i održavanju remisije upalnih bolesti crijeva, ali ih je opravdano primijeniti u teškom obliku upalne bolesti crijeva, u ukupnom trajanju terapije do 6 mjeseci. Nuspojave primjene MN su pretežito simptomi probavnog sustava kao što je metalan okus u ustima i mučnina; najvažnija je nuspojava nastanak periferne neuropatije koja u nekih bolesnika može biti ireverzibilna. U primjeni MN zabilježen je umjeren učinak u ileokoloničnoj bolesti, ali ne i u CB tankog crijeva. Zabilježen je učinak MN u prevenciji relapsa nakon kurativne resekcije tankog crijeva. Primjena lijeka je opravdana i u bolesnika s "pouchitisom", nakon kolektomije zbog ulceroznog kolitisa. (86) CF se bolji podnosi i učinkovit je u liječenju CB i UK te u liječenju perianalne bolesti, kao nuspojave liječenja se bilježe tendinitisi i rupturi Ahilove tetive. Tijekom prethodnih nekoliko godina osobitu pozornost izaziva primjena makrolidnih antibiotika u liječenju upalnih bolesti crijeva, uključivši njihov antibiotski i imunomodulacijski učinak (87). Klinička istraživanja bilježe povoljan učinak klaritromicina (ponekad u kombinaciji s rifabutinom) u liječenju CB (88). Azitromicin je makrolidni antibiotik koji se često koristi u svakodnevnoj praksi u liječenju raznih infekcija. Pokazuje bolju aktivnost prema gram negativnim bakterijama nego većina ostalih makrolida. Sve je veći broj istraživanja koji govore u prilog da osim svojih antibakterijskih svojstava, makrolidni antibiotici posjeduju i širok spektar protuupalnih i imunomodulacijskih učinaka (89, 90, 91). Makrolidi se akumuliraju u upalnim stanicama posebno neutrofilima i makrofagima (92, 93, 94), inhibirajući sintezu slobodnih radikala kisika i lučenje proupalnih citokina (95, 96, 97, 98, 99, 100). Novija istraživanja dokumentiraju protuupalni učinak azitromicina u eksperimentalnom modelu akutnog kolitisa ukazujući da je učinak postignut bez značajnog utjecaja na luminalne bakterije (101).

Dvogodišnja klinička studija bolesnika s Crohnovom bolešću liječenih rifabutinom i azitromicinom zabilježila je smanjenje aktivnosti bolesti po Harvey Bradshaw indeksu nakon 6 mjeseci terapije, uz napomenu da je učinak terapije bio bolji u bolesnika s proširenom bolesti i većom aktivnosti bolesti (102).

#### 1.3.3.3. Biološki lijekovi

Patogeneza upalnih bolesti crijeva je karakterizirana neravnotežom proupalnih i protuupalnih medijatora kao posljedicom djelovanja proupalnih citokina. Sukladno tome, svaki je korak i stupanj u upalnoj kaskadi potencijalni terapijski cilj. U skupinu bioloških lijekova pripadaju protutijela, dijelovi protutijela na nosaču ili fuzijski proteini koji se upravljani protiv citokina, receptora za citokine, adhezijskih molekula ili drugih molekula koje sudjeluju u upalnom procesu. Zbog svojih svojstava, veličine i složenosti velike molekule i moguće razgradnje u probavnom sustavu prvenstveno se primjenjuju parenteralno. Najviše saznanja o učinkovitosti u liječenju upalnih bolesti crijeva postoji u vezi s antagonistima TNF-alfa: infliksimabu (IFX), adalimumabu (ADA) i certolizumab-pegolu. IFX i ADA su učinkoviti u postizanju i održavanju remisije te u zacjeljenju sluznice u bolesnika s upalnim bolestima crijeva. Nuspojave infliksimaba uključuju razvoj protutijela na lijek koja su dogovorna za infuzijsku reakciju tijekom promjene IFX, gubitak djelotvornosti i odgođenu reakciju tipa serumske bolesti. Kod primjene IFX osobita se pozornost treba posvetiti probiru i nadzoru oportunističkih infekcija. Incidencija malignih bolesti se još uvijek prati kod duže liječenih bolesnika sa svrhom procjene potencijalnog povišenog rizika.

#### 1.4. Eksperimentalni modeli crijevne upale

Nedovoljno razjašnjena etiologija i patogeneza upalnih bolesti crijeva nametnula je potrebu za eksperimentalnim traženjem odgovora na znanstvena i



praktična pitanja. Navedena činjenica ima za posljedicu pokuse iz kojih su nastali brojni eksperimentalni modeli za istraživanje crijevne upale. Na taj su način dobivene važne spoznaje o funkciji imunološkog sustava pridruženog crijevu koji je jedinstven i osobit (103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111). Idealan eksperimentalni model trebao bi u svemu biti identičan humanoj bolesti: trebao bi imati istu etiologiju, patogenezu, kliničku sliku i isti terapijski učinak poznatih lijekova koji se primjenjuju u ljudi. Takav model mora imati zadovoljavajuću reproducibilnost u ponavljanim pokusima uz ograničen broj manipulacija, dostupnost i etičko postupanje sa životinjama te razumne troškove. Sukladno navedenim kriterijima niti jedan do sada ustanovljeni model nije apsolutno prihvatljiv, ali niti ne stoji tvrdnja da je potpuno neprihvatljiv (105, 112).

Eksperimentalni modeli nadopunjuju i proširuju klinička istraživanja upalnih bolesti crijeva jer omogućuju ispitivanje i procjenu pojedinih sastavnica crijevne upale i razvoj novih terapijskih mogućnosti na način koji nije moguć u ljudi. Različitim se modelima mogu proučavati rane faze crijevne upale te uloga genetske predispozicije, bakterijskog mikrokoliša i stečene imunološke reakcije, a kasnije faze upale koje karakteriziraju nespecifični upalni infiltrati, različiti citokini te procesi cijeljenja mogu biti bolje istraživani u drugim pokusnim modelima (113, 114).

Opažanja u pokusima na modelima crijevne upale bilježe da je prisutnost normalne mikroflore neophodna za nastanak crijevne upale u miševa u kojih postoji sklonost razvoju bolesti (115, 116). Rezultati tih istraživanja govore da crijevna upala bez obzira na genetičku pozadinu nastaje kao rezultat neodgovarajućeg odgovora na već prisutne antigene mikroflore, a ne na neki patogen. Tako hipoteza o potrazi za specifičnim patogenom gubi na snazi, tim više što rezultati objavljenih istraživanja ukazuju na bakterijski flagelin kao na jedan od potencijalnih patogenetskih činitelja u

upalnim bolestima crijeva. Nije posve jasno da li flagelin ima ulogu liganda za TLR ili djeluje kao antigen (105).

#### 1.4.1. Podjela eksperimentalnih modela i mehanizmi indukcije crijevne upale

U objavljenim istraživanjima je opisan čitav niz načina na koji je pokušana indukcija crijevne upale u pokusnim životinjama. S druge strane, u literaturi se mogu naći i različiti načini podjele eksperimentalnih modela u različite skupine, zavisno o načinu indukcije upale, obrascu imunološkog odgovora i načinu sloma tolerancije na antigene mikroflora (115).

##### 1.4.1.1. Spontani i inducirani modeli

Osnovna podjela modele dijeli na inducirane i spontane. U skupini induciranih modela crijevna upala je izazvana na tri načina: prijenosom materijala iz bolesnika u pokusne životinje; lokalnom primjenom kemijske ili farmakološke supstance; ili unošenjem polimera i dijelova mikroba (Tablica 1) (109). Spontane modele, u kojima crijevna upala nastaje bez lokalnog unošenja nekse dijelimo na nastale u nemanipuliranim životinjama i nastale u manipuliranim životinjama (transgenični štakori i miševi i "knockout" modeli miševa) (109, 117)

**Tablica 1.** Najčešće rabljeni pokusni modeli upalnih lezija crijeva podijeljeni u skupine prema načinu izazivanja upalnih promjena. (Prilagođeno prema " Anić B. Utjecaj imunosupresiva na lezije crijeva izazvane 2,4-dinitrofluorobenzenom u prethodno senzibiliziranih miševa (Disertacija). Medicinski fakultet sveučilišta u zagrebu, 1999.")

A. <u>INDUCIRANI MODELI</u>	
1. izazvani prijenosom materijala iz bolesnika u pokusne životinje	
2. izazvani kemijskim/farmakološkim agensima	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>Imunokompleksi/formalin</b></li> <li>➤ <b>DNCB</b></li> <li>➤ <b>2,4 DNFB</b></li> <li>➤ <b>TNBS/etanol</b></li> <li>➤ <b>Octena kiselina</b></li> <li>➤ <b>Forbol-ester</b></li> </ul>
3. izazvani polimerima i dijelovima mikroba	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>Karaginan</b></li> <li>➤ <b>Dekstran sulfat</b></li> <li>➤ <b>PG-PS</b></li> <li>➤ <b>Amilopektin</b></li> <li>➤ <b>LGV proktitis</b></li> <li>➤ <b>N-formil-metionil-leucil-fenilalanin (N-FMLP)</b></li> </ul>
B. <u>SPONTANI MODELI</u>	
1. nastali u nemanipuliranim životinjama	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>„Cotton top“ tamarin</b></li> <li>➤ <b>Juvenilni rezus makaki</b></li> <li>➤ <b>C3H/HeJBir miševi</b></li> </ul>
2. nastali u manipuliranim životinjama	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>Transgenične životinje (HLA-B27/β2μ štakori; CD45RB miševi)</b></li> <li>➤ <b>„knockout“ modeli miševa (IL-2/-/-, IL-10/-/_ TCRβα -/_-, Gα2i -/-)</b></li> </ul>

#### 1.4.1.2. Modeli posredovani staničnim Th1 i humoralnim Th2 obrascem

Važnom se doima i podjela koja se odnosi na glavni tip obrasca imunološke reakcije u nastanku crijevne upale (pretežito Th1 ili Th2) te razlikujemo modele u kojima crijevna upala nastaje kao rezultat Th1 staničnog obrasca i prekomjernog lučenja citokina IL12, TNFalfa i IFN gamma; i modele u kojima crijevna upala nastaje kao rezultat Th2 humoralnog obrasca i prekomjernog lučenja IL-4 i IL-5. Važan je i soj pokusnih životinja jer ista noxa, primjerice prouzročena trinitrobenzen sulfonskom kiselinom (TNBS) u SJL/J miševa izaziva Th1 obrazac, a u BALB/c miševa Th2 obrazac crijevne upale (Tablica 2 , 118).

#### 1.4.1.3. Modeli s efektornim ili regulacijskim poremećajem tolerancije

Opažanja na eksperimentalnim modelima opisuju i puteve antigenske tolerancije koji uključuju: a) "klasični" obrazac tolerancije u kojem antigeni iz sluznice, pretežito proteini induciraju anergiju i deleciju T-limfocita u samoj sluznici ili nakon ulaska u cirkulaciju u organiziranim limfnim tkivima; b) proces u kojem antigen iz sluznice inducira regulacijske T-limfocite koji potaknuti tim specifičnim antigenom luče antigen nespecifične citokine IL-10 i TGFbeta (119). Spomenuta dva procesa se neprestance nadopunjuju u održavanje oralne tolerancije i homeostaze crijevne sluznice: klasičnom procesu indukcije anergije i delecije vjerojatno ne podliježu svi T-limfociti već zaostaju antigen specifične memorijske stanice koje mogu ponovno započeti

**Tablica 2.** Modeli upale sluznice klasificirani prirodom upale posredovane T stanicama (Prilagođeno prema "Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:495")

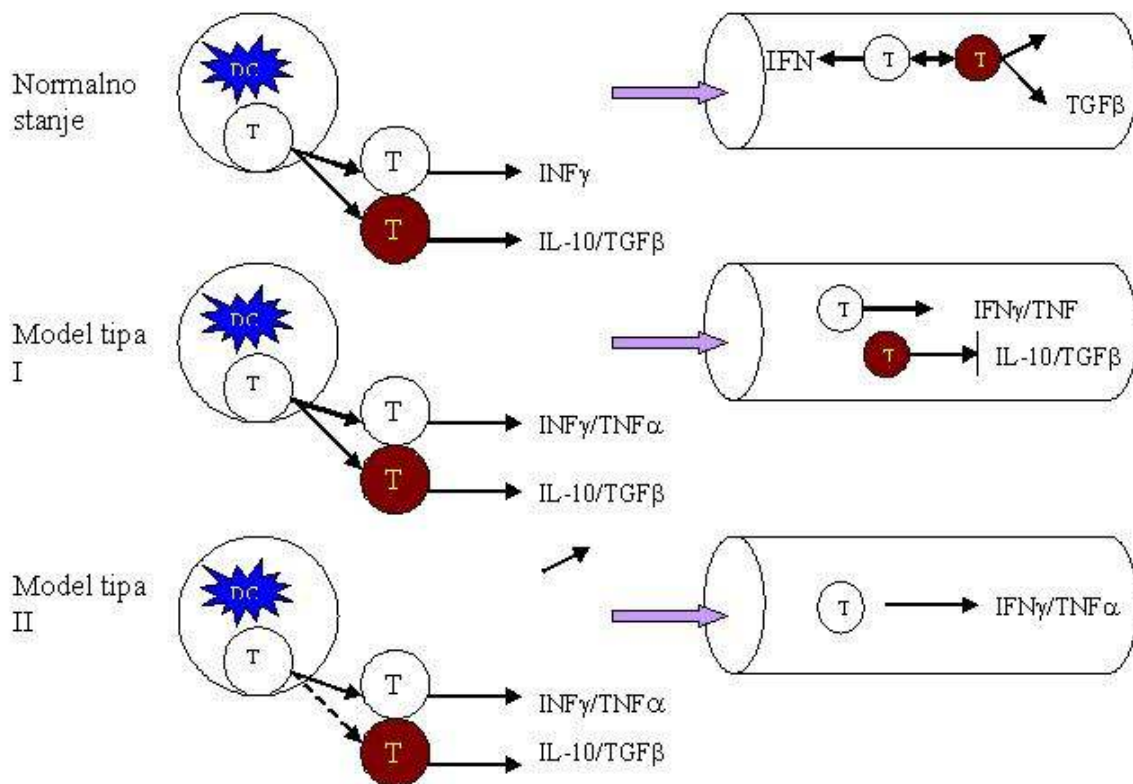
Th1 Modeli	Th2 Modeli
TNBS kolitis (SJL/J miševi)	TCR-(R) chain deficiency
SCID-transfer kolitis TCR Tg miševi s limfopenijom kolitis u IL-10 deficijenciji	TNBS kolitis in BALB/c miševi Oxazalone kolitis WASP deficiency
defekti u IL-10 signalizaciji (CRF2-4) Tg <sup>26</sup> miševi	
TNF <sup>Δ</sup> ARE miševi (TNF- $\alpha$ prekomjerna produkcija)	
C3H/HeJBir miševi	
Gi2 $\alpha$ -deficijentni miševi	
Samp1/Yit miševi T-bet Tg miševi	
STAT4 Tg miševi	
TGF- $\bar{}$ RII dominantno-negativni Tg miševi HLA-B27 Tg štakori <i>Mdr1a</i> -deficijentni miševi	
DSS kolitis	
IL-7 Tg miševi	

TNFB – trinitroflorobenzenska kiselina  
 SCID – teška kombinirana imunodeficijencija  
 TCR – T stanični receptor  
 STAT-4 provođenje signala i aktivacija transkripcije-4  
 TGF – čimbenik rasta  
 DSS – dekstran sulfat natrij  
 WASP – protein Wiscot-Aldich sindroma  
 \*\* - Miješani odgovor ali početno Th1 kasnije Th2

imunološku reakciju u susretu s antigenom i za čiji nadzor su odgovorni regulacijski T-limfociti, specifični za isti antigen (119).

Uzevši u obzir navedene činjenice eksperimentalne modele crijevne upale možemo svrstati u dvije široke kategorije: modele tipa I s poremećenim (agresivnim) efektornim mehanizmima imunološkog odgovora i modele tipa II s normalnim efektornim odgovorom i manjkavim regulacijskim mehanizmima. (Slika 3, Tablica 3) (114,115).

**Slika 3.** Modeli tipa I s poremećenim (agresivnim) efektnim mehanizmima imunološkog odgovora i modeli tipa II s normalnim efektnim odgovorom i manjkavim regulacijskim mehanizmima (Prilagođeno prema "Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:495.")





**Tablica 3.** Modeli sluzničke upale (Prilagođeno prema "Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:495.")

<b><i>Modeli tipa I</i></b>	<b><i>Modeli tipa II</i></b>
TNF <sup>are</sup> miševi	SCID- transfer kolitis
TNBS kolitis	IL-10 deficijencija i IL-10 oštećena signalizacija kolitis
?C3H/HeJBir miševi	?C3H/HeJBir miševi
Gi2 $\alpha$ -deficijentni miševi	IL-2 deficijentni miševi
STAT4 Tg miševi	TGF- $\beta$ RII dominantni negativni miševi
N-kadherin dominantni-negativni miševi	TG <sub>26</sub> miševi
IL-7 Tg miševi	
DSS kolitis	
Miševi s NF- $\kappa$ B defektima	

Neidentificirani: SAMP1/Yit miševi; HLA-B27 Tg štakori, miševi s Miskot-Aldrichovim sindromom proteinske deficijencije.

Primjer za tip I je model kolitisa na miševima transgenim STAT4 (STAT-4 provođenje signala i aktivacija transkripcije-4) u kojih nastaje agresivni i prekomjerni Th1 obrazac imunološkog odgovora posredovan IL-12. Kada se T-limfociti STAT4 miševa izlože autolognom antigenu *in vitro* i prenesu u SCID (SCID – teška kombinirana imunodeficijencija) miševe, u primatelja nastaje kolitis. Nasuprot tome, T-limfociti normalnog miša, prenešeni u SCID miševe ne izazivaju kolitis u primatelja. (120) Drugi primjer za tip I je model TNBS kolitisa u SJL/J miševa koji imaju sklonost agresivnoj reakciji potaknutoj posredovanjem IL-12, nakon narušavanja epitelne barijere etanolom i ekspozicije antigena mikroflore prema antigen-predodujućim stanicama. Takav pretretman omogućuje snažan Th1 stanični odgovor na TNBS uz brzo dokidanje regulacijske reakcije (120).

Primjer tipa II su modeli kolitisa s poremećenim ili izostalim prijenosom TGFbeta signala uslijed transgeničnih receptora na T-limfocitima i epitelnim stanicama (TGF-betaRII) što za posljedicu ima prekomjerno lučenje citokina koji pripadaju Th1 i Th2 obrascu (121).

#### 1.4.2. Eksperimentalni modeli crijevne upale i translacija prema kliničkoj znanosti i praksi

Tijekom prethodnih petnaestak godina istraživanja u modelima crijevne upale na glodavcima (štakorima i miševima) pružila su važne spoznaje koje se relevantne za etiopatogenezu i terapiju upalnih bolesti crijeva u ljudi.

Spoznaje dobivene istraživanjima u eksperimentalnim modelima crijevne upale mogu se sažeti u šest osnovnih principa (122):

1. Zajednički završni obrazac upalnog oštećenja crijeva može biti rezultat različitih genskih poremećaja uz napomenu da isti genski poremećaj nema istu

penetraciju i upalno oštećenje crijeva je također u različitim vrsta i sojeva životinja različitog opsega (122).

2. Crijevna upala je u mišjim modelima potaknuta komponentama/antigenima rezidentne crijevne flore budući životinje koje su osjetljive za crijevnu upalu, nezavisno o tipu genskog poremećaja ne dobivaju kolitis ukoliko su uzgojene bez rezidentne crijevne flore (105).
3. Crijevna upala je u mišjim modelima posljedica polarizacije prema agresivnom obrascu staničnog Th1/Th17 imunološkog odgovora ili prema obrascu humoralnog Th2 imunološkog odgovora (123).
4. Crijevna upala može nastati uslijed gubitka imunološke tolerancije sluznice (123).
5. Poremećaji urođene imunosti također doprinose nastanku crijevne upale (124, 125)
6. Narušena cjelovitost i povećana propusnost epitelne barijere za antigene predstavlja presudni korak u nastanku crijevne upale (111,126).

Navedene spoznaje predstavljaju temelj za buduća istraživanja novih ideja i provjeru valjanosti starih ideja u modelima crijevne upale i njihovu potencijalnu primjenu u kliničkim istraživanjima.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA i HIPOTEZA**

## **2.1. HIPOTEZA**

Pretpostavljamo da će izraženost TLR4 i TNFalfa biti veća u sluznici miševa s eksperimentalnom izazvanim kolitisom nego u sluznici zdravih miševa. Veća izraženost TGFbeta očekuje se u sluznici zdravih miševa. Očekujemo da će manipulacija azitromicinom, metronidazolom i metilprednizolonom rezultirati manjom izraženosti TLR4 i TNFalfa u tretiranih životinja sa eksperimentalnim kolitisom u odnosu na netretirane životinje s eksperimentalnim kolitisom.

## **2.2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

OPĆI CILJ: Pokazati promjene proupalnih i protuupalnih patogenetskih markera u manipulaciji modela eksperimentalnog kolitisa u miševa.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Dokumentirati razlike u izraženosti TLR-4, TNFalfa i TGFbeta u sluznici debelog crijeva između životinja s eksperimentalno induciranim kolitisom i zdravih životinja.
2. Dokumentirati razliku u izraženosti TLR-4, TNFalfa i TGFbeta u sluznici debelog crijeva između životinja s eksperimentalno induciranim kolitisom koje su naknadno terapijski tretirane azitromicinom, metronidazolom ili metilprednizolonom u odnosu na netretirane životinje s eksperimentalno induciranim kolitisom.
3. Usporediti ekspresiju biljega TLR-4, TNFalfa i TGFbeta između životinja s eksperimentalnim kolitisom koje su naknadno različito tretirane: azitromicinom, metronidazolom ili metilprednizolonom.

### **3. MATERIJAL I METODE**

### 3.1. Životinje i plan pokusa

Ovo istraživanje predstavlja nastavak istraživanja koje je provedeno za magistarski rad "Utjecaj azitromicina na eksperimentalni kolitis u miševa" (111). Tada je čitavo debelo crijevo miševa je uzdužno rasječeno i rastegnuto, spiralno namotano sa sluzničkom stranom na vanjskom obodu, fiksirano u puferiranom formalinu i uklapano u parafin (Slika 4).

**Slika 4.** Histološki izgled debelog crijeva zdravog miša; čitavo debelo crijevo je spiralno namotano sa sluznicom na vanjskom obodu i jasno se vidi održana struktura u svim slojevima. Preuzeto iz Pleško S. Učinak azitromicina na eksperimentalni kolitis u miševa. Magistarski rad 2002. Medicinski Fakultet sveučilišta u Zagrebu)



U ovom su se istraživanju koristile parafinske kocke sa tkivom crijeva miševa iz grupa

1. Kontrolna skupina miševa u kojih nije izazvan eksperimentalni kolitis (n=10)

2. Kontrolna skupina u kojih je izazvan eksperimentalni kolitis, ali nije tretiran (n=10)
3. Azitromicin 50mg/kg per os (n=10) 6 sati nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa i dalje tijekom 5 dana
4. Metronidazol 50mg/kg per os (n=9) 6 sati nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa i dalje tijekom 5 dana
5. Metilprednizolon 10 mg/kg intraperitonealno (n=9) 6 sati nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa i dalje tijekom 5 dana

U svih miševa iz eksperimentalnih skupina životinja uključenih u studiju izazvane su upalne promjene debelog crijeva rektalnom instilacijom otopine 2,4-dinitrofluorobenzena uz prethodnu kožnu senzibilizaciju istim spojem, na način koji je opisan za reproducibilni mišji model crijevne upale (127).

Miševi su svakodnevno promatrani i procjenjivano je njihovo zdravstveno stanje: mokra i umrljana fecesom analna regija, analno krvarenje, promjene u ponašanju, gubitak na težini i nakostriješenost krzna. Nakon žrtvovanja, debelo crijevo je izvađeno (od ileocekalnog spoja do anusa) i ispitivano na znakove proljeva, nakupljanja tekućine, krvarenja ili makroskopskih ulceracija. Skor kliničke bolesti (0-5) je određivan na bazi kriterija: >10% gubitka na tjelesnoj težini (0 ili 1), mokr anus, meka stolica ili prazan kolon (0 ili 1), analno krvarenje/okultno krvarenje (0 ili 1), prisutnost makroskopskih ulceracija (0 ili 1) i smrt (1) (128)



## 3.2. Imunohistokemija

### 3.2.1. Uvod

Za imunohistokemijsku analizu su upotrijebljena primarna protutijela na TLR4, TGF  $\beta$  i TNF- $\alpha$ . Poliklonsko TLR-4 protutijelo ab53629 (Abcam) – razrjeđenje 1:50, poliklonalno protutijelo TGF  $\beta$  protutijelo ab66043 (Abcam) – razrjeđenje 1:100 i TNF $\alpha$  monoklonsko protutijelo sc52746 (Santa CRUZ Biotechnology) – razrjeđenje 1:100. Prethodno su preparati tretirani sa citratnim puferom pH6, Dako Cytomation S1699. Analiza se izvodila na deparafiniziranim rezovima tkiva crijeva koristeći detekcijski sistem u komercijalno dostupnom kitu (Invitrogen –Histostain-SP Kits, Invitrogen LAB-SA Detection System, kat.br. 95-9943), prema uputstvima proizvođača.

### 3.2.2. Obrada parafinskih uzoraka

Prije imunohistokemijskog bojanja prvo su izrezani parafinski blokovi s tkivom crijeva miševa i stavljeni na stakalca koja su potom osušena u termostatu, a zatim deparafinirana ksinelom i rehidrirana alkoholnim nizom. Potom su stakalca isprana u PBS kupelji tijekom 10 minuta. Nakon toga su stakalca s preparatima kuhana u 10% citratnom puferu pH 6, (Dako Cytomation, kat.br. S1699) 3x5 minuta u mikrovalnoj pećnici. Nakon što su se ohladila isprana su u destiliranoj vodi, a zatim u PBS-u (engl. "phosphate buffered saline") fiziološka otopina. Dodan je reagens koji blokira peroksidazu tijekom 5 minuta, te su potom preparati dva puta isprani u PBS-u. Nakon ispiranja stakalca su inkubirana s reagensom koji blokira serum tijekom 15 minuta, a nakon toga sa reagensom koji blokira avidin također tijekom 15 minuta. Potom su stakalca isprana u PBS-u i te inkubirana u reagensu koji blokira biotin tijekom 15 minuta i ponovno isprana u PBS-u.

### 3.2.3. Primjena protutijela i bojanje

Nakon navedenog postupka stakalca su inkubirana u primarnom antitijelu tijekom dva sata. Nakon isteka dva sata stakalca su dva puta isprana u PBS, a potom inkubirana u sekundarnom protutijelu tijekom 1 sata i ponovno isprana dva puta u PBS-u.

Stakalca su inkubirana sa kromogenom tijekom 10 minuta, a zatim ispirana u destiliranoj vodi 10 minuta.

Bojana su u hemalaunu 30 sekundi, a potom isprana u običnoj vodi 10 minuta. Na kraju su stakalca poklapana i označavana.

### 3.2.4. Analiza uzoraka

Analiza uzoraka za procjenu svakog pojedinačnog biljega (TNF- $\alpha$  / TLR4 / TGF beta) napravljena je na način da su za svaki pojedini biljeg učinjena 2 -3 reza i rez negativne kontrole. Intenzitet reakcije se za svaki biljeg procjenjivan je u nekoliko mikroskopskih polja iz svakog reza (semikvantitativno u smislu skora 0 – 3) sa svrhom dobivanja srednje vrijednosti.

Za svaki je biljeg posebno procjenjivan intenzitet reakcije u neposrednoj blizini lezije i udaljeno od upalne lezije (ulkusa, nekroze) i u kojim je odjeljcima sluznice intenzitet reakcije zabilježen (epitel, lamina proprija ili dublje), odnosno za vrstu stanica na kojima je reakcija zabilježena (epitel, mononukleari ili polimorfonukleari).

#### **4. REZULTATI**

#### 4.1. Klinički skor u životinja

U svim skupinama životinja s eksperimentalnim kolitisom (chall / MP / AZ / MN) klinički skor bolesti je bio značajno veći nego u skupini zdravih životinja (vs.zdravi,  $p < 0.05$ ). Klinički skor bolesti je u skupinama koje su nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa tretirane metilprednizolonom (MP) i azitromicinom (AZ) bio je značajno manji u odnosu na skupinu životinja s eksperimentalnim kolitisom koja nije tretirana (vs. chall,  $p < 0.05$ ). Klinički skor bolesti u skupini životinja s eksperimentalnim kolitisom koje su tretirane metronidazolom (MN) nije se značajno razlikovao od kliničkog skora bolesti u skupini s eksperimentalnim kolitisom koje nisu tretirane (chall).

**Tablica 4.** Klinički skor u miševa u eksperimentalnim i kontrolnim skupinama

Tretman	Promjena težine	Skor kliničke bolesti
Kontrola (zdravi)	$1.9 \pm 0.5$	$0.0 \pm 0.0$
DNFB kolitis	$-4.8 \pm 1.1^a$	$2.7 \pm 0.3^a$
DNFB + metilpredizolon	$-3.9 \pm 0.9$	$1.8 \pm 0.4^{ab}$
DNFB + azitromicin	$-4.1 \pm 1.2$	$1.7 \pm 0.3^{ab}$
DNFB + metronidazol	$-4.3 \pm 0.8$	$2.4 \pm 0.2^a$

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  u usporedbi s kontrolom (C)

<sup>b</sup>  $p < 0.05$  u usporedbi DNFB kolitisom (CHALL)

## **4. 2. Izraženost TLR4, TNF $\alpha$ i TGF $\beta$ u sluznici debelog crijeva miševa (mjereno imunohistokemijskom metodom)**

### **4.2.1. Izraženost TLR4, TNF $\alpha$ i TGF $\beta$ u kontrolnoj grupi bez eksperimentalnog kolitisa u usporedbi s grupom sa netretiranim eksperimentalnim kolitisom - OSOBINA MODELA:**

#### 4.2.1.1. Izraženost TNF $\alpha$ u kontrolnoj grupi bez eksperimentalnog kolitisa u usporedbi s grupom sa netretiranim eksperimentalnim kolitisom

Izraženost TNF $\alpha$  na promatranim vrstama stanica u epitelnom odjeljku, lamini propriji i submukozi sluznice životinja u skupini s eksperimentalnim kolitisom i u skupini zdravih životinja prikazana je u tablici 5 i Grafikonima 1 i 2.

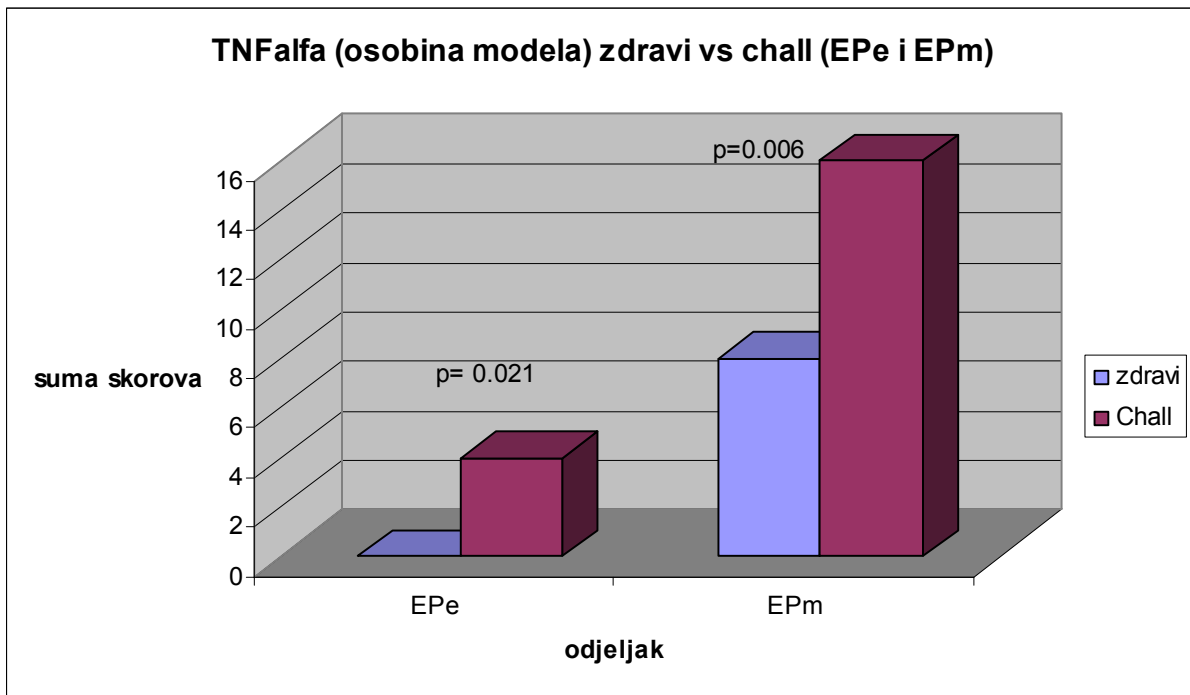
U skupini životinja s eksperimentalnim kolitisom koje nisu tretirane (chall), u sluznici uz izazvanu crijevnu leziju izraženost TNF $\alpha$  je zabilježena na sve tri vrste promatranih stanica u epitelnom odjeljku: epitelu (e), mononuklearnim (m) i polimorfonuklearnim stanicama, i na mononuklearnim stanicama lamine proprije (LP) i submukoze (SM). U sluznici skupine zdravih životinja i u sluznici udaljenoj od izazvane crijevne lezije u skupini chall, izraženost TNF $\alpha$  je zabilježena na mononuklearnim stanicama lamine proprije (LPm) i submukoze (SMm). U sluznici obje promatrane skupine nije zabilježena izraženost TNF $\alpha$  na polimorfonuklearnim stanicama lamine proprije (LPp) i submukoze (SMp).

Izraženost TNF $\alpha$  zabilježena je kao značajno veća na epitelnim i mononuklearnim stanicama epitelnog odjeljka (EPe i EPm) sluznice uz izazvanu crijevnu leziju životinja iz skupine chall, u odnosu na iste promatrane stanice sluznice zdravih životinja (EPe,  $p=0.021$  / EPm,  $p=0.006$ ) (Grafikon 1). Razlika u izraženosti TNF $\alpha$  je zabilježena između epitelnih stanica sluznice uz izazvanu crijevnu leziju i sluznice udaljeno od izazvane crijevne lezije, u skupini chall (EPe 4 vs. 0,  $p=0.046$ ) (Grafikon 2).

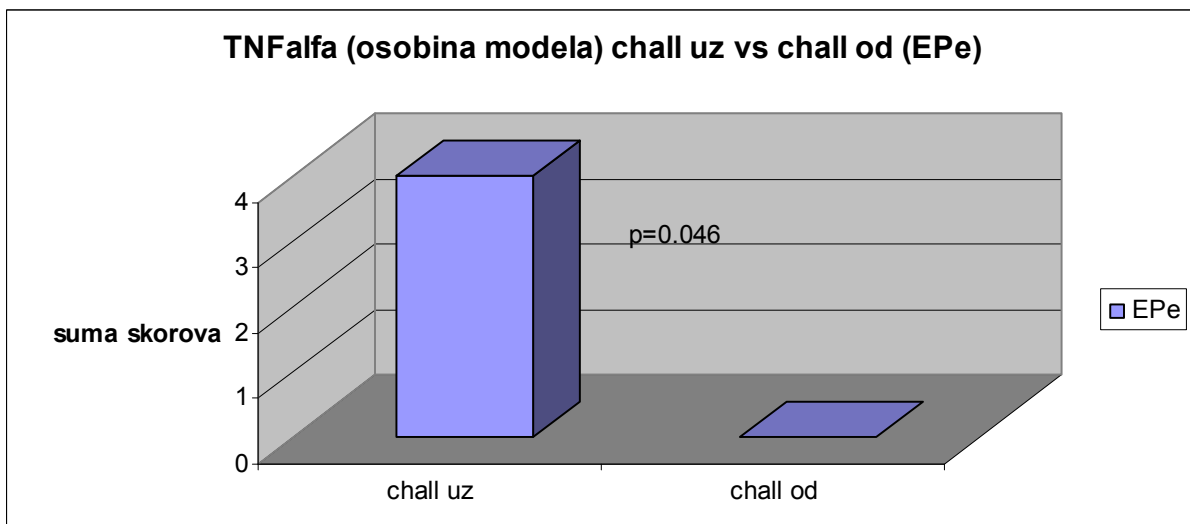
**Tablica 5.** Izraženost TNF $\alpha$  u sluznici životinja s eksperimentalnim kolitisom (chall) i sluznici zdravih životinja

<b>Skupina / Odjeljak</b>	<b>Chal-uz vs. Zdravi</b>	<b>Chall-uz vs. Chall-od</b>
EPe -Ukupni skor - medijan (raspon) - P	<b>4 vs. 0</b> 0 (0-1) vs. 0 (0-0) <b>0,021</b>	<b>4 vs. 0</b> <b>0(0-1)</b> <b>0,046</b>
EPm Ukupni skor - medijan (raspon) - P	<b>16 vs 8</b> 2(1-3)/1(0-1) <b>0,006</b>	16 vs 11 2(1-3) 0,063
EPp Ukupni skor - medijan (raspon) - P	3 vs 0 0(0-1)/0(0-0) 0,53	3 vs 0 0(0-1) 0,083
LPm Ukupni skor - medijan (raspon) - P	11 vs 8 1(1-2)/1((0-1) 0,51	11 vs 7 1(1-2) 0,059
LPp Ukupni skor - medijan (raspon) - P	Nije bilo značajne aktivnosti	Nije bilo značajne aktivnosti
SMm Ukupni skor - medijan (raspon) - P	3 vs 0 0(0-1)/0(0-0) 0,053	3 vs 0 0(0-1) 0,083
SMp Ukupni skor - medijan (raspon) - P	Nije bilo značajne aktivnosti	Nije bilo značajne aktivnosti

**Grafikon 1.**



**Grafikon 2.**





#### 4.2.1.2. Izraženost TGF $\beta$ u kontrolnoj grupi bez eksperimentalnog kolitisa u usporedbi s grupom sa netretiranim eksperimentalnim kolitisom

Izraženost TGF $\beta$  na promatranim vrstama stanica u epitelnom odjeljku, lamini propriji i submukozi sluznice životinja u skupini s eksperimentalnim kolitisom i u skupini zdravih životinja prikazana je u tablici 6 i grafikonima 3 i 4.

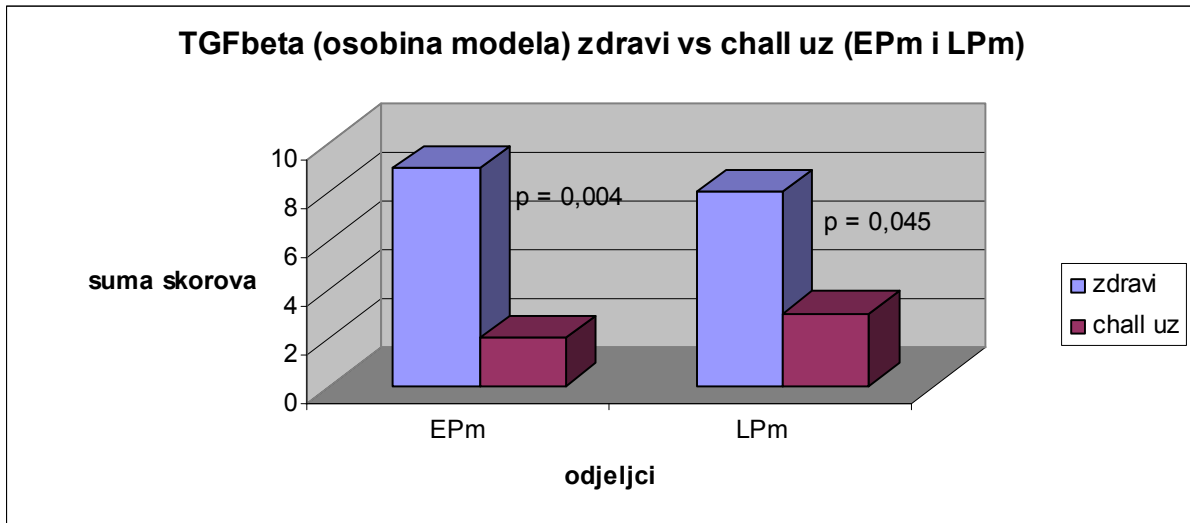
Izraženost TGF $\beta$  zabilježena je kao najveća u sluznici skupine zdravih životinja: na epitelu (EPe) i mononuklearnim stanicama u epitelnom odjeljku (EPm: chall-uz vs. zdravi,  $p=0.004$  / chall-od vs. zdravi:  $p=0.008$ ) (Grafikon 3) te mononuklearnim stanicama lamine proprije (LPm: chall-uz vs. zdravi,  $p=0.045$  / chall-od vs. zdravi,  $p=0.028$ ) i submukoze (SMm) (Grafikon 4). U skupini chall, izraženost TGF $\beta$  nije se razlikovala u sluznici uz izazvanu crijevnu leziju i u sluznici udaljeno od izazvane crijevne lezije.

U obje promatrane skupine (chall i zdravi), nije zabilježena izraženost TGF $\beta$  na polimorfonuklearnim stanicama (p) niti u jednom promatranom odjeljku sluznice (EP / LP / SM).

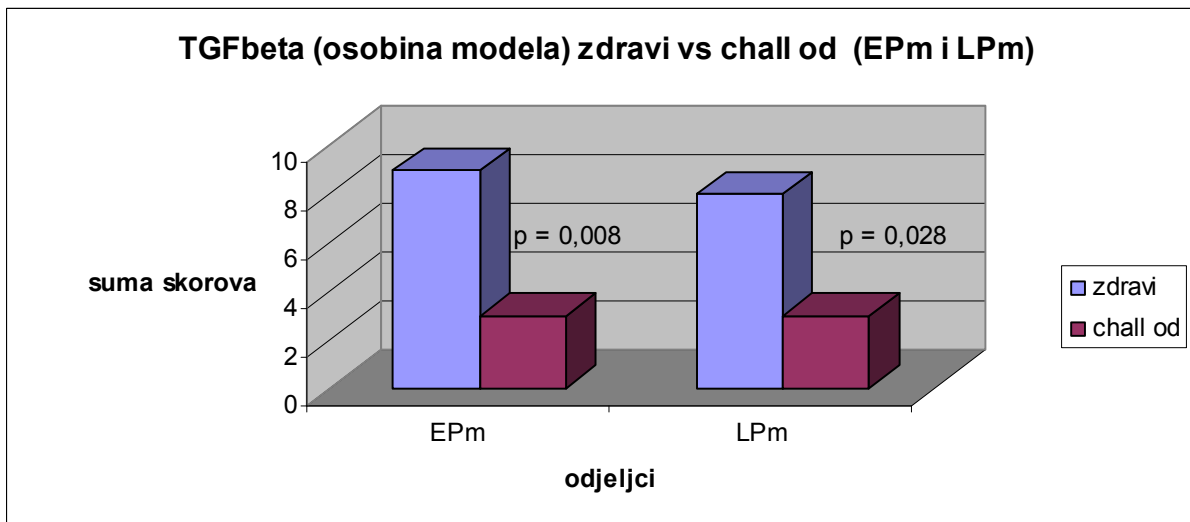
**Tablica 6.** Izraženost TGF $\beta$  u sluznici životinja s eksperimentalnim kolitisom (chall) i sluznici zdravih životinja

Skupina / Odjeljak	Chal-uz vs. Zdravi	Chall-od vs. Zdravi-od ,
EPe Ukupni skor - medijan (raspon) - P	10 vs 10 1(0-2)/1(1-1) 0,520	10 vs 10 1(0-2)/1(1-1) 1
EPm Ukupni skor - medijan (raspon) - P	2 vs <b>9</b> 0(0-1)/1((0-1) <b>p = 0,004</b>	3 vs <b>9</b> 0(0-1)/1((0-1) <b>p = 0,008</b>
EPp Ukupni skor - medijan (raspon) - P	Nije bilo značajne aktivnosti	Nije bilo značajne aktivnosti
LPm Ukupni skor - medijan (raspon) - P	3 vs <b>8</b> 0(0-1)/1((0-1) <b>p = 0,045</b>	3 vs <b>8</b> 0(0-1)/1((0-1) <b>p = 0,028</b>
LPp Ukupni skor - medijan (raspon) - P	Nije bilo značajne aktivnosti	Nije bilo značajne aktivnosti
SMm Ukupni skor - medijan (raspon) - P	0 vs 2 0(0-0)/0(0-1) 0,167	0 vs 2 0(0-0)/0(0-1) 0,146
SMP Ukupni skor - medijan (raspon) - P	Nije bilo značajne aktivnosti	Nije bilo značajne aktivnosti

**Grafikon 3.**



**Grafikon 4.**



#### 4.2.1.3. Izraženost TLR4 u kontrolnoj grupi bez eksperimentalnog kolitisa u usporedbi s grupom sa netretiranim eksperimentalnim kolitisom

Izraženost TLR4 na promatranim vrstama stanica u epitelnom odjeljku, lamini propriji i submukozi sluznice životinja u skupini s eksperimentalnim kolitisom i u skupini zdravih životinja prikazana je u tablici 7 i grafikonima 5 i 6.

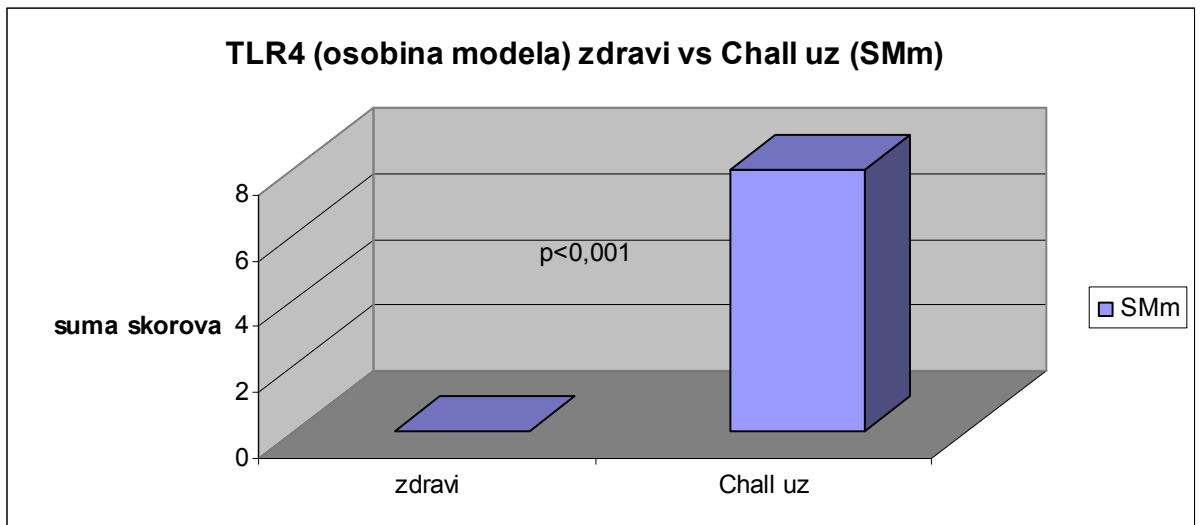
U obje promatrane skupine životinja (chall-uz / chall-od / zdravi) izraženost TLR4 je zabilježena na epitelnim stanicama (EPe) te mononuklearnim stanicama epitelnog odjeljka (EPm) i lamine proprije (LPm)) i navedene izraženosti nisu se međusobno razlikovale. U obje promatrane skupine (chall-uz / chall-od / zdravi) izraženost TLR4 nije zabilježena na polimorfonuklearnim stanicama niti u jednom odjeljku sluznice.

Na mononuklearnim stanicama submukoze (SMm) sluznice uz izazvanu crijevnu leziju u skupini chall zabilježena je značajna izraženost TLR4 (Slika 5), u odnosu na sluznicu udaljeno od izazvane lezije u skupini chall (SMm,  $p=0.005$ ) (Grafikon 5) i u odnosu na sluznicu zdravih životinja (SMm,  $p=0.001$ ) (Grafikon 6).

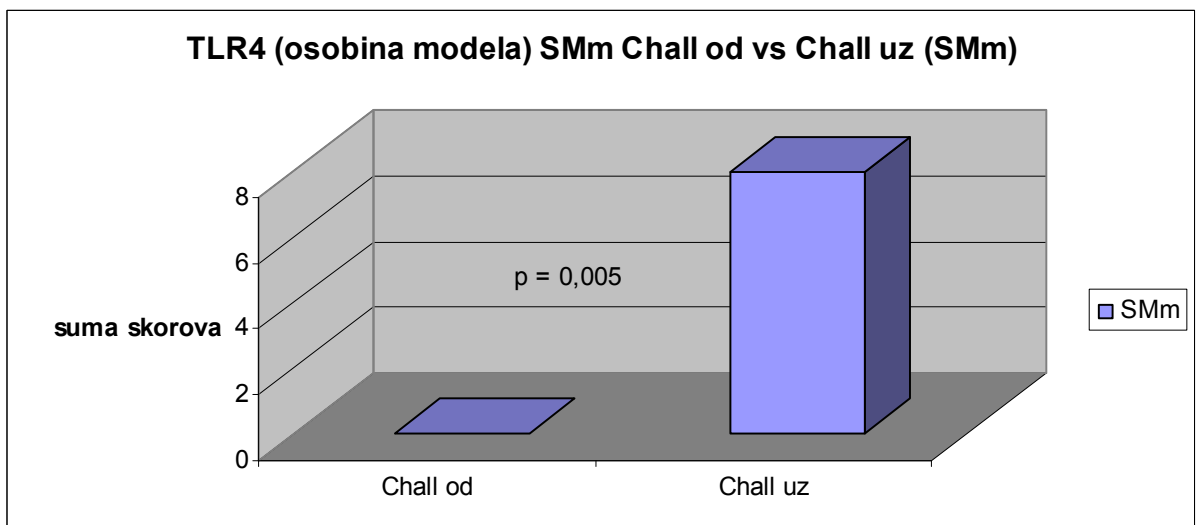
**Tablica 7.** Izraženost TLR4 u sluznici životinja s eksperimentalnim kolitisom (chall) i sluznici zdravih životinja

Skupina / Odjeljak	Chal-uz vs. Zdravi	Chall-uz vs. Chall-od ,
EPe Ukupni skor	2 vs 2	2 vs 3
- medijan (raspon)	0 (0-1)/0(0-1)	0(0-1)
- P	0,908	0,655
EPm Ukupni skor	9 vs 8	9 vs 10
- medijan (raspon)	1(1-1)/1 (0-1)	1(1-1)
- P	0,167	1
EPp Ukupni skor	Nije bilo značajne aktivnosti	Nije bilo značajne aktivnosti
- medijan (raspon)		
- P		
LPm Ukupni skor	10 vs 11	10 vs 10
- medijan (raspon)	1(1-2)//1(1-2)	1(1-2)
- P	0,968	0,317
LPp Ukupni skor	Nije bilo značajne aktivnosti	Nije bilo značajne aktivnosti
- medijan (raspon)		
- P		
SMm Ukupni skor	<b>8 vs 0</b>	<b>8 vs 0</b>
- medijan (raspon)	1(0-1)/0(0-0)	0(0-0)
- P	<b>p&lt;0,001</b>	<b>p = 0,005</b>
SMp Ukupni skor	Nije bilo značajne aktivnosti	Nije bilo značajne aktivnosti
- medijan (raspon)		
- P		

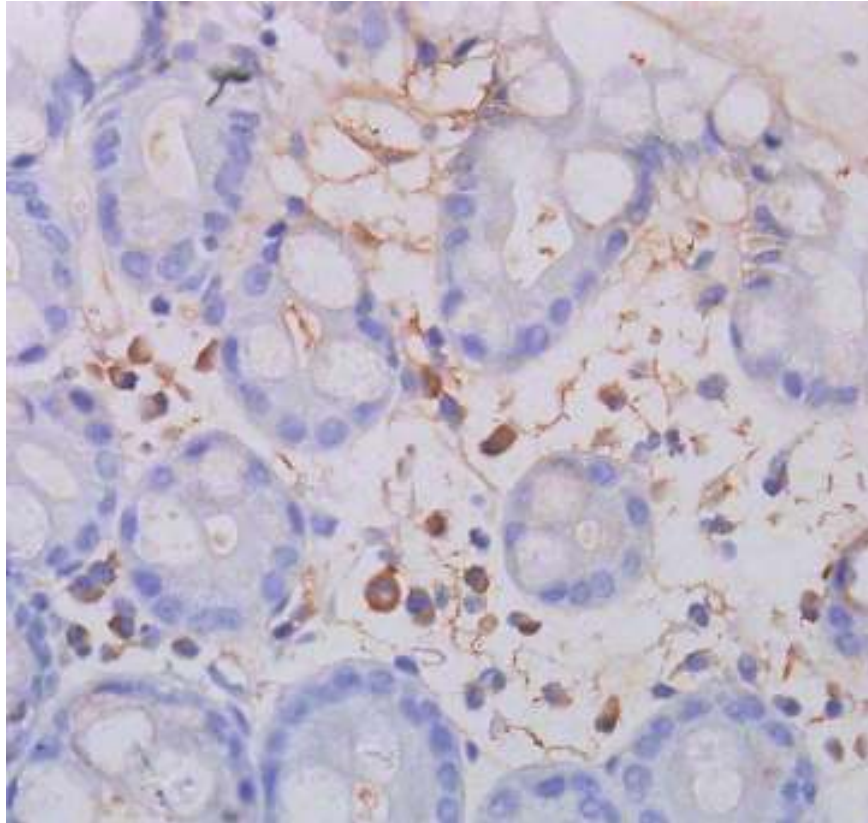
**Grafikon 5.**



**Grafikon 6.**



**Slika 5.** TLR4 u sluznici miševa s netretiranim eksperimentalnim kolitisom



**4.2.2. Izraženost TLR4, TNF $\alpha$  i TGF $\beta$  u grupi sa netretiranim  
eksperimentalnim kolitisom u usporedbi sa skupinama s  
eksperimentalnim kolitisom tretiranih s azitromicinom ili metronidazolom  
ili metilprednizolonom - UČINAK TERAPIJE**

4.2.2.1. Izraženost TNF $\alpha$  u grupi sa netretiranim eksperimentalnim kolitisom u usporedbi sa skupinama s eksperimentalnim kolitisom tretiranih s azitromicinom ili metronidazolom ili metilprednizolonom

Učinak terapije na izraženost TNF $\alpha$ , na promatranim vrstama stanica u epitelnom odjeljku, lamini propriji i submukozi sluznice uz izazvanu crijevnu leziju životinja u skupini s eksperimentalnim kolitisom (chall) i skupinama koje su nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa tretirane metilprednizolonom (MP), azitromicinom (AZ) i metronidazolom (MN) prikazana je u tablici 8 i grafikona 7 i 8.

Učinak terapije u navedenim skupinama zabilježen je u razlikama izraženosti TNF $\alpha$  (Kruskal-Wallis) na epitelnim stanicama (EPe,  $p=0.015$ ) i mononuklearnim stanicama (EPm,  $p=0.043$ ) epitelnog odjeljka te mononuklearnim stanicama submukoze sluznice (SMm,  $p=0.05$ ) Post-hoc analiza na razini  $p < 0.05$  dokumentirala je značajno veću izraženost TNF $\alpha$  na mononuklearnim stanicama epitelnog odjeljka (EPm) u sluznici uz izazvanu crijevnu leziju u skupini chall, u odnosu na sluznicu uz izazvanu crijevnu leziju životinja tretiranih metilprednizolonom (MP) i azitromicinom (AZ). Izraženost TNF $\alpha$  na mononuklearnim stanicama epitelnog odjeljka (EPm) u sluznici uz izazvanu crijevnu leziju životinja koje su tretirane metronidazolom (MN) nije se značajno razlikovala od izraženosti u sluznici uz izazvanu crijevnu leziju životinja a eksperimentalnim kolitisom koje nisu tretirane

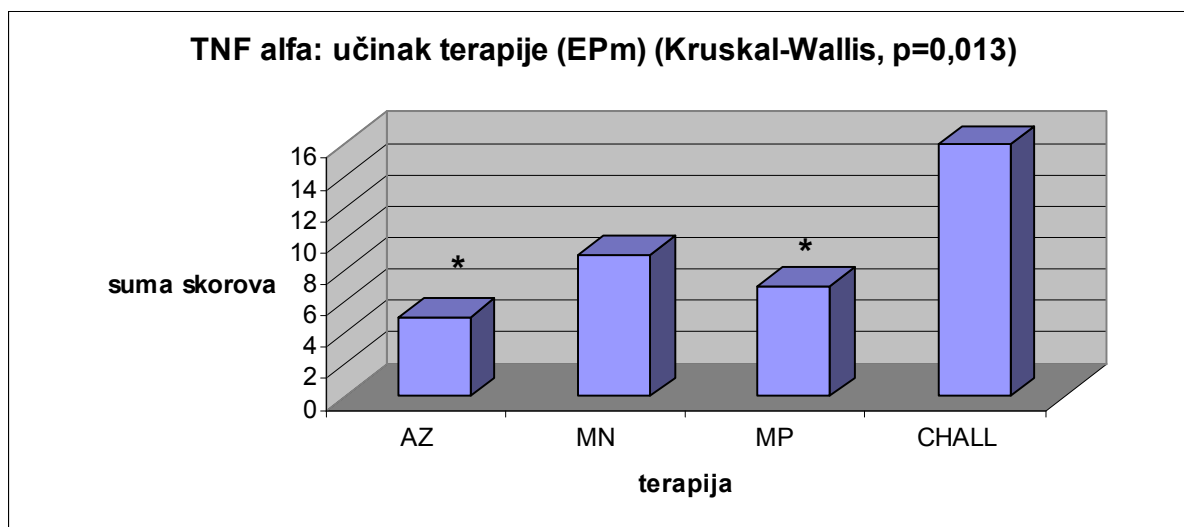


(chall). Najveća izraženost TNF $\alpha$  na mononuklearnim stanicama submukoze sluznice (SMm) uz izazvanu crijevnu leziju zabilježena je u skupini životinja s eksperimentalnim kolitisom koje su tretirane metronidazolom (MN) (MN vs. chall,  $p < 0.05$  / MN vs. MP,  $p < 0.05$ ) (Grafikon 7 i 8).

**Tablica 8.** Izraženost TNF $\alpha$  u sluznici životinja s eksperimentalnim kolitisom (chall) i sluznici životinja s eksperimentalnim kolitisom koje su tretirane metilprednizolonom (MP), azitromicinom (AZ) i metronidazolom (MN)

Skupina / Odjeljak	Chall	MP	AZ	MN	P(Kruskal-Wallis)
EPe - Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	4 0 (0-1) Nema međusobne razlike	0 0(0-0) Nema međusobne razlike	0 0(0-0) Nema međusobne razlike	0 0(0-0) Nema međusobne razlike	0,015
EPm Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	16 2 (1-3) vs. <b>AZ / MP</b>	7 1(1-1) vs. <b>Chall</b>	5 1(0-1) <b>Chall</b>	9 1(1-2) NS	<b>0,013</b>
EPp Ukupni skor - medijan (raspon) -	3 0(0-1)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0,057
LPm Ukupni skor - medijan (raspon) -	11 1(1-2)	7 1(1-1)	6 1(1-1)	8 1(1-1)	0,184
LPp Ukupni skor - medijan (raspon) -	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	Nije bilo značajne aktivnosti
SMm Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	3 0(0-1) <b>MN</b>	1 0(0-1) <b>MN</b>	3 0,5(0-1)	9 1(0-2) <b>MP i Chall</b>	<b>0,05</b>
SMp Ukupni skor - medijan (raspon) -	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	Nije bilo značajne aktivnosti

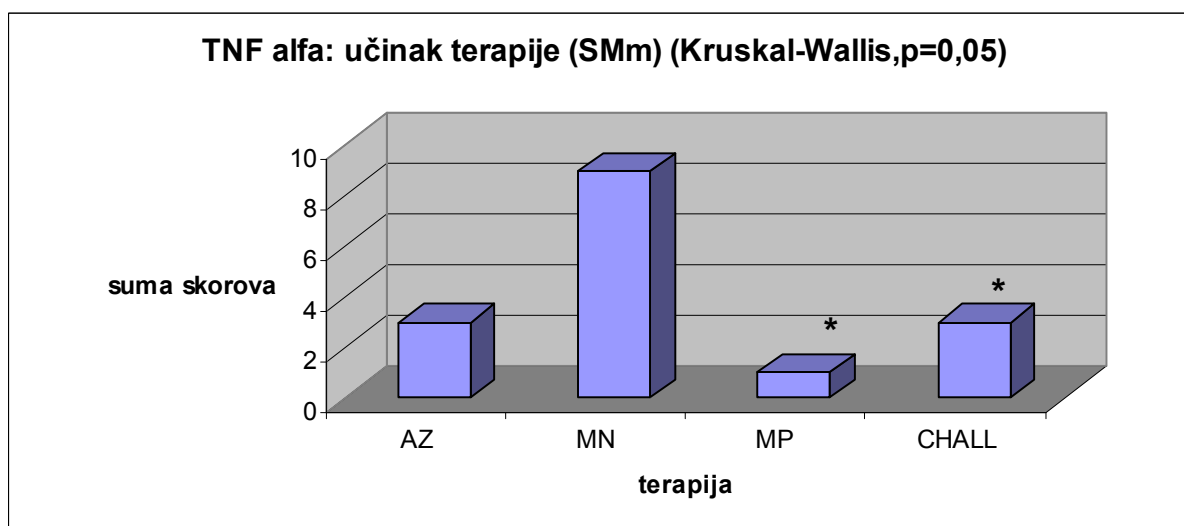
**Grafikon 7.**



\* vs CHALL, post-hoc analiza  $p < 0.05$

AZ vs MP =NS

**Grafikon 8**



\* vs MN, post-hoc analiza  $p < 0.05$

4.2.2.2. Izraženost TGF $\beta$  u grupi sa netretiranim eksperimentalnim kolitisom u usporedbi sa skupinama s eksperimentalnim kolitisom tretiranih s azitromicinom ili metronidazolom ili metilprednizolonom

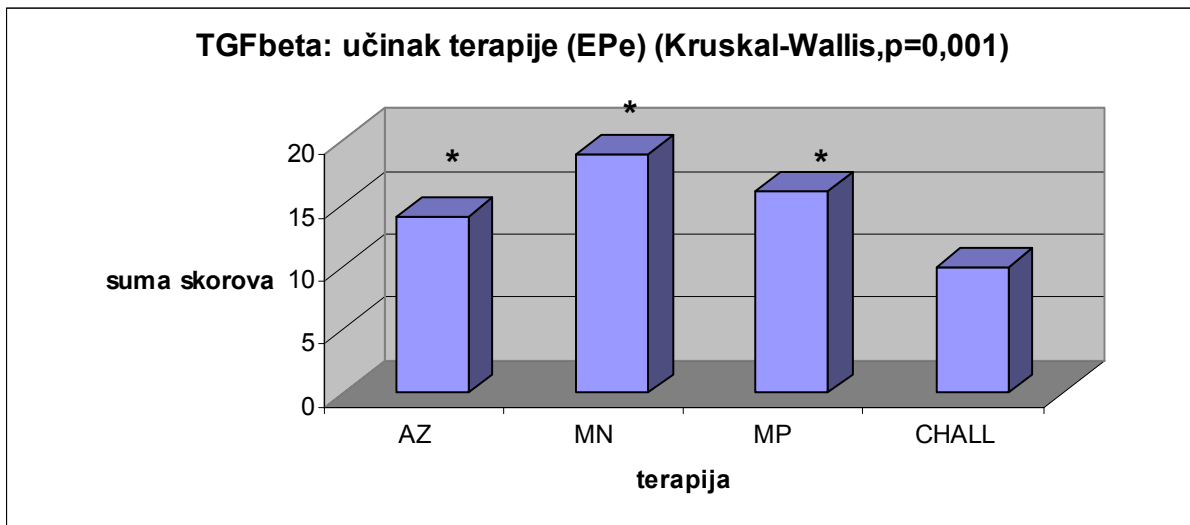
Učinak terapije na izraženost TGF $\beta$ , na promatranim vrstama stanica u epitelnom odjeljku, lamini propriji i submukozi sluznice uz izazvanu crijevnu leziju životinja u skupini s eksperimentalnim kolitisom (chall) i skupinama koje su nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa tretirane metilprednizolonom (MP), azitromicinom (AZ) i metronidazolom (MN) prikazana je u tablici 9 i grafikonima 9 i 10 i 11.

Učinak terapije u navedenim skupinama zabilježen je u razlikama izraženosti TGF $\beta$  (Kruskal-Wallis) na epitelnim stanicama (EPe,  $p=0.001$ ) te mononuklearnim stanicama epitelnog odjeljka (EPm,  $p<0.001$ ) i lamine proprije sluznice (LPm,  $p=0.004$ ). ). Post-hoc analiza na razini  $p < 0.05$  dokumentirala je značajno veću izraženost TGF $\beta$  na epitelnim (EPe) i mononuklearnim stanicama (EPm) epitelnog odjeljka i mononuklearnim stanicama lamine proprije (LPm) u skupinama tretiranih životinja (MP / AZ / MN) u odnosu na izraženost TGF $\beta$  na istim stanicama sluznice životinja s eksperimentalnim kolitisom koje nisu tretirane (chall) (grafikon 9, 10 i 11).

**Tablica 9.** Izraženost TGF $\beta$  u sluznici životinja s eksperimentalnim kolitisom (chall) i sluznici životinja s eksperimentalnim kolitisom koje su tretirane metilprednizolonom (MP), azitromicinom (AZ) i metronidazolom (MN)

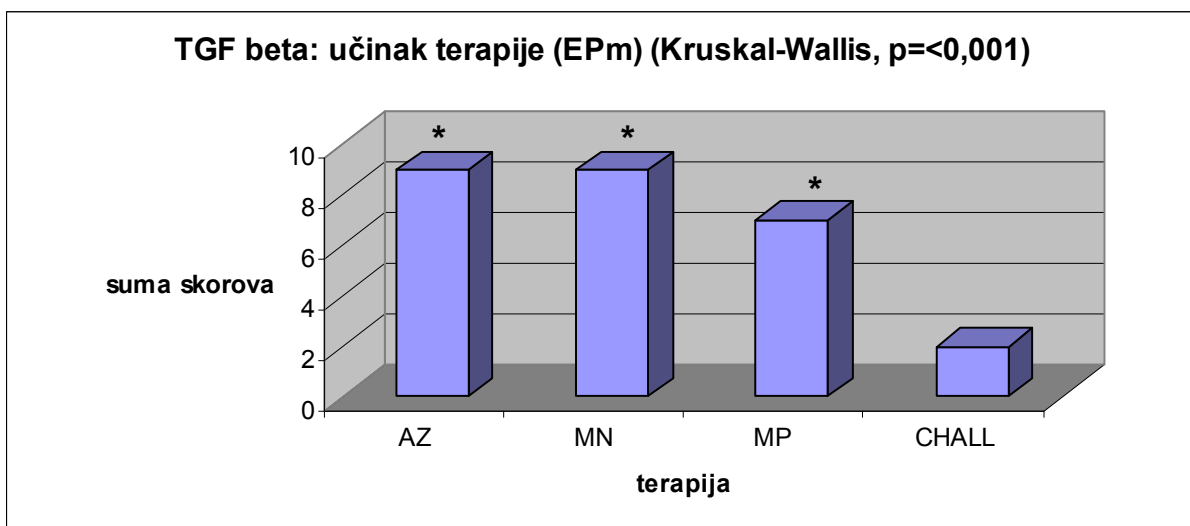
<b>Skupina / Odjeljak</b>	<b>Chall</b>	<b>MP</b>	<b>AZ</b>	<b>MN</b>	<b>P(Kruskal-Wallis)</b>
EPe - Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	10 1(0-2) vs. <b>AZ, MN, MP</b>	16 2(2-3) vs. <b>chall</b>	14 2(2-3) vs. <b>chall</b>	19 2(2-3) vs. <b>chall</b>	<b>0,001</b>
EPm Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	2 0(0-1) vs. <b>AZ, MN, MP</b>	7 1(1-1) vs. <b>chall</b>	9 1,5(1-2) vs. <b>chall</b>	9 1(1-2) vs. <b>chall</b>	<b>&lt;0,001</b>
EPp Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	2 0(0-1)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0,184
LPm Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	3 0(0-1) vs. <b>AZ, MN, MP</b>	7 1(1-1) vs. <b>chall</b>	6 1(1-1) vs. <b>chall</b>	7 1(1-1) vs. <b>chall</b>	<b>0,004</b>
LPp Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	0 0(0-0)	0 0(0-0)	1 0(0-1)	0 0(0-1)	0,261
SMm Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	0 0(0-0)	0 0(0-0)	1 0(0-1)	2 0(0-1)	0,268
SMp Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	Nije bilo značajne aktivnosti

**Grafikon 9**



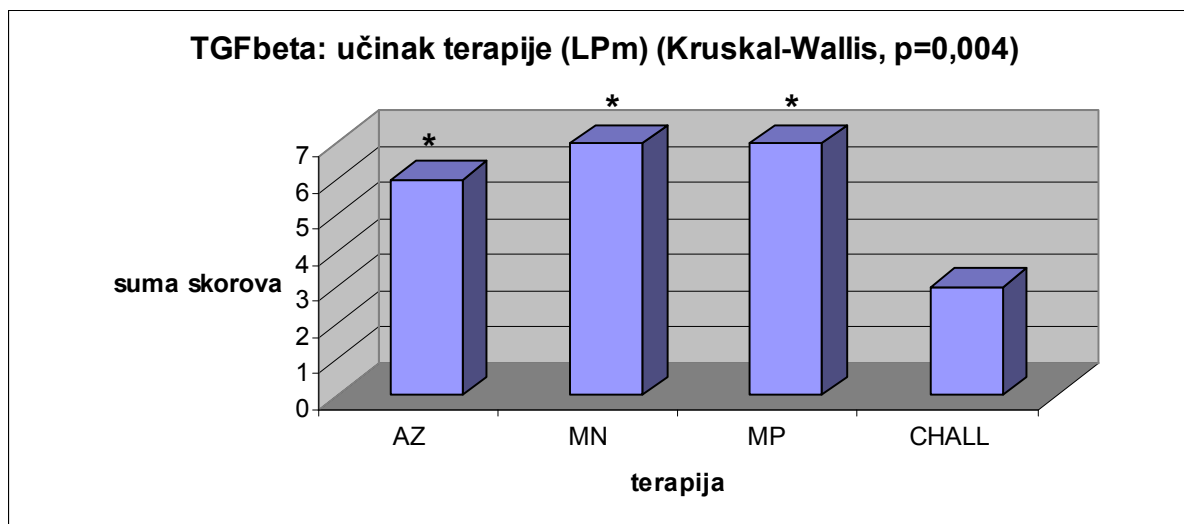
\* vs CHALL, post-hoc analiza  $p < 0.05$

**Grafikon 10.**



\* vs CHALL, post-hoc analiza  $p < 0.05$

**Grafikon 11.**



\* vs CHALL, post-hoc analiza  $p < 0.05$

#### 4.2.2.3. Izraženost TLR4 u grupi sa netretiranim eksperimentalnim kolitisom u usporedbi sa skupinama s eksperimentalnim kolitisom tretiranih s azitromicinom ili metronidazolom ili metilprednizolonom

Učinak terapije na izraženost TLR4, na promatranim vrstama stanica u epitelnom odjeljku, lamini propriji i submukozi sluznice uz izazvanu crijevnu leziju životinja, u skupini s eksperimentalnim kolitisom (chall) i skupinama koje su nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa tretirane metilprednizolonom (MP), azitromicinom (AZ) i metronidazolom (MN) prikazan je u tablici 10.

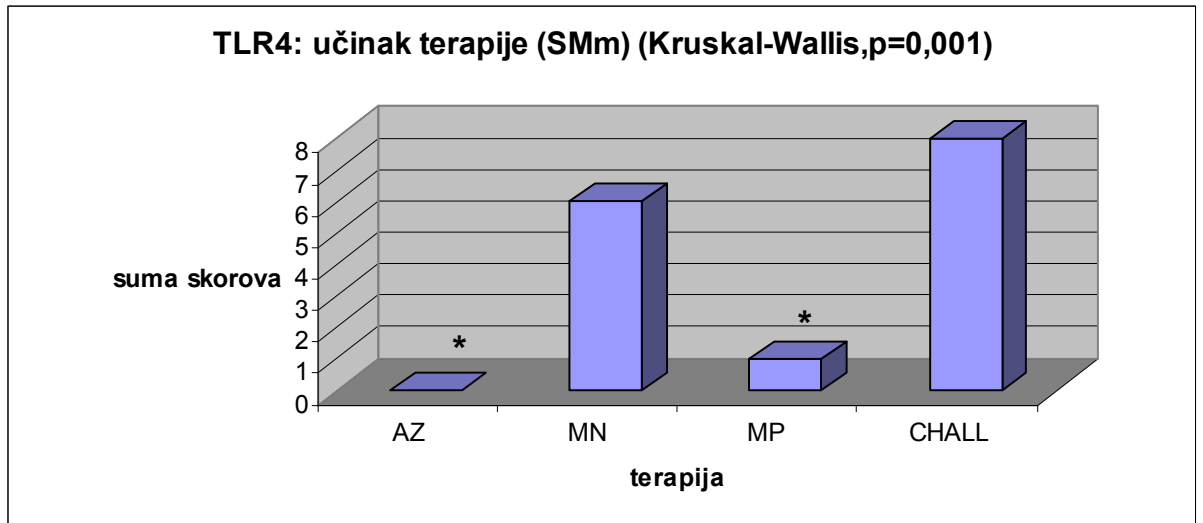
Učinak terapije u navedenim skupinama zabilježen je samo u razlikama izraženosti TLR4 (Kruskal-Wallis) na mononuklearnim stanicama submukoze (SMm,  $p=0.001$ ). Post-hoc analiza na razini  $p < 0.05$  dokumentirala je značajno manju izraženost TLR4 na mononuklearnim stanicama submukoze (SMm) u skupini MP i AZ, u odnosu na izraženost TLR4 na istim stanicama u submukozi skupine chall. Također, zabilježena je manja izraženost TLR4 na mononuklearnim stanicama submukoze (SMm) u skupinama AZ i MP u odnosu na iste stanice iz submukoze skupine MN. Izraženost TLR4 na mononuklearnim stanicama submukoze (SMm) u skupini MN nije se razlikovala od izraženosti TLR4 na istim stanicama u submukozi skupine chall.



**Tablica 10.** Izraženost TLR4 u sluznici životinja s eksperimentalnim kolitisom (chall) i sluznici životinja s eksperimentalnim kolitisom koje su tretirane metilprednizolonom (MP), azitromicinom (AZ) i metronidazolom (MN)

Skupina / Odjeljak	Chall	MP	AZ	MN	P(Kruskal-Wallis)
EPe - Ukupni skor - medijan (raspon)	2 0(0-1)	2 0(0-1)	1 0(0-1)	3 0(0-1)	0,814
EPm Ukupni skor - medijan (raspon)	9 1(1-1)	6 1(1-1)	6 1(1-1)	8 1(1-1)	1
EPp Ukupni skor - medijan (raspon)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	Nije bilo značajne aktivnosti
LPm Ukupni skor - medijan (raspon)	10 1(1-2)	6 1(1-1)	7 1(1-2)	9 1(1-2)	0,81
LPp Ukupni skor - medijan (raspon)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	Nije bilo značajne aktivnosti
SMm Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	8 1(0-1) vs. <b>AZ i MP</b>	1 0(0-1) vs. <b>MN i chall</b>	0 0(0-0) vs. <b>MN i chall</b>	6 1(0-1) vs. <b>AZ i MP</b>	<b>0,001</b>
SMp Ukupni skor - medijan (raspon)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	1 0(0-1)	0,453

**Grafikon 12.**



\* vs MN i vs CHALL, post-hoc analiza  $p<0.05$

AZ vs MP = NS

MN vs CHALL = NS

### **4.2.3. Razlika u izraženost TLR4, TNF $\alpha$ i TGF $\beta$ u skupinama s eksperimentalnim kolitisom tretiranih s azitromicinom ili metronidazolom ili metilprednizolonom - RAZLIKA UČINKA TERAPIJE**

#### 4.2.3.1. Razlika u izraženost TNF $\alpha$ u skupinama s eksperimentalnim kolitisom tretiranih s azitromicinom ili metronidazolom ili metilprednizolonom

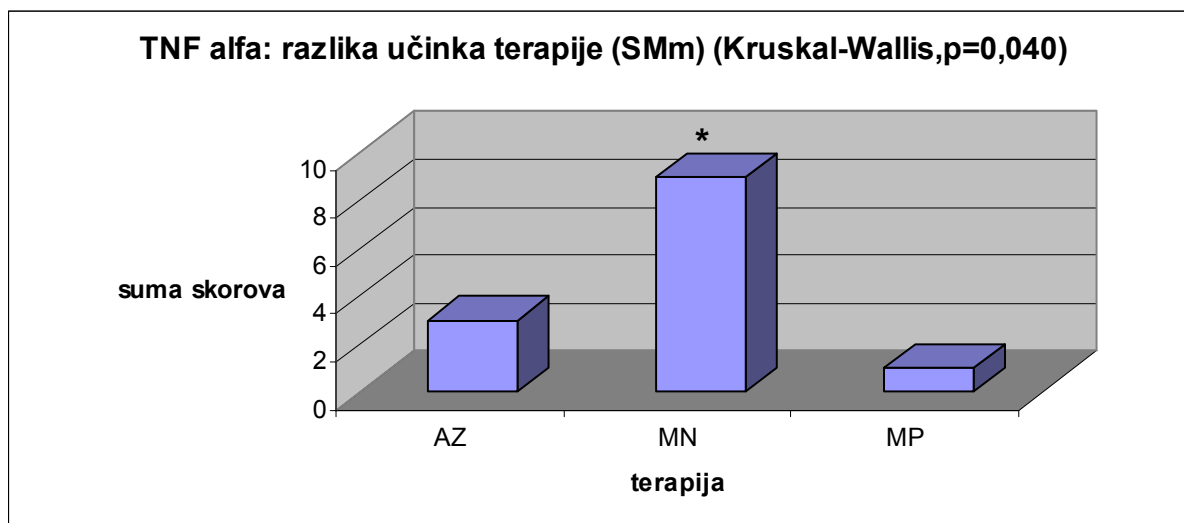
Razlika učinka terapije na izraženost TNF $\alpha$ , na promatranim vrstama stanica u epitelnom odjeljku, lamini propriji i submukozi sluznice uz izazvanu crijevnu leziju životinja, u skupini s eksperimentalnim kolitisom koje su nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa tretirane metilprednizolonom (MP), azitromicinom (AZ) i metronidazolom (MN) prikazan je u tablici 11 i grafikonu 13.

Razlika učinka terapije u navedenim skupinama zabilježena je samo u razlikama izraženosti TNF $\alpha$  (Kruskal-Wallis) na mononuklearnim stanicama submukoze (SMm,  $p=0.040$ ). Post-hoc analiza na razini  $p < 0.05$  dokumentirala je značajno manju izraženost TNF $\alpha$  na mononuklearnim stanicama submukoze (SMm) u skupini MP, u odnosu na izraženost TNF $\alpha$  na istim stanicama u submukozi skupine MN (grafikon 13). U učinku terapije na izraženost TNF $\alpha$  na mononuklearnim stanicama submukoze (SMm) nije zabilježena razlika između skupine MP i AZ.

**Tablica 11.** Razlika izraženosti TNF $\alpha$  u skupini s eksperimentalnim kolitisom koje su tretirane metilprednizolonom (MP), azitromicinom (AZ) i metronidazolom (MN)

Skupina / Odjeljak	MP	AZ	MN	P(Kruskal-Wallis)
EPe - Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	Nije bilo značajne aktivnosti
EPm Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	7 1(1-1)	5 1(0-1)	9 1(1-2)	0,233
EPp Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	Nije bilo značajne aktivnosti
LPm Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	7 1(1-1)	6 1(1-1)	8 1(1-1)	1
LPp Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	Nije bilo značajne aktivnosti
SMm Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	1 0(0-1) <b>MN</b>	3 0,5(0-1)	9 1(0-2) <b>MP</b>	<b>0,040</b>
SMp Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	Nije bilo značajne aktivnosti

**Grafikon 13.**



\* vs MP, post-hoc analiza  $p<0.05$

AZ vs MP =NS

#### 4.2.3.2. Razlika u izraženost TGF $\beta$ u skupinama s eksperimentalnim kolitisom tretiranih s azitromicinom ili metronidazolom ili metilprednizolonom

Razlika učinka terapije na izraženost TGF $\beta$ , na promatranim vrstama stanica u epitelnom odjeljku, lamini propriji i submukozi sluznice uz izazvanu crijevnu leziju životinja, u skupini s eksperimentalnim kolitisom koje su nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa tretirane metilprednizolonom (MP), azitromicinom (AZ) i metronidazolom (MN) prikazan je u tablici 12.

Uporabom Kruskal-Wallis testa i post-hoc analize nije zabilježena razlika učinka terapije u promatranim odjeljcima sluznice između skupina MP, AZ i MN.

**Tablica 12.** Razlika izraženosti TGF $\beta$  u skupini s eksperimentalnim kolitisom koje su tretirane metilprednizolonom (MP), azitromicinom (AZ) i metronidazolom (MN)

<b>Skupina / Odjeljak</b>	<b>MP</b>	<b>AZ</b>	<b>MN</b>	<b>P(Kruskal-Wallis)</b>
EPe - Ukupni skor - medijan (raspon)	16 2(2-3)	14 2(2-3)	19 2(2-3)	0,938
EPm Ukupni skor - medijan (raspon)	7 1(1-1)	9 1,5(1-2)	9 1(1-2)	0,70
EPp Ukupni skor - medijan (raspon)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	Nije bilo značajne aktivnosti
LPm Ukupni skor - medijan (raspon)	7 1(1-1)	6 1(1-1)	7 1(1-1)	0,444
LPp Ukupni skor - medijan (raspon)	0 0(0-0)	1 0(0-1)	0 0(0-1)	0,287
SMm Ukupni skor - medijan (raspon)	0 0(0-0)	1 0(0-1)	2 0(0-1)	0,369
SMp Ukupni skor - medijan (raspon)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	Nije bilo značajne aktivnosti

#### 4.2.3.3. Razlika u izraženost TLR4u skupinama s eksperimentalnim kolitisom tretiranih s azitromicinom ili metronidazolom ili metilprednizolonom

Razlika učinka terapije na izraženost TLR4, na promatranim vrstama stanica u epitelnom odjeljku, lamini propriji i submukozi sluznice uz izazvanu crijevnu leziju životinja, u skupini s eksperimentalnim kolitisom koje su nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa tretirane metilprednizolonom (MP), azitromicinom (AZ) i metronidazolom (MN) prikazan je u tablici 13 i grafikonu 14.

Razlika učinka terapije u navedenim skupinama zabilježena je samo u razlikama izraženosti TLR4 (Kruskal-Wallis) na mononuklearnim stanicama submukoze (SMm,  $p=0.010$ ). Post-hoc analiza na razini  $p < 0.05$  dokumentirala je značajno manju izraženost TLR4 na mononuklearnim stanicama submukoze (SMm) u skupini MP i AZ, u odnosu na izraženost TLR4 na istim stanicama u submukozi skupine MN (Grafikon 14). U učinku terapije na izraženost TLR4 na mononuklearnim stanicama submukoze (SMm) nije zabilježena razlika između skupine MP i AZ.

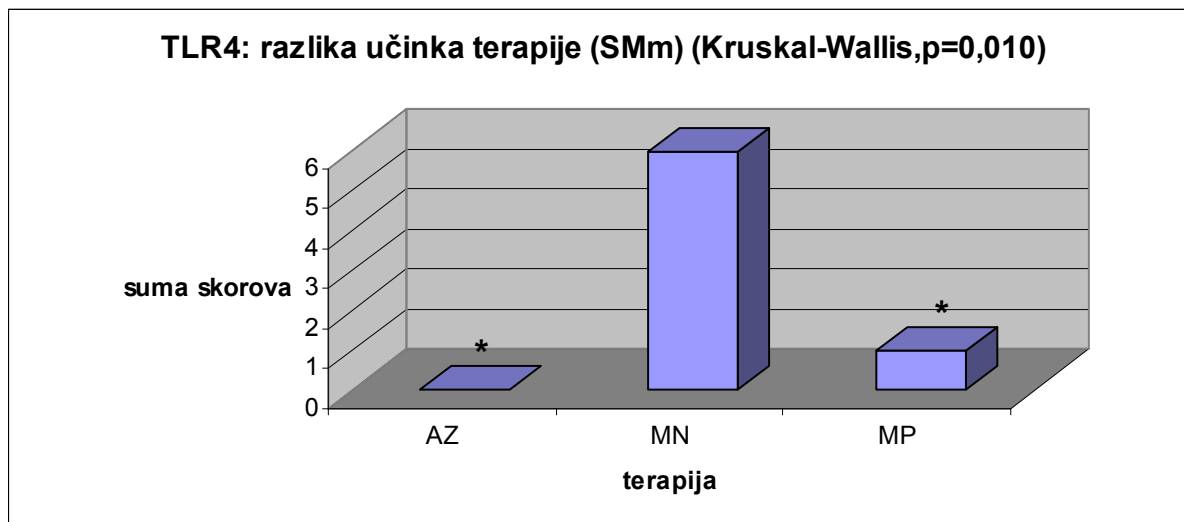


**Tablica 13.** Razlika izraženosti TLR4 u skupini s eksperimentalnim kolitisom koje su tretirane metilprednizolonom (MP), azitromicinom (AZ) i metronidazolom (MN)

**TLR4**

<b>Skupina / Odjeljak</b>	<b>MP</b>	<b>AZ</b>	<b>MN</b>	<b>P(Kruskal-Wallis)</b>
EPe - Ukupni skor - medijan (raspon)	2 0(0-1)	1 0(0-1)	3 0(0-1)	0,699
EPm Ukupni skor - medijan (raspon)	6 1(1-1)	6 1(1-1)	8 1(1-1)	1
EPp Ukupni skor - medijan (raspon)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	Nije bilo značajne aktivnosti
LPm Ukupni skor - medijan (raspon)	6 1(1-1)	7 1(1-2)	9 1(1-2)	0,616
LPp Ukupni skor - medijan (raspon)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	Nije bilo značajne aktivnosti
SMm Ukupni skor - medijan (raspon) - p<0.05	1 0(0-1) vs. <b>MN</b>	0 0(0-0) vs. <b>MN</b>	6 1(0-1) vs. <b>AZ i MP</b>	<b>0,010</b>
SMp Ukupni skor - medijan (raspon)	0 0(0-0)	0 0(0-0)	1 0(0-1)	0,472

**Grafikon 14.**



\* vs MN, post-hoc analiza  $p < 0.05$

AZ vs MP =NS



Imunološki sustav crijevne sluznice predstavlja najveći imunološki odjeljak u ljudskom tijelu koji ima ulogu održavanja imunološke i protuupalne homeostaze crijevne sluznice. Sustav ima zadaću obrane od patogenih mikroorganizama i toksičnih antigena koji mogu proći epitelnu barijeru i izazvati oštećenje, uz istovremenu ulogu održavanja tolerancije prema mnoštvu komenzalnih mikroorganizama i prehrambenih antigena prisutnih u crijevu domaćina. Tako imunološki sustav pridružen crijevu ima važnu ulogu u održavanju homeostaze između stranih i vlastitih antigena, uključivši i vlastitu crijevnu floru, čuvajući ravnotežu unutarnjeg okoliša organizma na vrlo specifičan način (1).

U etiopatogenezi upalne bolesti crijeva su prepoznati genetski činitelji i činitelji okoliša. Pravi uzrok upalnih bolesti crijeva nije do kraja poznat no pretpostavka je da je bolest posljedica agresivnog stečenog imunološkog odgovora na mnoštvo bakterijskih antigena normalne flore, u genetski osjetljivog domaćina (80). Nedovoljno razjašnjena etiologija i patogeneza upalnih bolesti crijeva nametnula je potrebu za eksperimentalnim traženjem odgovora na znanstvena i praktična pitanja (109). Navedena činjenica ima za posljedicu pokuse iz kojih su nastali brojni eksperimentalni modeli za istraživanje crijevne upale. Na taj su način dobivene važne spoznaje o funkciji imunološkog sustava pridruženog crijevu koji je jedinstven i osobit (103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111). Eksperimentalni modeli nadopunjuju i proširuju klinička istraživanja upalnih bolesti crijeva jer omogućuju ispitivanje i procjenu pojedinih sastavnica crijevne upale i razvoj novih terapijskih mogućnosti na način koji nije moguć u ljudi. Različitim se modelima mogu proučavati rane faze crijevne upale te uloga genetske predispozicije, bakterijskog mikrokoliša i stečene imunološke reakcije, a kasnije faze upale koje karakteriziraju nespecifični

upalni infiltrati, različiti citokini te procesi cijeljenja mogu biti bolje istraživani u drugim pokusnim modelima (113, 114)

U objavljenim je istraživanjima opisan čitav niz načina na koji je pokušana indukcija crijevne upale u pokusnim životinjama. S druge strane, u literaturi se mogu naći i različiti načini podjele eksperimentalnih modela u različite skupine, zavisno o načinu indukcije upale, obrascu imunološkog odgovora i načinu sloma tolerancije na antigene mikroflora (115).

Opažanja u pokusima na modelima crijevne upale bilježe da je prisutnost normalne mikroflora neophodna za nastanak crijevne upale u miševa u kojih postoji sklonost razvoju bolesti (115,116). Rezultati tih istraživanja govore da crijevna upala bez obzira na genetičku pozadinu nastaje kao rezultat neodgovarajućeg odgovora na već prisutne antigene mikroflora, a ne na neki patogen. Tako hipoteza o potrazi za specifičnim patogenom gubi na snazi, tim više što rezultati objavljenih istraživanja ukazuju na bakterijski flagelin kao na jedan od potencijalnih patogenetskih činitelja u upalnim bolestima crijeva. Nije posve jasno da li flagelin ima ulogu liganda za TLR ili djeluje kao antigen (105).

Domaća grupa autora razvila je model koji je korišten u ovom istraživanju, a koji predstavlja model upalne bolesti crijeva iz skupine modela u kojima je crijevna upala izazvana kemijskim tvarima. Kemijska tvar - 2,4 – dinitrofluorobenzen (DNFB) ima djelovanje poput haptena koja se kovalentno veže na aminoskupine bjelančevina i na taj način mijenja njihovu konformaciju odnosno imunogeničnost, a to pobuđuje imunološku reakciju posredovanu T-limfocitima, specifičnim za promijenjeni vlastiti antigen. Opisani model je također obilježen akutnim upalnim promjenama debelog crijeva miševa kao što su ulkusi i nekroze, edem, infiltracija polimorfonuklearnim leukocitima i krvarenje. Jedna od vrlo važnih karakteristika korištenog modela je

prethodni kontakt sa stanicama koje predočuju antigen, što je posljedica kožne senzibilizacije, a to pojačava specifičnu reakciju limfatičkog tkiva pridruženog crijevu, koja se histološki manifestira u izrazitoj infiltraciji mononuklearnim stanicama lamine proprije i submukoze crijeva (104). Opisani eksperimentalni model kolitisa za posljedicu ima i različit stupanj nekroze, uključivši i transmuralni oblik nekroze, prvenstveno uslijed neposrednog oksidativnog oštećenja prouzročenog primjenom DNFB-a. Akutna upala i nekroza, u kojima se isprepliću mehanizmi oksidativnog stresa i odgođene preosjetljivosti (engl. "Dealyed Type Hypersensitivity" – DTH), bilježe se tijekom prvih pet dana nakon DNFB klizme i nastavljaju se u kroničnu upalu, karakteriziranu opsežnom mononuklearnom infiltracijom sluznice i submukoze (127, 129 ). Prema rezultatima objavljenih istraživanja, opisani model eksperimentalnog kolitisa izazvan primjenom DNFB-a je definiran karakterističnim obrascem izazvanih upalnih promjena koje je moguće izraziti histopatološkim skorom (130). Tako opisani model predstavlja jednostavan, dostupan, reproducibilan i dobro definiran postupak koji omogućuje istraživanje protuupalnog djelovanja različitih supstanci, kao što je dokumentirani učinak metilprednizolona i ciklosporina u ovom modelu (107, 131).

Rezultati ovog istraživanja dokumentiraju učinak azitromicina na smanjenje opsega eksperimentalnog kolitisa koji se očitovao u smanjenju kliničkog skora crijevne upale i slijede prethodno objavljene rezultate koji govore o značajnom učinku azitromicina na smanjenje sveukupnog histološkog skora upale (101). Prema rezultatima objavljenih kliničkih istraživanja antibiotici u monoterapiji nisu učinkoviti u postizanju i održavanju remisije upalnih bolesti crijeva no u konvencionalnoj antibiotskoj terapiji upalnih bolesti crijeva se prvenstveno koriste ciprofloksacin i metronidazol za liječenje septičnih komplikacija, bakterijskog prerastanja u crijevu i u liječenju perianalne

bolesti (86). U primjeni metronidazola zabilježen je umjereni učinak u ileokoloničnoj bolesti, ali ne i Crohnovoj bolesti tankog crijeva, a primjena lijeka je opravdana u bolesnika s "pouchitisom", nakon kolektomije zbog ulceroznog kolitisa (86). Protuupalni učinak ciprofloksacina i kombinacije neomicina i metronidazola zabilježen je u spontano nastalom kolitisu u "knock-out" miševa za IL-10 i bio je prvenstveno vezan za antibiotski učinak na luminalne bakterije (132). Klinička istraživanja i eksperimentalna istraživanja na glodavcima bilježe učinak metronidazola u smanjenju anaerobne flore tankog crijeva, ali ne cekuma i kolona (133) Nasuprot tome, dokumentirani protuupalni učinak azitromicina je u modelima eksperimentalnog kolitisa bio postignut bez značajnog utjecaja na luminalne crijevne bakterije, a klinička istraživanja potvrđuju da primjena azitromicina nema utjecaja floru crijeva u zdravih dobrovoljaca (101, 134, 135). Moguće objašnjenje leži u činjenici da derivati eritromicina A, uključivši i azalid azitromicin posjeduju značajna imunomodulacijska i protuupalna svojstva kao što je smanjenje oksidativnog oštećenja i potiskivanje proupalnih citokina putem djelovanja na glasnličku RNK (mRNA) (136) Mogući mehanizmi djelovanja azitromicina također uključuju inhibiciju otpuštanja citokina, zaprječavanje funkcije neutrofila i otpuštanja medijatora, stimulaciju apoptoze i inhibiciju sekrecije sluzi (137).

Interesantno je spomenuti da proširena definicija supstanci makrolidne obitelji, kojoj pripada i azalid azitromicin – antibiotik s imunomodulacijskim svojstvima – uključuje i kompleksne spojeve sa snažnim imunosupresijskim djelovanjem koji ne posjeduju antibiotska svojstva: takrolim, rapamicin, bafilomicin i konkanamicin (138.)

Sukladno općem cilju istraživanja, dokumentirane su promjene proupalnih i protuupalnih patogenetskih markera – TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  i TLR4 – u manipulaciji modela eksperimentalnog kolitisa u miševa. Kao osobinu samog modela rezultati pokazuju

značajno veću izraženost TNF $\alpha$  u epitelnom odjeljku (EPe i EPm) sluznice miševa s eksperimentalnim kolitisom koji nisu tretirani, u odnosu na sluznicu zdravih životinja. Također je zabilježena veća ekspresija TNF $\alpha$  na epitelnim stanicama (EPe) uz promatranu upalnu leziju, u odnosu na epitelne stanice udaljeno od upalne lezije. Navedeni rezultati su očekivani budući rezultati brojnih istraživanja pokazuju da TNF $\alpha$  predstavlja glavni proupalni citokin u Crohnovoj bolesti čija se terapija u novije vrijeme temelji na primjene biološke terapije protiv ovog citokina (139). Poznato je da su mnogi učinci bakterijskih produkata i LPS-a posredovani lučenjem TNF $\alpha$  i štoviše, bakterijski LPS predstavlja potentan stimulus za lučenje TNF $\alpha$  (82). Navedena opažanja su sukladna rezultatima koji ukazuju na povećanu ekspresiju TNF $\alpha$  u sluznicu uz izazvanu upalnu leziju.

U osobini samog modela izraženost TGF $\beta$  je bila značajno veća u epitelnom odjeljku (EPe i EPm) i lamini propriji (LPm) sluznice zdravih životinja, u odnosu na sluznicu životinja s eksperimentalnim kolitisom. Navedeni rezultat je očekivan budući TGF $\beta$  predstavlja protuupalni citokin koji je prepoznat kao ključni regulator imunološke homeostaze sluznice i smanjena aktivnost spomenutog citokina se povezuje s razvojem proupalnih stanja u kroničnim bolestima, uključivši i upalnu bolest crijeva (74). TGF $\beta$  je citokin prisutan u svim tkivima i posjeduje pleiotropne funkcije koje su osobito važne u cijeljenju upale; djeluje praktično na sve stanice i miševi deficijentni za TGF beta razvijaju tešku upalnu bolest multiplih organa koja je karakterizirana povećanom sintezom TNF alfa i interferona gama, a manjak TGF-beta u crijevnoj sluznici miševa čini povećano osjetljivima na DSS-om izazvani kolitis (140).

U osobini samog modela zabilježena izraženost TLR4 u epitelnom odjeljku (EPe i EPm) te u lamini propriji (LPm) nije se razlikovala između sluznice miševa s eksperimentalnim kolitisom koje nisu tretirane i sluznice zdravih životinja. Nasuprot



tome, značajno veća izraženost TLR4 zabilježena je na mononuklearnim stanicama submukoze (SMm) sluznice uz izazvanu upalnu leziju u miševa s eksperimentalnim kolitisom, u odnosu na sluznicu udaljeno od lezije i na sluznicu zdravih životinja. Ovaj rezultat je neophodno sagledati u svjetlu činjenice da obilježja crijevne upale ne predstavljaju samo promjene ravnoteže proupalnih i protoupalnih citokina već i promjene ekspresije membranskih biljega (141). Toll-like receptori (TLR) su homolozi "Toll" proteina mušice *Drosophila* i u ljudi predstavljaju obitelj transmembranskih glikoproteina koja se sastoji od 10 članova (13 članova u miševa) (44). Nalaze se na površini stanica ili na endosomima i prepoznaju prisutnost mikroorganizama preko molekularnih obrazaca povezanih s patogenima (PAMP) i preko molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjem (45). Humane intestinalne epitelne stanice (IES) izražavaju konstitutivne TLR3 i TLR5 i tek male količine TLR2 i TLR4 (142). Ovi transmembranski receptori tipa I se konstitutivno ili inducibilno mogu naći na različitim tipovima stanica u probavnom sustavu, uključivši epitelne stanice želuca, tankog crijeva i kolona, ali i se mogu naći i na stanicama monocitno-makrofagnog reda i dendritičnim stanicama te na miofibroblastima, endotelnim stanicama i adipocitima lamine proprije i submukoze sluznice (143, 144). Važno je istaknuti da pojedini član TLR obitelji prepoznaje različit "molekularni potpis" koji se nalazi na mnoštvu komenzalnih i patogenih bakterija i spektar patogena koji prepoznaju TLR uključuju gram pozitivne i gram negativne bakterije, kvasce i viruse, a TLR-4 reagira s lipopolisaharidom (LPS) što rezultira regrutacijom adapterske molekule MyD88 (44). Prijenos signala preko TLR4 receptora koji bivaju pobuđeni bakterijskim LPS i prenose signal pomoću adapterske molekule MyD88, za posljedicu ima aktivaciju transkripcijskog faktora NFκB putem djelovanja signalnih modula, primjerice TRAF6 što pobuđuje stvaranje i lučenje citokina (145).

TLR4 posreduje fiziološka zbivanja u probavnom sustavu zdrave jedinke kao što je specifična imunološka tolerancija za antigene luminalne mikroflore, inhibicija alergijskih reakcija na antigene iz hrane, zaštita funkcije epitelne barijere, olakšavanje klirensa potencijalnih patogena (primjerice *S. typhimurium*) putem pobuđivanja lučenja antimikrobnih peptida u crijevu (primjerice defenzina iz Panethovih stanica) (146, 147, 148). Podaci iz literature govore o važnosti posredovanja TLR4 u pobuđivanju i prijenosu signala, izazvanog antigenima crijevne mikroflore u zaštiti domaćina od alergijskih reakcija na antigene iz hrane, što pokazuje i činjenica da su "knock-out" miševi za TLR4 izrazito skloni nutritivnoj alergiji koja korelira s Th2 obrascem lučenja citokina, primjerice lučenjem IL-4 i IL-13 (149). Stoga je moguće da stimulacija TLR4 putem LPS liganda sprječava Th2 obrazac reakcije pobuđen alergenom, pojačavajući Th1 obrazac reakcije T-limfocita putem TLR4 (150). Međutim, prijenos signala preko TLR4 može rezultirati pobuđivanjem protuupalnih citokina i započinjanjem kaskade apoptoze, ali i lučenjem proupalnih citokina s posljedičnom upalom i oštećenjem tkiva, što prema objavljenim istraživanjima ovisi o: luminalnim činiteljima i okolišu (komezali, patogeni, antigeni iz hrane), genetskoj osjetljivosti domaćina (mutacije gena za interleukine – IL -10, transkripcijske faktore – STAT3, uključivši i mutacije gena za TLR4 na kromosomu 9 u ljudi), prevladavajućem obrascu aktualne imunološke reakcije – urođenom ili stečenom, te o vrsti stanica koje izražavaju TLR4 (151). U usporedbi sa tkivom zdravih ispitanika, u sluznici bolesnika s ulceroznim kolitisom i Crohnovom bolesti zabilježena je povećana ekspresija TLR4 na IES i selektivno povećana ekspresija TLR2 i TLR4 na stanicama monocitno-makrofagnog reda lamine proprije (45,46). Općenito, klinička istraživanja bilježe hiperaktivaciju TLR4 u sluznici bolesnika s UBC, što potkrepljuju i opažanja da proupalni citokini IFN $\gamma$  i TNF $\alpha$  koji su involvirani u

patogenezi UBC pokazuju svojstvo hiperaktivacije TLR4, *in vitro*, što za posljedicu ima pojačani odgovor na LPS (152). Rezultati bazičnih istraživanja pokazuju da eksperimentalni kolitis (DSS) i ileitis (*Toxoplasma gondii*) rezultiraju povećanim oslobađanjem LPS-a, pretežito iz enterobakterijacea komenzalne mikroflore, što za rezultat ima hiperaktivaciju TLR4 (153). Eksperimentalna istraživanja govore da obrazac prijenosa signala putem TLR4/MyD88 koji je potaknut konmenzalnim ligandom (LPS) uzrokuje kroničnu crijevnu upalu putem aberantne aktivacije mijeloidnih stanica, u odsutnosti IL-10 (154). Sukladno navedenom, istraživanja na "knock-out" miševima deficitarnim za IL-10 (IL-10  $-/-$ ), ukoliko su i deficitarni za prijenos signala putem TLR4 (TLR4  $-/-$ ) ili MyD88 (MyD88  $-/-$ ) zabilježila su protektivni učinak za Th1 obrazac kroničnog kolitisa u miševa, izazvanog primjenom TNBS-a (155, 156). Navedena opažanja također treba sagledati i u svjetlu profilaktičkog učinka prethodno peroralno primijenjenog LPS-a – liganda za TLR4 – u miša deficitarnog za komenzalnu floru koji se očitovao u protektivnom učinku za kolitis izazvan primjenom DSS-a, što kod očuvane epitelne barijere upućuje na važnu ulogu TLR4 u održavanju homeostaze crijevne sluznice (157). Rezultati istraživanja su sukladni podacima iz literature budući je zabilježena selektivno veća ekspresija TLR4 uz izazvanu upalnu leziju, u dubljim slojevima sluznice na mononuklearnim stanicama submukoze, u odnosu na sluznicu kolona zdravih životinja. Navedeno opažanje je vjerojatna posljedica narušenja epitelne barijere i prodora bakterijskih produkata u dublje slojeve sluznice miševa s eksperimentalnim kolitisom izazvanim primjenom DNFB-a.

U ovom se istraživanju učinak terapije metilprednizolonom, azitromicinom i metronidazolom očitovao u značajno manjoj ekspresiji TNF $\alpha$  na mononuklearnim stanicama epitelnog odjeljka u sluznici skupina MP i AZ, što je sukladno prethodno

zabilježenom učinku metilprednizolona i azitromicina na ukupni opseg upale (101). Budući glukokortikoidi imaju snažna imunosupresijska i protuupalna djelovanja, sukladno rezultatima iz literature koji govore o učinku deksametazona na značajno smanjenje ekspresije TNF $\alpha$  u modelu crijevne upalu izazvane primjenom dinitrobenzen-sulfonske kiseline (DNS), značajan je podatak da nije utvrđena razlika učinka između metilprednizolona i azitromicina u redukciji izraženosti TNF $\alpha$  u sluznici tretiranih miševa s eksperimentalnim kolitisom (158). Izraženost TNF $\alpha$  u sluznici miševa koji su tretirani metronidazolom nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa nije se razlikovala od zabilježene u sluznici miševa s eksperimentalnim kolitisom koji nisu tretirani. Navedeno opažanje je moguća posljedica kratkotrajne primjene metronidazola (5 dana) uz izostanak učinka na redukciju komenzalne flore kao glavnog način djelovanja metronidazola na opseg crijevne upale, u uobičajenom načinu primjene u trajanju od nekoliko tjedana (101, 169). Štoviše, suma skorova izraženosti TNF $\alpha$  na mononuklearnim stanicama submukoze je zabilježena kao značajno najveća u skupini tretiranoj metronidazolom što ukazuje na izostanak protuupalnog učinka metronidazola u dubljim slojevima sluznice.

Rezultati učinka terapije i razlika učinka terapije pokazuju izraženost TGF $\beta$  na epitelu i mononuklearnim stanicama epitelnog odjeljka te mononuklearnim stanicama lamine proprije i zabilježena je kao značajno veća u svim skupinama tretiranih životinja s eksperimentalnim kolitisom (MP / AZ / MN), u odnosu na skupinu chall. Nije zabilježena razlika učinka između skupina MP, AZ i MN. Navedeno opažanje navodi na zaključak da protuupalna terapija za posljedicu ima povećanu izraženost TGF $\beta$  koji predstavlja inhibitorni citokin s ulogom ključnog regulatora imunološke homeostaze sluznice i protuupalnog odgovora na noksu. U prilog tome govore i podaci iz literature o povezanosti crijevne upale i odgođenog cijeljenja s

nedostatnim prijenosom signala putem TGF $\beta$  te o povezanosti procesa cijeljenja i pojačane bioaktivnosti TGF $\beta$  u eksperimentalnim modelima kolitisa (160, 161).

Rezultati učinka terapije i rezultati razlike učinka terapije pokazuju izraženost TLR4 na epitelnim stanicama i mononuklearnim stanicama epitenog odjeljka, lamine proprije i submukoze i učinak terapije se očitovao u značajno manjoj ekspresiji TLR4 na mononuklearnim stanicama submukoze u skupini tretiranoj metilprednizolonom i azitromicinom, za razliku od skupine tretirane metronidazolom u kojoj se ekspresija TLR4 na mononuklearnim stanicama submukoze nije razlikovala skupine chall.

Opisani rezultati govore u prilog razmišljanju da metilprednizolon i azitromicin, smanjujući opseg upale u dubljim slojevima sluznice također mijenjaju i ekspresiju TLR4 koja prati širenje izazvane upale kroz slojeve sluznice. U prilog navedenom govori učinak metilprednizolona i azitromicina na smanjenje izraženosti TNF $\alpha$  na mononuklearnim stanicama submukoze, u odnosu na izostanak učinka u skupini tretiranoj metronidazolom.

Sve navedeno govori o značajnom učinku azitromicina na izraženost TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  i TLR4 koji se nije razlikovao od učinka metilprednizolona što ukazuje na činjenicu da azalidni antibiotik sa imunomodulacijskim svojstvima posjeduje protupalno djelovanje na razini glukokortikoida, u ovom modelu eksperimentalnog kolitisa. Štoviše dokumentirana protuupalna svojstva azitromicina moguće imaju i određene prednosti, u usporedbi s djelovanjem glukokortikoida i metronidazola. Rezultati istraživanja govore o značajnim protuupalnim svojstvima azitromicina poput smanjenja oštećenja slobodnim radikalima i smanjenje oksidativnog oštećenja, inhibicije otpuštanja proupalnih citokina putem djelovanja na glasičku RNK (mRNA), zaprječavanje funkcije neutrofila i otpuštanja medijatora te stimulacije apoptoze, bez opisanih nuspojava koje su dobro poznate za primjena glukokortikoida i metronidazola. (136,

162). Osobito je važan učinak azitromicina na TLR4 čiji ligand LPS u zdrave jedinke osigurava imunološku i upalnu homeostazu crijevne sluznice. U fiziološkom stanju ekspresija receptorskog kompleksa TLR4 – MD2 – CD14 je niska i sluznica ne reagira značajno na produkt komenzalnih bakterija - ligand LPS (163). Stanice smještene dublje u intestinalnoj kripti pokazuju veću osjetljivost TLR4 receptora na LPS, a također je zabilježena povećana osjetljivost antigen predočujućih stanica crijevne sluznice, primjerice DC na poticaje drugih TLR (2 / 3 / 5 / 8 / 9), što indirektno ukazuje na mogućnost njihove TLR posredovane aktivacije koja direktno ne uključuje TLR4 (164, 165). U patofiziološkim uvjetima, pojačana aktivacija IES putem pobuđenih TLR4 dovodi do aktivacije transkripcijskog faktora NF $\kappa$ B i stvaranja / otpuštanja proupalnih citokina poput IFN $\gamma$  i TNF $\alpha$  koji povratno djeluju pojačavajući ekspresiju TLR4 na IES (166, 167). Novija istraživanja na eksperimentalnim modelima crijevne upale dokumentiraju učinak TLR4 antagonista u sprječavanju nastanka akutnog DSS kolitisa i sprječavanju nastanka spontanog kolitisa u "knock-out" miševa deficijentnih za MDR1 $\alpha$  (-/-) (168). Hipoksija crijevne sluznice u nekrotizirajućem enterokolitisu povećava ekspresiju TLR4 u crijevnoj sluznici i čini je osjetljivijom na izlaganje LPS-u, a u C3H/HeJ miševa, koji su mutanti za TLR4 i pokazuju relativnu neosjetljivost prema stimulaciji LPS-om, pokazana je otpornost na razvoj nekrotizirajućeg enterokolitisa (169, 170). Prema navedenim podacima iz literature TLR4 se doima kao privlačan terapijski cilj kojemu se približio i učinak azitromicina, dokumentiran u ovom modelu eksperimentalnog kolitisa izazvanog primjenom DNFB. Štoviše, opaženi učinak azitromicina, prema prethodno izvedenim rezultatima nije imao učinka na crijevne bakterije (101). Navedeni podatak je neophodno sagledati u svjetlu novijih istraživanja koji dokazuju da kombinacija antibiotika (ampicilina, gentamicina, metronidazola, neomicina i vankomicina) u

primjeni tijekom 10 dana za učinak ima značajnu promjenu komenzalnog mikrobioma u miševa koja pokazuje vremensku ovisnost o trajanju primjene antibiotika u odnosu na mikrobiom u promatranom odsječku debelog crijeva, a sumarno dokazuje značajnu redukciju laktobacila i firmikutnih bakterija te značajni porast *Bacteroides* populacije što može utjecati na sklonost razvoju i održavanju kolitisa u različitim obrascima eksperimentalnih modela (171).

U bolesnika s UBC bilježe se povećane koncentracije TNF $\alpha$  crijevnoj sluznici uz upalnu leziju, krvi i stolici i pokazano je njegovo povećano stvaranje i otpuštanje u eksperimentalnim modelima kolitisa (172, 173). Rezultati ovog istraživanja u izvorno opisanom modelu eksperimentalnog kolitisa izazvanog primjenom DNFB također pokazuju značajne veću ekspresiju TNF $\alpha$  i TLR4 u sluznici miševa s eksperimentalnim kolitisom, u odnosu na sluznicu zdravih životinja. Nasuprot tome, u sluznici miševa s eksperimentalnim kolitisom zabilježena je značajno manja ekspresija TGF $\beta$ , u odnosu na sluznicu zdravih miševa. Navedena opažanja su dokaz promjena proupalnih i protuupalnih patogenetskih markera u manipulaciji modela eksperimentalnog kolitisa u miševa, izazvanog primjenom DNFB. Rezultati učinka različitih tretmana eksperimentalnog kolitisa ukazuju na manji protuupalni potencijal metronidazola, a značajni protuupalni učinak metilprednizolona i azitromicina nije se međusobno razlikovao. Azitromicin pokazuje odgovarajući protuupalni učinak koji se očitovao u značajnom smanjenju izraženosti TNF $\alpha$  i TLR4 s potencijalnim kliničkim implikacijama, uvažavajući aktivnost obrazaca održavanja upale i razdoblju biološkog tijeka upalne bolesti crijeva u ljudi. Navedeno opažanje je potrebno sagledati u odnosu na prihvatljive nuspojave azitromicina u dosadašnjoj kliničkoj primjeni i u svjetlu interesa za TLR4 kao privlačnog terapijskog cilja u liječenju crijevne upale.

## **6. ZAKLJUČAK**



1. Rezultati ovog istraživanja pokazuju promjene proupalnih i protuupalnih patogenetskih markera (TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  i TLR4) u manipulaciji izvorno opisanog modela eksperimentalnog kolitisa izazvanog primjenom DNFB.
2. Dokumentirane su očekivane razlike izraženosti biljega u sluznici miševa s eksperimentalnim kolitisom i sluznice zdravih miševa:
  - Značajno veća ekspresija TNF $\alpha$  i TLR4
  - Značajno manja ekspresija TGF $\beta$  u sluznici miševa s eksperimentalnim kolitisom, u odnosu na sluznicu zdravih životinja
3. Rezultati istraživanja razlike izraženosti promatranih biljega između tretiranih i netretiranih miševa s eksperimentalnim kolitisom pokazuju:
  - Manju ekspresiju TNF $\alpha$  i TLR4 u sluznici miševa tretiranih metilprednizolonom i azitromicinom i
  - Veću ekspresiju TGF $\beta$  u sluznici miševa s eksperimentalnim kolitisom koji su tretirani metilprednizolonom, azitromicinom i metronidazolom.
  - U sluznici životinja tretiranih metronidazolom nije zabilježena razlika ekspresije TNF $\alpha$  i TLR4, u odnosu na sluznicu miševa s eksperimentalnim kolitisom.

U svjetlu izraženosti biljega, metronidazol pokazuje slabiji protuupalni učinak od učinka metilprednizolona i azitromicina.

4. Razlike učinka pojedinog tretmana na izraženost biljega pokazuju

- Da je učinak metronidazola na smanjenje izraženost TNF $\alpha$  i TLR4 na mononuklearnim stanicama submukoze bio značajno manji od učinka metilprednizolona i azitromicina.
- Nije zabilježena značajna razlika učinka metilprednizolona i azitromicina na smanjenje izraženosti TNF $\alpha$  i TLR4. U odnosu na izraženost TGF $\beta$  nije zabilježena razlika učinka metilprednizolona, azitromicina i metronidazola.

Protuupalni učinak azitromicina nije se značajno razlikovao od protuupalnog učinka metilprednizolona.

5. Prema rezultatima istraživanja azitromicin pokazuje odgovarajući protuupalni učinak koji se očitovao u značajnom smanjenju izraženosti TNF $\alpha$  i TLR4 s potencijalnim kliničkim implikacijama, uvažavajući aktivnost obrazaca podržavanja upale i razdoblju biološkog tijeka upalne bolesti crijeva u ljudi.
6. Navedeno opažanje je potrebno sagledati u odnosu na prihvatljive nuspojave azitromicina u dosadašnjoj kliničkoj primjeni i u svjetlu interesa za TLR4 kao privlačnog terapijskog cilja u liječenju crijevnog upala.

## 1. SAŽETAK

Promjene ravnoteže proupalnih i protuupalnih citokina te membranskih biljega imaju važnu ulogu u etiopatogenezi UBC (upalne bolesti crijeva). Cilj ovog istraživanja bio je pokazati učinak azitromicina na izraženost TLR-4, TNFalfa i TGFbeta u sluznici debelog crijeva u modelu eksperimentalnog kolitisa izazvanog intrarektalnom primjenom 2,4-dinitrofluorobenzena. Učinjena je imunohistokemijska analiza ekspresije TLR4, TNFalfa i TGFbeta iz parafinskih kocki u kojima je bilo pohranjeno tkivo crijeva miševa. Eksperimentalne skupine miševa tretirane su primjenom azitromicina ili metronidazola ili metilprednizolona tijekom pet dana uz kontrolne skupine koje su činile grupa zdravih miševa i grupa miševa s eksperimentalnim kolitisom. Rezultati ovog istraživanja pokazuju promjene proupalnih i protuupalnih patogenetskih markera (TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  i TLR4) u manipulaciji izvorno opisanog modela eksperimentalnog kolitisa izazvanog primjenom DNFB. Dokumentirane su očekivane razlike izraženosti biljega u sluznici miševa s eksperimentalnim kolitisom i sluznice zdravih miševa: značajno veća ekspresija TNF $\alpha$  i TLR4 te značajno manja ekspresija TGF $\beta$  u sluznici miševa s eksperimentalnim kolitisom, u odnosu na sluznicu zdravih životinja. Rezultati istraživanja razlike izraženosti promatranih biljega između tretiranih i netretiranih miševa s eksperimentalnim kolitisom pokazuju: manju ekspresiju TNF $\alpha$  i TLR4 u sluznici miševa tretiranih metilprednizolonom i azitromicinom i veću ekspresiju TGF $\beta$  u sluznici miševa s eksperimentalnim kolitisom koji su tretirani metilprednizolonom, azitromicinom i metronidazolom. U sluznici životinja tretiranih metronidazolom nije zabilježena razlika ekspresije TNF $\alpha$  i TLR4, u odnosu na sluznicu miševa s eksperimentalnim kolitisom. U svjetlu izraženosti biljega, metronidazol pokazuje slabiji protuupalni učinak od učinka metilprednizolona i azitromicina. Razlike učinka pojedinog tretmana na izraženost biljega pokazuju da je učinak metronidazola na smanjenje izraženost TNF $\alpha$  i TLR4 na mononuklearnim stanicama submukoze bio značajno manji od učinka metilprednizolona i azitromicina. Nije zabilježena značajna razlika učinka metilprednizolona i azitromicina na smanjenje izraženosti TNF $\alpha$  i TLR4. U odnosu na izraženost TGF $\beta$  nije zabilježena razlika učinka metilprednizolona, azitromicina i metronidazola. Protuupalni učinak azitromicina nije se značajno razlikovao od protuupalnog učinka metilprednizolona. Prema rezultatima istraživanja azitromicin pokazuje odgovarajući protuupalni učinak koji se očitovao u značajnom smanjenju izraženosti TNF $\alpha$  i TLR4 s potencijalnim kliničkim implikacijama, uvažavajući aktivnost obrazaca održavanja upale i razdoblju biološkog tijeka upalne bolesti crijeva u ljudi.

## **2. SUMMARY**

## **The effect of azithromycin on TLR-4, TNF alpha and TGF beta expression in bowel mucosa in a murine model of experimental colitis**

Changes in expression of pro- and anti-inflammatory cytokines and membrane receptors are documented in patients with IBD. The aim of this study was to investigate the effect of azithromycin on expression of TLR-4, TNF $\alpha$  and TGF $\beta$  in bowel mucosa in a murine model of experimental colitis induced by enema 2, 4 –dinitrofluorobenzene. Immunohistochemistry was performed on paraffin embedded murine intestinal tissue for TLR-4, TNF $\alpha$  and TGF $\beta$ . Experimental groups of animals were treated with azithromycin, metronidazole or methylprednisolone for five days, respectively and the control group was the group of healthy mice and group of mice with experimental colitis. Results of this study showed the changes in expression of pro- and anti-inflammatory cytokines (TLR-4, TNF $\alpha$  and TGF $\beta$ ) in a murine model of experimental colitis induced by DNFB. The expected differences in expression markers: significantly increased expression of TNF $\alpha$  and TLR4, and significantly decreased expression of TGF $\beta$  in bowel mucosa in a murine model of experimental colitis compared to bowel mucosa of healthy mice. The results of this study documented the differences in expression of observed markers; smaller expression of TNF $\alpha$  and TLR4 in bowel mucosa treated with methylprednisolone and azithromycin and larger expression of TGF $\beta$  in bowel mucosa of mice with experimental colitis treated with methylprednisolone, azithromycin and metronidazole. In murine bowel mucosa treated with metronidazole no differences were noted compared with group with experimental colitis. Metronidazole showed weak anti-inflammatory effect compared to methylprednisolone and azithromycin. The effect of treatment on expression of markers documented that the effect of metronidazole on the reduction of TNF and TLR4 expression on mononuclear cells of submucosa was significantly weaker than the effect of methylprednisolone and azithromycin. There was no significant difference between methylprednisolone and the effect of azithromycin on the reduction of TNF and TLR4 expression. There was no significant difference between the effect of methylprednisolone, azithromycin and metronidazole on expression of TGF $\beta$ . The anti-inflammatory effect of azithromycin was not significantly different from the anti-inflammatory effect of methylprednisolone. According to the results azithromycin shows the corresponding anti-inflammatory effect which manifested itself in a significant reduction of expression of TNF $\alpha$  and TLR4 with potential clinical implications, regarding the activity patterns of inflammation perpetuation and the period of the biological course of inflammatory bowel disease in humans.

## **9. LITERATURA**

1. Cominelli F, Arseneau KO, Blumberg RS. The mucosal immune system and gastrointestinal inflammation. U: Yamada T, Alpers DH, Kallo AN, Kalpowitz n, Owang C, Powell DW, ur. The Textbook of Gastroenterology. 5 izd. Blackwell Publishing; 2009, str 113-68.
2. William F. Stenson, Theresa T. PizarroCooper MD. Current concepts . B lymphocytes. Normal development and function. N Engl J Med 1987;317:1452.
3. Reth M, Hombach J, Wienands J i sur. The B-cell antigen receptor complex. Immunol Today 1991;12:196.
4. Harnett MM, Katz E, Ford CA. Differential signaling during B cell maturation. Immunol Lett 2005;98:33
5. Poe JC, Hasegava M Tedder TF. CD19, CD21 and CD22: multifaceted response regulators of B lymphocyte signal transduction. Int Rev Immunol 2001;20:739
6. O'Conor GM, Hart OM, Gardner CM. Putting the natural killer cell in its place. Immunology 2006;117:1.
7. Panja A, Mayer L. Antigen presentation in the intestine. Baillieres Clin Gastroenterol 1996;10:407.
8. Iwasaki A, Kelsall BL. Unique functions of CD11b+, CD8 alpha\*, and double-negative Peyer's pathch dendritics cells. J Immunol 2001;166:4884.
9. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nat immunol 2004;5:987.
10. Appelberg R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. Trends Microbiol 2007; 15:87.



11. Hayday A, Theodoris E, Ramsburg E, Shires J Intraepitel lymphocytes.: exploring the Third Way in Immunology. *Nat Immunol* 2001;2:997.
12. Ferguson A. Intraepitel lymphocytes of the small intestine. *Gut* 1977;18:921.
13. Jarry A, Cerf-Bensussan N, Brousse N, Selz F, Guy-Grand D. Subsets of CD3+ (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3- lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur J Immunol*. 1990 May;20(5):1097-103.
14. Singl G, Koning F, Yamada H i sur. Thy-1 dendritic epidermal cells express T3 antigen and the T-cell receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:4586.
15. Asarnow DM, Kuzel WA, Bonyhadi M i sur. Limited diversity of gamma delta antigen receptor genes of Thy-1+ dendritic epidermal cells. *Cell* 1988;55:837.
16. Brandtzaeg P, Sollid LM, Thrane PS i sur. Lymphoepithelial interactions in the mucosal immune system. *Gut* 1988;29:1116.
17. Mach J, Hshieh T, Hshieh D i sur. Development of intestinal M cells. *Immunol Rev* 2005;206:177.
18. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B i sur. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001;2:361.
19. Taylor RT, Luger A, Newell KA, Williams IR. Intestinal cryptopatch formation in mice requires lyphotoxin alpha and the lyphotoxin beta receptor. *J Immunol* 2004; 173:7183.

20. Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V *in situ*. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2005;6:507.
21. Cebra JJ, Komisar JL, Schweitzer PA. CH isotype "switching" during normal B-lymphocyte development. *Annu Rev Immunol* 1984;2:493.
22. Schieferdecker HL, Ulrich R, Hirsland H, Zeitz M. T cell differentiation antigens on lymphocytes in the human intestinal lamina propria. *J Immunol* 1992;149:2816.
23. Medzhitov R, Yaneway GJ. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000;343:338.
24. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2009;136: 65-80.
25. Raz E. Mucosal immunity: aliment and ailments. *Mucosal Immunology* 2010;3:1: 4-7
26. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacteria mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307:1915-20.
27. Wen L *in situ* Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 2008;455:1109-13-
28. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2007;132:1359-1374.
29. Rachmilewitz D *in situ*, Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. *Gastroenterology* 2002;122:1428-1441.
30. Rakouf-Nahoum S, Paglino S, EslamiVarzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118: 229-241.

31. Fukata M, Michelsen KS, Eri R, et al. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288:G1055–1065.
32. Fukata M, Abreu MT. TLR4 signaling in the intestine in health and disease. *Biochem Soc. Trans* 2007;35:1473-1478.
33. Fochii. The normal intestinal mucosa knjiga inflammatory bowel disease
34. Von Boehmer H. Positive selection of lymphocytes. *Cell* 1994;76:219.,  
Nossal GJ. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 1994;76:229
35. Fasano A, Shea-Donohue T. Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2:416
36. Clayburgh DR, Shen L, Turner JR. Aporous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest* 2004;84:282.
37. Scott KG, Meddings JB, Kirk DR i sur. Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterology* 2002; 123:1179.
38. Yuhan R, Koutsouris A, Savkovic SD, Hecht G. Enteropathogenic *Escherichia coli*- induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1997;113:1873.
39. Olson TS, Reuter BK, Scott KG i sur. The primary defect in experimental ileitis originates from a nonhematopoietic source. *J Expe Med* 2006;203:541.
40. MacDermot RP. Alterations in the mucosal immune system in ulcerative colitis and Crohn' s disease. *Medical Clin North Am* 1994;1207-32.

41. Scott H, Sollid LM, Fausa O i sur. Expression of major histocompatibility complex class II subregion products by jejunal epithelium in patients with coeliac disease. *Scand J Immunol* 1987;26:563.
42. Sollid LM, Gaudernack G Markussen G i sur. Induction of various HLA class II molecules in a human colonic adenocarcinoma cell line. *Scand J Immunol* 1987;25:175.
43. Hershberg RM, Framson PE, Cho DH i sur. Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing. *J Clin Invest* 1997;100:204.
44. Lavelle EC, Murphy C, O'Neill Creagh EM. The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal Immunology* 2010;3(1):17-28.
45. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3(TLR3) i TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun.* 2000;68:7010-7017.
46. Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, et al. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology.* 2002;122:1987–2000.
47. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology.* 2004;127:224 –238.
48. Szebeni B, Veres G, Dezsofi A, et al. Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 2008;151:34–41.

49. Fukata M, Abreu MT. What are toll-like receptors and what role may they have in IBD? *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Oct;14 Suppl 2:S90-2.
50. Abreu MT, Vora P, Faure E, et al. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2001;167:1609 –1616.
51. Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infect Immun*. 2003;71:3503–3511.
52. Vijay-Kumar M, Sanders CJ, Taylor RT, et al. Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest*. 2007;117:3909 –3921.
53. Fukata M, Chen A, Klepper A, et al. Cox-2 Is Regulated by Toll-Like Receptor-4 (TLR4) Signaling: Role in Proliferation and Apoptosis in the Intestine. *Gastroenterology*. 2006;131:862– 877.
54. Henson PM, Henson JE, Fittshen C. Degranulation and secretion of phagocytic cells. IN: Gallin J, Goldstein I, Snyderman R (eds). *Inflammation: Basic principles and Clinical correlates*, 2nd edn. New York: Raven Press 1992:511.
55. Van Furth R. development and distribution of mononuclear phagocytes. IN: Gallin J, Goldstein I, Snyderman R (eds). *Inflammation: Basic principles and Clinical correlates*, 2nd edn. New York: Raven Press 1992:325.
56. Pavli P, Doc WF. Intestinal macrophages. In: MacDermatt RP, Stenson WF (eds) *Inflammatory Bowel disease*. New York: Elsevier;1992:177.

57. Springer TA. Adhesion receptors in immune system. *Nature* 1990;346-425.
58. Muller WA. Leukocyte –endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* 2003;24:327.
59. Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S. Selectins: critical mediators of leukocytes recruitment. *Semin Immunol* 2002;14:73
60. Roseth AG, Aadland E, Girzyb K. Normalization of faecal calprotectin: a predictor of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39:1017-20.
61. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI: Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 1157–1170.
62. Guarner F, Malagelada JR: Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512–519
63. Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI: How host microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* 2002; 22: 283–307.
64. Guarner F. Enteric Flora in Health and Disease. *Digestion* 2006;73(suppl 1):5–12.
65. Hooper LV, Xu J, Falk PG, Midtvedt T, Gordon JI: A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9833–9838.
66. Brook I: Bacterial interference. *Crit Rev Microbiol* 1999; 25: 155–172.

67. Lievin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser JR, Servin AL: *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 2000; 47: 646–652.
68. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI: Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001; 291: 881–884.
69. Butler JE, Sun J, Weber P, Navarro P, Francis D: Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets. III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology* 2000; 100: 119–130.
70. Fagarasan S, Muramatsu M, Suzuki K, Nagaoka H, Hiai H, Honjo T: Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science* 2002; 298: 1414–1427.
71. Shanahan F: Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and eotherapeutics. *Gastroenterology* 2001; 120: 622–635.
72. Macpherson A, Khoo UY, Forgacs I, Philpott-Howard J, Bjarnason I: Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* 1996; 38: 365– 375.
73. Pirzer U, Schönhaar A, Fleischer B, Hermann E, Meyer zum Büschenfelde KH: Reactivity of infiltrating T lymphocytes with microbial antigens in Crohn's disease. *Lancet* 1991; 338: 1238–1239
74. Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008 Jul 21;14(27):4280-8.

75. Roncarolo MG, Levings MK, Traversari C. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001;193:F5.
76. Sehgal PB, May LT. Human  $\beta_2$  interferon. *J Interferon Res* 1987; 7: 521-7.
77. Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, et al. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumor necrosis activity. *Nature* 1984; 312: 721-4.
78. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989;47:187
79. Marek A, Brodzicki J, Liberek A, Korzon M. TGF-beta (transforming growth factor-beta) in chronic inflammatory conditions - a new diagnostic and prognostic marker? *Med Sci Monit* 2002; 8: RA145-RA151.
80. Yamada, Bamias G, NyceMR, De La Rue SA, Cominelli F. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med* 2005;143:895.
81. Bamias G, Martin C, Mishina M i sur. Proinflammatory effects of TH2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2005;128:654.
82. 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.
83. Ogura Y, Bonene DK, Inohara N i sur. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603.
84. Kufer TA, Sansonetti PJ Sensing of bacteria: NOD a lonely job. *Curr Opin Microbiol*, 2007;10, 62–69.
85. Vucelić B, Čuković Čavka S. *Upalne bolesti crijeva. U: Interna medicina ur Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. Zagreb 2008, 4. izdanje Naklada Ljevak 794-804.*



86. Rampton DS, Shanahan F. u: Drug treatment. Fast Facts: Inflammatory Bowel Disease. 2008 Health press Limited Oxford 53-80.
87. Labro MT, Abdelghaffar H. Immunomodulation by macrolide antibiotics. J Chemother. 2001 Feb;13(1):3-8.
88. Behr MA, Hanley J. Antimycobacterial therapy for Crohn's disease: a reanalysis. Lancet Infect Dis. 2008 Jun;8(6):344.
89. Culić O, Eraković V, Parnham MJ. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics; Eur J Pharmacol. 2001 Oct 19;429(1-3):209-29.
90. Labro MT. Cellular and molecular effects of macrolides on leukocyte function. Curr Pharm Des 2004;10; 3067–3080.
91. Tsai WC, Standiford TJ. Immunomodulatory effects of macrolides in the lung: lessons from in-vitro and in-vivo models. Curr. Pharm. Des., 2004;10;3081–3093.
92. Gladue RP, Bright GM, Isaacson RE, Newborg MF. In vitro and in vivo uptake of azithromycin (CP-62,993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infection. Antimicrob. Agents Chemother. 1989;33; 277–282.
93. Wildfeuer A, Laufen H, Muller-Wening D, Haferkamp O.. Interaction of azithromycin and human phagocytic cells. Uptake of the antibiotic and the effect on the survival of ingested bacteria in phagocytes. Drug Res./Arzneimittelforschung 1989;39;755–758.
94. Wildfeuer A, Laufen H, Zimmermann T. Uptake of azithromycin by various cells and its intracellular activity under in vivo conditions. Antimicrob. Agents Chemother. 1996;40;75–79.

95. Culic O, Erakovic V, Cepelak I i sur.. Azithromycin modulates neutrophil function and circulating inflammatory mediators in healthy human subjects. *Eur. J. Pharmacol.* 2002;450; 277–289.
96. Ianaro A, Ialenti A, Maffia P i sur. Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000;292;156–163.
97. Khan AA, Slifer TR, Araujo FG, Remington JS. Effect of clarithromycin and azithromycin on production of cytokines by human monocytes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 1999;11;121–132.
98. Suzaki H, Asano K, Ohki S, Kanai K, Mizutani T, Hisamitsu T,. Suppressive activity of a macrolide antibiotic, roxithromycin, on proinflammatory cytokine production in vitro and in vivo. *Mediat. Inflamm.* 1999;8;199–204.
99. Tamaoki J., Kondo M, Kohri K, Aoshiba K, Tagaya E, Nagai A, Macrolide antibiotics protect against immune complex-induced lung injury in rats: role of nitric oxide from alveolar macrophages. *J. Immunol.* 1999;163; 2909–2915.
100. Terao H, Asano K , Kanai K, Kyo Y, Watanabe S, Hisamitsu T, Suzaki H ,. Suppressive activity of macrolide antibiotics on nitric oxide production by lipopolysaccharide stimulation in mice. *Mediat. Inflamm.* 2003;12; 195–202.
101. Pleško S, Banić M, Plečko V, Anić B, Brkić T, Renata H, Rotkvić I. Effect of Azithromycin on Acute Inflammatory Lesions and Colonic Bacterial Load in a Murine Model of Experimental Colitis. *Dig Dis Sci.* 2010;55(8):2211-8
102. Gui GP, Thomas PR, Tizard ML, Lake J, Sanderson JD, Hermon-Taylor J. Two-year-outcomes analysis of Crohn' disease treated with rifabutin and macrolide antibiotics. *J Antimicrob Chemoter* 1997;39Suppl 3:393-400.

103. Kim HS, Berstadt A. Experimental colitis in animal models. Scand J Gastroenterol 1992;27:529-537., Strober W. ANimal models of inflammatory bowel disease – an overwiev. Dig Dis Sci 1985;30:3S-10S.
104. Banić M. Model lezije crijeva izazvan lokalnom primjenom 2,4-dinitrofluorobenzena u prethodno senzibiliziranih miševa (Magistarski rad) Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1992.
105. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1995;109:1344-67.
106. Banić M. Utjecaj doze i načina primjene ciklosporina-a na upalne lezije u eksperimentalnom modelu upalne bolesti crijeva (Disertacija) Medicinski fakultet sveučilišta u zagrebu, 1997.
107. Banic M, Anic B, Brkic T, Ljubicic N, Plesko S, Dohoczky C, Erceg D, Petrovecki M, Stipancic I, Rotkvic I. Effect of cyclosporine in a murine model of experimental colitis. Dig Dis Sci 2002;47(6):1362-8.
108. Banić M, Anić B, Brkić T. Animal models of inflammatory bowel disease. Acta Med Croat 1997;51:37-40.
109. Anić B. Utjecaj imunosupresiva na lezije crijeva izazvane 2,4-dinitrofluorobenzenom u prethodno senzibiliziranih miševa (Disertacija). Medicinski fakultet sveučilišta u zagrebu, 1999.
110. Strober W, Ludviksson BR, Fuss IJ. The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease. Ann Intern Med 1998;128:848-856.
111. Pleško S. Učinak azitromicina na eksperimentalni kolitis u miševa. (Magistarski rad) Medicinski Fakultet sveučilišta u Zagrebu, 2002.

112. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:521–533.
113. Borm ME, He J, Kelsall B, et al. A major quantitative trait locus on mouse chromosome 3 is involved in disease susceptibility in different colitis models. *Gastroenterology*. 2005;128:74–85.
114. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:495–549.
115. Sartor RB. Role of commensal enteric bacteria in the pathogenesis of immune-mediated intestinal inflammation: lessons from animal models and implications for translational research. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005;40(suppl 1):S30–31.
116. Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, et al. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn's disease. *J Clin Invest*. 2004;113:1296–1306.
117. Strober S, Fuss I, Ehrhardt RO et al. Mucosal immunoregulation and inflammatory bowel disease: new insights from murine models of inflammation. *Scand J Gastroenterol* 1998;48:453-58.
118. Komagata J, Weiner HL. Oral tolerance. *Rev Immunogenet* 2000; 2:61-73.
119. Wirtz S, Finotto S, Lohse AW et al. Chronic intestinal inflammation in STAT4 mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF- $\alpha$ -plus IFN $\gamma$ -producing CD4 $^{+}$  T cells that respond to bacterial antigen. *J Immunol* 1999; 162:1884-88.
120. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL et al. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995; 182:1281-90.
121. Strober W. Why study Animal Models of IBD. *Inflamm Bowel Dis* Volume 14, Number S2, 2008:129-131.

122. Izcue A, Powrie F. Special regulatory T-cell review: regulatory T cells and the intestinal tract—patrolling the frontier. *Immunology*. 2008;123:6–10
123. Strober W, Fuss I, Boirivant M, et al. Insights into the mechanism of oral tolerance derived from the study of models of mucosal inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1029:115–131.
124. Watanabe T, Asano N, Murray PJ, Ozato K, et al. Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest*. 2008;118:545–559.
125. Hermiston ML, Gordon JL. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science*. 1995;270: 1203–1207.
126. Heller F, Florian P, Bojarski C, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*. 2005;129:550 –564.
127. Brkić T, Banić M, Anić B, Grabarević Z, Rotkvić I, Artuković B, Duvnjak M, Sikirić P, Troskot B, Hernandez DE. A model of inflammatory bowel disease induced by 2,4-dinitrofluorobenzene in previously sensitized BALB-c mice. *Scand J Gastroenterol*. 1992;27:184-8.
128. Meaghan M. Hunter, Arthur Wang, Christina L. Hirota, and Derek M. McKay. Neutralizing Anti-IL-10 Antibody Blocks the Protective Effect of Tapeworm Infection in a Murine Model of Chemically Induced Colitis. *J Immunol*. 2005, 174: 7368–7375.
129. Banić M, Brkić T, Anić, et al. Effect of methylprednisolone on small bowel, spleen and liver changes in a murine model of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1993;7:201-6.

130. Anić B, Brkić T, Banić M et al. Histopathologic features of T-cell mediated colonic injury induced with 2,4-dinitrofluorobenzene in BALB/c mice. *Acta Med Croat* 1997;51:11-14.
131. Xiao WB, Liu YL. Changes of CD8+CD28- T regulatory cells in rat model of colitis induced by 2,4-dinitrofluorobenzene. *World J Gastroenterol* 2003; 9(11):2528-32.
132. Madsen KL, Doyle JS, Tavernini MM, Jewell LD, Rennie RP, Fedorak RN. Antibiotic therapy attenuates colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 2000; 118(6):1094-105.
133. Yamada T, Deitch E, Specian RD, Perry MA, Sartor RB, Grisham MB. Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced with indomethacin. *Inflammation* 1993; 17:641-62.
134. Mahgoub A, El-Medany A, Mustafa A, Arafah M, Moursi M. Azithromycin and erythromycin ameliorate the extent of colonic damage induced by acetic acid in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 205(1):43-52.
135. Matute AJ, Schurink CA, Krijnen RM, Florijn A, Rozenberg-Arska M, Hoepelman IM. Double-blind, placebo-controlled study comparing the effect of azithromycin with clarithromycin on oropharyngeal and bowel microflora in healthy volunteers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21(6): 427-31.
136. Labro MT. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"? *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(4)::615-650.
137. Parnham MJ, Čulić O, Eraković V i sur. Modulation of neutrophil and inflammation markers in chronic obstructive pulmonary disease by short-term azithromycin treatment. *Eur J Pharmacol* 2005; 517:132-143.

138. Labro MT. Interactions entre les agents anti-infectieux et les phagocytes. Presse Med 1995; 24:992-8.
139. Burmester GR, Mease P, Dijkmans BA isur. Adalimumab safety and mortality rates from global clinical trials of six immune-mediated inflammatory diseases. Ann Rheum Dis. 2009 Dec;68(12):1863-9.
140. Ebert EC, Panja A, Das KM, Praveen R, Geng X, Rezac C, Bajpai M. Patients with inflammatory bowel disease may have a transforming growth factor-beta-, interleukin (IL)-2- or IL-10-deficient state induced by intrinsic neutralizing antibodies. Clin Exp Immunol. 2009;155(1):65-71.
141. Ungaro R, Fukata M, Hsu D i sur. A novel Toll-like receptor 4 antagonist antibody ameliorates inflammation but impairs mucosal healing in murine colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009 Jun;296(6):G1167-79.
142. Cario E. Bacterial interactions with cells of intestinal mucosa:toll-like receptors and NOD2. Gut 2005;54:1182-93.
143. Abreu MT, Arnold ET, Thomas LS et al. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. J Biol Chem 2002; 277:20431-7.
144. Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumia MA et al. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in mouse gut. J Immunol 2003; 170:3977-85.
145. Faure E, Equils O, Sieling PA et al. Bacterial lipopolysaccharide activatesNF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) un cultured dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. J Bio Chem 2000; 275:11058-63.

146. Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H et al. prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I $\kappa$ B. *Science* 2000; 289:1560-3.
147. Otte JM, Podolsky DK. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286:G13-26.
148. Vara P, Youdim A, Thomas LS et al. Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2004; 173:5398-405.
149. Bashir ME, Louie S, Shi HN et al. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J Immunol* 2004; 172:6978-87.
150. Tulic MK, Fiset PO, Manoukian JJ et al. Role of toll-like receptor 4 in protection by bacterial lipopolysaccharide in the nasal mucosa of atopic children but not adults. *Lancet* 2004; 363:1689-97.
151. Cario E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: A decade later. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1583-97.
152. Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infect Immun* 2003;71:3503-17.
153. Erridge C, Duncan SH, Bereswill S, Heimesaat MM. The induction of colitis and ileitis in mice is associated with marked increases in intestinal concentrations of stimulants of TLRs 2,4, and 5. *PLoS ONE* 2010;5(2): e9125. doi:10.1371/journal.pone.0009125



154. Cario E. Therapeutic impact of Toll-like receptors on inflammatory bowel diseases: A multiple-edged sword. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(3): 411-21.
155. Rakoff-Nahoum S, Hao L, Medzhitov R. Role of Toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity* 2006;25:319-29
156. Shi D, Das J, Das G. Inflammatory bowel disease requires the interplay between innate and adaptive immune signals. *Cell Res* 2006;16:70-4.
157. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F et al. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptor is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118:229-241.
158. Rijniere A, Koster AS, Nijkamp FP, Kraneveld AD. TNF $\alpha$  is crucial for development of mast-cell dependent colitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291:G969-G976.
159. Sartor RB. The influence of normal microbial flora on the development of chronic mucosal inflammation. *Res Immunol*. 1997;148:567–576.
160. Beck PL, Rosenberg IM, Xavier RJ, Koh T, Wong JF, Podolsky DK. Transforming growth factor  $\beta$  mediates intestinal healing and susceptibility to injury in vitro and in vivo through epithelial cells
161. Reardon C, Wang A, , McKay DM. Transient local depletion of Foxp3+ regulatory T-cells during recovery from colitis via Fas/Fas ligand-induced death. *J Immunol* 2008;180:8316-8326.
162. Parnham MJ, Čulić O, Eraković V et al. Modulation of neutrophil and inflammation markers in chronic obstructive pulmonary disease by short-term azithromycin treatment. *Eur J Pharmacol* 2005; 517:132-143.

163. Smith PD et al. Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *J Immunol* 2001;167:2651-6.
164. Cerovic V, Jenkins CD, Barnes AG, et al. Hyporesponsiveness of intestinal dendritic cells to TLR stimulation is limited to TLR4. *J Immunol* 2009;182:2405-15.
165. Uematsu S et al. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat Immunol* 2006; 7:868-74.
166. Abreu MT et al. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277:20431-7. / Otte JM, Cario E, Podolsky DK. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2004;126:1054-70.
167. Ruemmele FM et al. Lipopolysaccharide modulation of normal enterocyte turnover by Toll-like receptors is mediated endogenously by tumor necrosis factor (alpha). *Gut* 2002; 51:842-8.
168. Fort MM et al. A synthetic TLR4 antagonist has antiinflammatory effects in two murine models of inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2005;174:6416-23.
169. Leaphart CL et al. A critical role of TLR4 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by modulating intestinal injury and repair. *J Immunol* 2007;179:4808-20.

170. Lavelle EC, Murphy C, O'Neill LAJ, Creagh EM. The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal Immunology* 2010;3(1):17-28.
171. Hill DA, Hoffmann C, ABT MC et al. Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis. *Mucosal Immunology* 2010;3(2): 148-58.
172. Rijnierse A, Koster AS, Nijkamp FP, Kraneveld AD. TNF $\alpha$  is crucial for development of mast-cell dependent colitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291:G969-G976.
173. Rijnierse A, Koster AS, Nijkamp FP, Kraneveld AD. Critical role for mast cells in pathogenesis of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced murine colonic hypersensitivity reaction. *J Immunol* 2006;176:4375-84.

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 20. veljače 1965. godine u Zagrebu gdje sam završila osnovno i srednjoškolsko obrazovanje. Na Medicinskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu diplomirala sam 1990. g. Obvezni staž obavila sam u KBC Rebro Zagreb. Državni ispit položila sam 1992. godine. Od 1992. do travnja 1995. radila sam u DZ Trešnjevka kao liječnik u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Od 1995 do 1998 g. radila sam u Istraživačkom Institutu "Pliva", laboratorij za probir antimikrobnih tvari. 1996 godine bile sam na stručnom usavršavanju u Hopitaux de Bordeaux, Laboratoire de Bacteriologie - Enfants (Prof.dr. Megraud) iz područja kultivacije, identifikacije i testiranja osjetljivosti *H. pylori*. Od 1998 do 2002 specijalizirala sam medicinsku mikrobiologiju u Klinici za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević". 2000. Godine bila sam na stručnom usavršavanju u University Hospital Hamburg-Eppendorf, Microbiology Laboratories. 2002 godine sam položila specijalistički ispit i obranila Magistarski rad pod naslovom „Učinak azitromicina na eksperimentalni kolitis u miševa”. Od 2002 do 2003 radila sam kao mikrobiolog istraživač u Pliva Istraživačkom Institutu. Od 2003 do 2005 bila sam voditelj Laboratorija za mikrobiologiju u Pliva Istraživačkom Institutu. Od 2005 do 2008 radila sam kao liječnik specijalist mikrobiolog u Klinici za infektivne bolesti „Dr Fran Mihaljević”. Od kraja 2008 radim kao liječnik specijalist mikrobiolog u Kliničkom Zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, KBC Zagreb. 2008 godine sam izabrana u nastavno zvanje predavača kao naslovno zvanje na Zdravstvenom Veleučilištu u Zagrebu. Autor sam i koautor 13 (od toga 6 CC/SCI) izvornih znanstvenih i stručnih radova te oko 20 kratkih kongresnih priopćenja. Član sam Hrvatskog liječničkog zbora i Hrvatske liječničke komore.