

Ekspresija prijenosnika uključenih u prijenos glukoze u gastrointestinalnom sustavu: SGLT1, GLUT2 i Na⁺/K⁺ ATP-aze u mišjem modelu upalnih bolesti crijeva

Čajević Glojnarić, Anesa

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:509148>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Anesa Čajević Glojnarić

**Ekspresija prijenosnika uključenih u prijenos
glukoze u gastrointestinalnom sustavu: SGLT1,
GLUT2 i Na⁺/K⁺ ATP-aze u mišjem modelu upalnih
bolesti crijeva**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakologija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na odjelu za in vivo farmakologiju i toksikologiju u Fidelti d.o.o. za istraživanje i razvoj u Zagrebu pod stručnim vodstvom dr. sc. Hrvoja Brzice iz Fidele i izv. prof. dr. sc. Lidije Bach-Rojecky sa Zavoda za farmakologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem Fidelti na pružanju mogućnosti izrade diplomskog rada te svima koji su u tome sudjelovali. Veliko hvala dr. sc. Hrvoju Brzici na uloženom trudu i vremenu te pomoći kad god je trebalo, tijekom radnog vremena i izvan. Hvala i izv. prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky, uvijek nasmijanoj i susretljivoj, na podršci pri izradi ovog diplomskog rada te posvećenosti i motivaciji koju sam dobila tijekom kolegija farmakologije.

Naposlijetku, zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci tijekom studija i svim prijateljima i kolegama koji su ovo petogodišnje razdoblje mog života učinili ljepšim i zabavnijim.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Upalne bolesti crijeva (eng. <i>inflammatory bowel diseases, IBD</i>)	3
1.1.1 Epidemiologija	3
1.1.2 Etiologija	5
1.1.2.1 Genetski čimbenici	5
1.1.2.2. Okolišni čimbenici	5
1.1.3 Patogeneza IBD-a	6
1.1.3.1 Imunoregulacijski defekti i izloženost patogenima	6
1.1.3.2. Defekti u funkciji barijere	7
1.1.3.3. Razlike u sastavu mikrobioma crijeva	7
1.1.4 Ulcerozni kolitis, ugljikohidrati i dijabetes	8
1.2 Animalni modeli IBD-a	10
1.2.1. DSS model kolitisa	11
1.3 Ekspresija prijenosnika monosaharida na membrani enterocita i prijenos glukoze preko crijeвне barijere	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Životinje	17
3.1.1 Identifikacija životinja	17
3.1.2 Briga o životinjama	17
3.1.3 Prehrana	17
3.1.4 Raspored životinja po grupama	18
3.2 Materijali	18
3.3 Plan izvođenja studije	19
3.3.1 Eksperimentalni postupci	20
3.3.2. Priprema formulacije i tretman	20
3.3.3 Dnevni postupci	20
3.4 Mjereni pokazatelji	22
3.5 Terminalni postupak	23
3.5.1 Priprema anestezije	23
3.5.2 Uzorkovanje	23
3.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test	24

3.6.1 ELISA – inzulin.....	24
3.6.2 ELISA – serumski amiloid A protein (SAA).....	25
3.6.3 ELISA – GLUT2.....	25
3.6.4 ELISA – SGLT1.....	26
3.6.5 ELISA – Na ⁺ /K ⁺ ATP-aza.....	27
3.7 Histološka obrada.....	27
3.8 Statistička obrada rezultata.....	29
3.9 Dobrobit životinja.....	29
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	30
4.1 Promjena tjelesne mase od dana 1 do dana 8.....	30
4.1.1 Promjena tjelesne mase.....	30
4.1.2 Udio promjene tjelesne mase.....	31
4.1.3 Ocjena promjene tjelesne mase.....	33
4.2 Ocjena kolorektalnog krvarenja od dana 1 do dana 8.....	35
4.3. Ocjena konzistencije stolice od dna 1 do dana 8.....	36
4.4. Indeks aktivnosti bolesti od dana 1 do dana 8.....	38
4.5 Histološka obrada.....	40
4.5.1 Nishitani ocjena u proksimalnom kolonu.....	40
4.5.2 Nishitani ocjena u distalnom kolonu.....	41
4.6 Duljina kolona na dan 8.....	42
4.7 Hematološki parametri.....	43
4.7.1 Crvena krvna slika.....	43
4.7.2 Bijela krvna slika.....	45
4.8 Glukoza.....	48
4.9 ELISA iz seruma – inzulin i serumski amiloid A protein.....	48
4.9.1 Inzulin.....	48
4.9.2 Serumski amiloid A protein.....	50
4.10 ELISA iz homogenata crijeva – GLUT 2, SGLT1, Na/K ATP-aza.....	51
4.10.1 GLUT2.....	51
4.10.2 SGLT1.....	53
4.10.3 Na/K ATP-aza.....	55
5. ZAKLJUČCI.....	58
6. LITERATURA.....	59

7. SAŽETAK/SUMMARY.....	68
7.1 Sažetak.....	68
7.2 Summary.....	69

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

POPIS KRATICA:

AIEC – *engl. adherent-invasive E. coli*

AJ – *engl. adherens junction* – adherentna veza

AMP – antimikrobni peptidi

ATG16L1 – *engl. autophagy related 16 like 1*

CD – *engl. Chron's disease*

DAI – *engl. disease activity index*

DSS – *engl. dextran sulfate sodium*

ELISA – *engl. enzyme-linked immunosorbent assay*

GLUT2 – *engl. glucose uniporter 2*

GLUT5 – *engl. glucose uniporter 5*

HERC2 – *engl. HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2*

HRP – *engl. horseradish peroxidase*

IBD – *engl. inflammatory bowel disease* – upalna bolest crijeva

IL10 – interleukin 10

IL26 – interleukin 26

IP – intraperitonealno

IRGM – *engl. immunity-related GTPase family M*

MC – metil celuloza

NF- κ B – *engl. nuclear factor kappa B*

NOD2 – *engl. nucleotide-binding oligomerization domain 2*

PAS – *engl. periodic acid-Schiff*

PO/QD – *lat. per os/quaque die*

PTPN2 – *engl. protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2*

SGLT1 – *engl. sodium-glucose linked transporter 1*

sIgA – sekretorni imunoglobulini

SIRT1 – sirtuin 1

SLC2 – *engl. solute carrier 2 family*

SLC5A – *engl. solute carrier family 5A*

SMAD3 – *engl. mothers against decapentaplegic homolog 3*

TAGAP – *engl. T-cell activation RhoGTPase activating protein*

TGF- β – *engl. transforming growth factor beta*

TJ – *engl. tight junction* – čvrsta veza

TNBS – 2,4,6-trinitrobenzen sulfonska kiselina

TNFAIP3 – *engl. TNF alpha induced protein 3*

TNF- α – *engl. tumor necrosis factor alpha*

1. UVOD

Ljudsko tijelo posjeduje mnogobrojne epitelne barijere koje predstavljaju granicu između okoliša i tijela. Gastrointestinalni sustav je jedna od površinom najvećih barijera, a funkcionalno i najvažnijih zbog uloge u regulaciji imunosnog sustava, a tako i zdravlja (Vancamelbeke i Vermeire, 2018; Helander i Fändriks, 2014). Mukoza probavnog sustava ima dodatnu i jedinstvenu ulogu u apsorpciji hranjivih tvari, prilikom čega mora ostati nepropusna za različite mikroorganizme koji iz okoliša dolaze u kontakt s organizmom putem hrane (Romero i sur., 2015). Regulacija sprječavanja prolaska određenih tvari, a propuštanjem drugih, ostvaruje se primarno anatomskim i fiziološkim osobitostima crijeva.

Mukozni sloj predstavlja prvu liniju obrane i sprječava izravan kontakt bakterija i crijevnog epitela (Turner, 2009), pri čemu je ovaj sloj u tankom crijevu jedinstven, a u debelom crijevu je dvostruk. Gornji mukozni sloj debelog crijeva je "rahli", nastanjen komenzalnim bakterijama, dok je donji sloj čvršći i nema bakterija. U mukusu se nalaze antimikrobni peptidi (AMP) i sekretorni imunoglobulini (sIgA) koji predstavljaju dodatnu liniju površinske obrane od bakterija (Johansson i Hansson, 2016; Pelaseyed i sur., 2014).

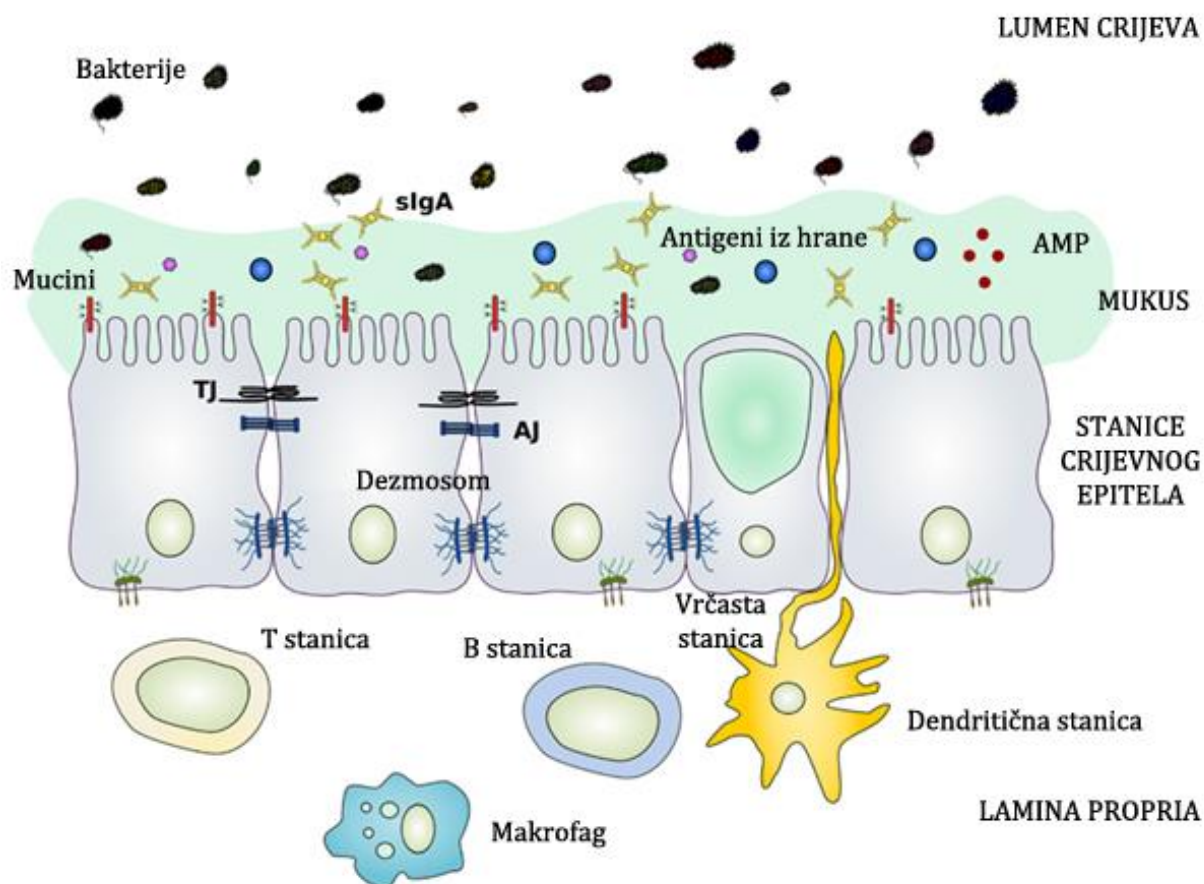
Ispod mukoznog sloja nalazi se sloj epitelnih stanica koji predstavlja najjaču fizikalnu barijeru prolaska tvari kroz crijeva. Epitelne stanice uz pomoć proteinskih kompleksa: čvrstih veza (*engl., tight junction, TJ*), adherentnih veza (*engl., adherens junction, AJ*) i dezmosoma, koji sudjeluju u povezivanju susjednih stanica, tvore neprekinutu barijeru koja je između ostalog nepropusna i za hidrofilne molekule. Za njihov prijenos stanice su opremljene specifičnim prijenosnim proteinima (Salim i Söderholm, 2011; Groschwitz i Hogan, 2009; Turner, 2009).

Sam epitelni sloj crijeva naliježe na laminu propriju – sloj rahlog vezivnog tkiva u kojem se nalaze stanice imunosnog sustava; T i B stanice te dendritičke stanice koje kao dio prirođenog i stečenog imunosnog sustava sudjeluju u obrambenim mehanizmima crijeвне barijere (Slika 1).

Ako dođe do poremećaja izlučivanja sluzi, oštećenja strukture epitelnog sloja ili dubljeg sloja lamine proprije dolazi i do narušavanja funkcije crijeva kao barijere.

Oštećenja crijeвне barijere su dovedene u vezu sa širokom lepezom bolesti, uključujući i celijakiju, upalnu bolest crijeva (*engl. Inflammatory bowel disease, IBD*), karcinom debelog crijeva, ali i bolesti drugih organskih sustava ili metaboličkih poremećaja kao šećerna bolest, gojaznost i kronična bolest jetre (ciroza). Sva navedena stanja su dovedena u vezu s

poremećajima u funkciji probavnog sustava, u sastavu crijevnne mikroflore i prolaska antigena kroz stijenku crijeva. Antigeni koji prolaze barijeru na ovaj način kod podložnih ljudi izazivaju lokalnu ili sistemsku nekontroliranu reakciju imunskog odgovora (Vancamelbeke i Vermeire, 2018; Turner 2009).



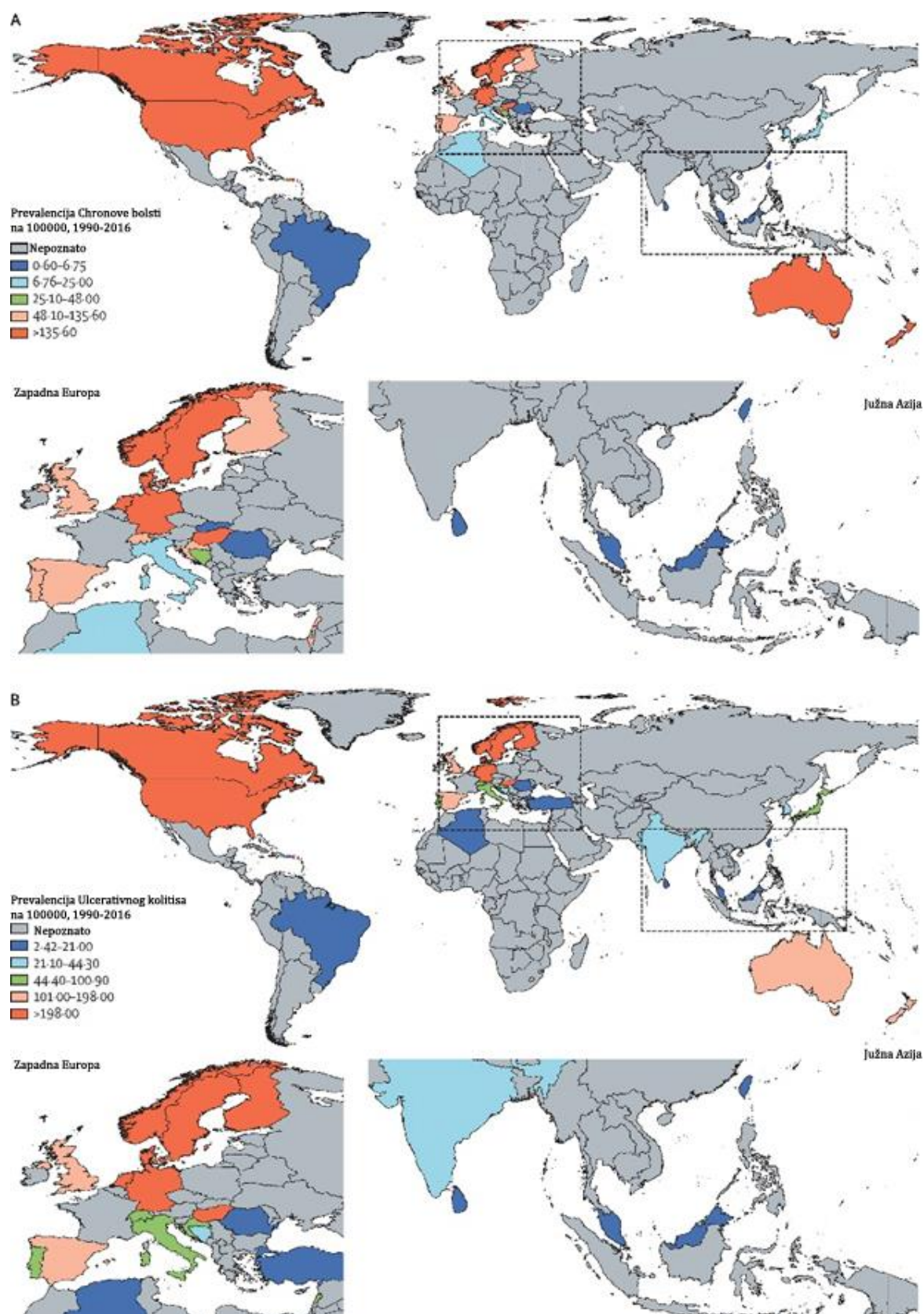
Slika 1 Prikaz crijevne stijenke s pripadajućim elementima koji čine crijevnu barijeru (TJ - čvrsta veza, AJ – adherentna veza) (preuzeto od Vancamelbeke i Vermeire, 2018)

1.1 Upalne bolesti crijeva (*eng. inflammatory bowel diseases, IBD*)

IBD je zajednički naziv za dvije upalne bolesti crijeva; Chronovu bolest i ulcerozni kolitis koje se razlikuju svojom etiologijom, razvojem i kliničkim simptomima i znakovima. Obje bolesti su kroničnog tijeka i karakterizirane su izmjenom faza kliničkog relapsa i remisije. Chronova bolest može zahvatiti bilo koji dio gastrointestinalnog trakta i prezentira se simptomima kao što su umor, dugotrajne dijareje s ili bez krvarenja, abdominalna bol, gubitak na težini i groznica, dok je ulcerozni kolitis uglavnom ograničen na sluznicu kolona, a simptomi su rektalno krvarenje, učestale stolice uz prisustvo sluzi i krvi, rektalne tenezme i bol u donjem dijelu abdomena. Kako se bolest u preko 25% slučajeva javi kod djece i adolescenata, drugi učestali simptomi koji prate samu IBD su odgođen pubertet, izostanak rasta, nuspojave lijekova i socijalna distanciranost (Wallace i sur., 2014; Szigethy, McLafferty i Goyal, 2010).

1.1.1 Epidemiologija

IBD je bolest koja oboljele osobe prati cijeli životni vijek, a incidencija i prevalencija IBD-a je različita u pojedinim regijama svijeta. Brojne studije su pokazale da je najveća zabilježena prevalencija IBD-a u Europi (ulcerozni kolitis 505 na 100 000 stanovnika u Norveškoj; Chronova bolest 322 na 100 000 stanovnika u Njemačkoj) i Sjevernoj Americi (ulcerozni kolitis 286 na 100 000 stanovnika u SAD-u; Chronova bolest 319 na 100 000 stanovnika u Kanadi). Prevalencija IBD-a prelazi 0,3% u Sjevernoj Americi, Oceaniji i mnogim europskim zemljama. Međutim, studije su pokazale kako je početkom 21. stoljeća incidencija u ovim područjima stabilna ili u padu, dok je od 1990-ih godina primijećen rast incidencije u novoindustrijaliziranim zemljama u Africi, Aziji i Južnoj Americi, poglavito u Brazilu (zabilježen godišnji rast od oko 13%) i Tajvanu (zabilježen godišnji rast od oko 4,5%) (Slika 2.) (Ng i sur., 2018; Ng i sur., 2013). Iako se autoimune bolesti u 8 od 10 slučajeva javljaju kod žena, IBD ne prati ovaj trend. Spolne razlike u incidenciji su poznate za Chronovu bolest, pri čemu se prevalencija među spolovima mijenja ovisno o životnoj dobi i zemljopisnoj lokaciji. Spolne razlike u incidenciji ulceroznog kolitisa nisu zabilježene (Greuter i sur., 2020).



Slika 2 Prevalencija Chronove bolesti i ulceroznog kolitisa u svijetu u razdoblju od 1990. do 2016. godine
(preuzeto od Ng i sur., 2018)

1.1.2 Etiologija

Točan uzrok IBD-a je još uvijek nepoznat. Epidemiološki podatci ukazuju na povezanost genetskih čimbenika, s utjecajem okolišnih čimbenika (antibiotici, hrana, različiti patogeni,...) na crijevni mikrobiom te u konačnici pretjeranog i abnormalnog imunološkog odgovora na komezalnu crijevnu floru (Catana i sur., 2015).

1.1.2.1 Genetski čimbenici

Epidemiološke i obiteljske studije pokazale su ovisnost podločnosti IBD-u o genetskim čimbenicima. Bolest je, međutim, kompleksna i ne može se objasniti utjecajem samo jednog gena. Smatra se da su Chronova bolest i ulcerozni kolitis heterogene poligenske bolesti koje dijele neke, ali ne sve lokuse odgovorne za podločnost razvoju bolesti (Satsangi i sur., 2003). Prvi gen koji je dokazano povezan s razvojem IBD-a je *NOD2* (engl. *nucleotide-binding oligomerization domain 2*) koji kodira za protein uključen u procese prirođenog imunskog sustava. Procijenjeno je da su defekti u *NOD2* genu odgovorni za oko 17 % do 27 % slučajeva Chronove bolesti pri čemu dendritičke stanice pacijenata s Chronovom bolesti imaju deficitarnu indukciju autofagije i smanjenu lokalizaciju bakterija u fagolizosomima (Hanauer, 2006).

Osim *NOD2*, pokazano je da varijante gena odgovorne za podločnost razvoju bolesti uključuju i gene povezane s autofagijom - *ATG16L1* i *IRGM*. Drugi geni, kao npr. za interleukin 23, PTPN2/Th17 put, TGF- β put (*SMAD3*) i gen za aktivaciju T-stanica (*TAGAP*) su dovedeni u vezu i s autoimunim bolestima ukazujući na još jedan aspekt patogeneze IBD-a (Wallace i sur., 2014). Iako je sa sigurnošću potvrđeno kako prisutnost ovih mutiranih gena povećava prirodnu sklonost IBD-u, to nije garancija da će pojedinac razviti IBD, što govori u prilog važnosti ostalih čimbenika (Abreu, 2002).

1.1.2.2 Okolišni čimbenici

Učestalost bolesti u razvijenijim zemljama te u gradovima veća je u odnosu na zemlje u razvoju i seoska područja. Trendovi porasta incidencije u zemljama koje bilježe brz razvoj u zadnja dva desetljeća ukazuju na utjecaj širenja tzv. zapadnjačkog stila života, odnosno povezani su s promjenama u prehrani, pušenjem, izloženosti raznim zagađivačima i industrijskim kemikalijama (Ng i sur., 2013; Sandler i Loftus, 2004).

Kako je izloženost infekcijama također jedan od čimbenika razvoja IBD-a, pokazalo se da je i stupanj higijenskih navika obrnuto proporcionalan s pojavnosti IBD-a. Smatra se da bolje higijenske navike mijenjaju crijevnu floru tako da smanjuju izloženost određenim bakterijama koje su bitne za zdravlje intestinalnog sustava (Hanauer, 2006).

Jedan od glavnih rizičnih čimbenika za razvoj IBD-a je konzumacija duhanskih proizvoda, posebice cigareta. Ova poveznica vrlo je kompleksna te se javljaju patofiziološki mehanizmi svojstveni svakoj od ove dvije bolesti zasebno. Mnoge studije pokazale su protektivni učinak pušenja na razvoj ulceroznog kolitisa (Hanauer, 2006). Rizik za pušače manji je od onoga za nepušače, no zanimljivo je kako bivši pušači imaju 1,7 puta veći rizik za razvoj ulceroznog kolitisa od pojedinaca koji nikad nisu pušili (Sandler i Loftus, 2004). Nasuprot tome, pušenje je značajan rizični čimbenik za razvoj Chronove bolesti. Pušači s Chronovom bolesti općenito imaju lošiji tijek bolesti, s većim rizikom za relaps i češćom potrebom za kirurškim intervencijama te većom dozom imunosupresivnih lijekova (Krishnan i Korzenik, 2002). Iznimka je Židovska populacija Izraela, kod koje nije primijećen utjecaj pušenja na veću incidenciju Chronove bolesti (Reif i sur., 1995).

1.1.3 Patogeneza IBD-a

1.1.3.1 Imunoregulacijski defekti i izloženost patogenima

IBD je karakteriziran poremećajima u imunoregulacijskim mehanizmima u mukozi, što se čini da je povezano s izloženosti patogenima. Literatura ukazuje na mnoge hipoteze o patogenezi poremećenog imunoregulacijskog mehanizma među kojima prednjače: disfunkcionalni imunološki odgovor na normalne komponente lumena crijeva, infekcije specifičnim patogenima i/ili defekti mukozne barijere prema luminalnim antigenima (Slika 3).

Normalan odnos komenzalnih bakterija i domaćina je simbiotski (Hanauer, 2006). Pretpostavlja se da izloženost komenzalnim bakterijama djeluje povoljno, regulacijom i blokadom aktivacije NF- κ B signalnog puta, čime se sprječava upalni odgovor crijeva na mikrobe i antigene hrane kojima smo konstantno izloženi (Podolsky, 2002). U IBD-u te inhibicije nema. Izloženost luminalnoj mikroflori dovodi do upalnog odgovora stanica koje

oblažu mukozu i dolazi do kroničnog, destruktivnog imunološkog odgovora (Neish i sur., 2000).

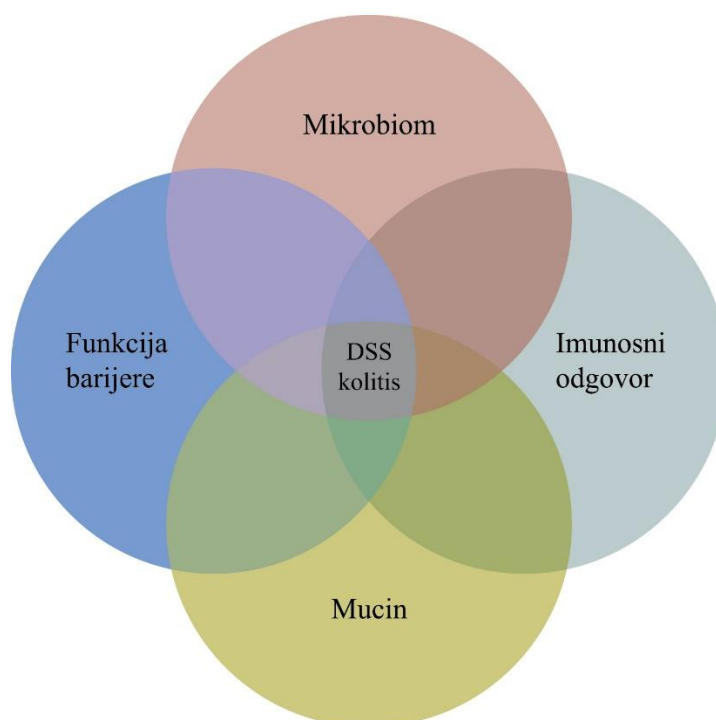
1.1.3.2 Defekti u funkciji barijere

Zdravi crijevni epitel, s visoko razvijenim čvrstim spojištem kod zdravih pojedinaca predstavlja učinkovitu barijeru protiv luminalnih mikroorganizama. IBD je povezan s povećanom permeabilnosti epitela crijeva što dovodi do prolaska mikroorganizma i njihovih toksina preko epitelne barijere i stalne stimulacije stečenog imunološkog odgovora mukoze. To uzrokuje izlučivanje različitih upalnih citokina koji smanjuju čvrsto spojište među endotelnim stanicama, što ima za posljedicu privlačenje neutrofila iz periferne krvi u mukozu. Pretpostavlja se da je to primarni defekt u oboljelih od IBD-a, a i studije na animalnim modelima pokazale su tendenciju razvoja teške upale u područjima crijeva čija je permeabilnost značajno povećana (Bouma i Strober, 2003).

1.1.3.3 Razlike u sastavu mikrobioma crijeva

Mnoge studije proučavale su mikrobiom crijeva pacijenata s Chronovom bolesti i ulceroznim kolitisom. U upaljenim, kao i u neupaljenim segmentima, nađena je značajno smanjena raznolikost mikroorganizama u usporedbi sa zdravim pojedincima. U zdravim crijevima prevladavaju bakterije roda *Firmicutes* i *Bacteroidetes phyla*, dok je u pacijenata s Chronovom bolesti primijećen relativni manjak ovih rodova, a povećana prisutnost enterobakterija. Nasuprot tome, u ulceroznom kolitisu nalazi se manjak *Clostridium spp.*, a povećana prisutnost *Escherichie coli*.

U zdravom kolonu nalazi se mukozni zaštitni pokrov koji se sastoji od dva sloja: vanjski, slabo prijanjajući sloj koji je pogodan za rast bakterija, te unutarnji, čvrsto prijanjajući sloj koji je u normalnim uvjetima sterilan. U IBD-u, posebice Chronovoj bolesti, prisutno je stalno povećanje udjela *E.coli* u mukoznom sloju ileuma i kolona te njezina prisutnost u upalnim granulomima podrazumijeva primarnu ulogu u patogenezi Chronove bolesti. Prijanjajući invazivni fenotip *E. coli* (AIEC) koji je nađen u Chronovoj bolesti karakterističan je za bakterijsku invaziju u epitelne stanice i replikaciju u makrofagima (Pelaseyed i sur., 2014; Zhang i Li, 2014). Također, pokazano je da AIEC potiču nastajanje granuloma in vitro, kao i in vivo u studiji na psima boxerima (Simpson i sur., 2006).



Slika 3 Interakcija čimbenika potrebnih za razvoj IBD-a. (preuzeto od Eichele i Kharbanda, 2017)

1.1.4 Ulcerozni kolitis, ugljikohidrati i dijabetes

U velikom broju slučajeva ulcerozni kolitis praćen je komorbiditetima, bolestima koje su uglavnom posljedica poremećenih imunoloških mehanizama, kao što su reumatoidni artritis, multipla skleroza, lupus, psorijaza, hipotireoidizam i diabetes mellitus (Bernstein, Wajda i Blanchard, 2005). Najčešća od ovih bolesti povezanih s ulceroznim kolitisom ipak je diabetes mellitus, što ima epidemiološke, kliničke i terapijske implikacije (Maconi i sur., 2014).

Studija koja je uključivala više od 1200 djece s IBD-om, pri čemu je 488 djece imalo ulcerozni kolitis, a 737 je imalo CD, pokazala je višu prevalenciju dijabetesa u djece s ulceroznim kolitisom u usporedbi s kontrolnom skupinom (OR = 2,7, 95 % CI: 1,1-6,6), odnosno sveukupnu prevalenciju od 2049 slučajeva na 100 000 djece. To je bilo specifično samo za ulcerozni kolitis, dok s druge strane, povezanost s Chronovom bolesti nije bila značajna (OR = 1,4, 95% CI: 0,5-4) (Kappelman i sur., 2011).

Zanimljiva je činjenica da pacijenti koji imaju IBD i psorijazu imaju značajno veći rizik razvoja dijabetesa (26,7 % prema 11,0 %), za razliku od pojedinaca koji imaju samo psorijazu (Binus i sur., 2012). U studiji koja je istraživala poznate lokuse odgovorne za podložnost IBD-u i dijabetesu tipa 1 (1689 pacijenata s Chronovom bolesti, 777 pacijenata s ulceroznim

kolitisom, 989 pacijenata s dijabetesom tipa 1 i 6197 zdravih pojedinaca u kontrolnoj skupini) identificirana su dva lokusa za ulcerozni kolitis (*HERC2* and *IL26*) i jedan za dijabetes (*TNFAIP3*) koji povezuju rizik za ove dvije bolesti (Wang i sur., 2010). Genetska povezanost ove dvije bolesti vidi se i u monogenom obliku dijabetesa s tipičnim karakteristikama dijabetesa tipa 1 (autoantitijela na β -stanice, nagli prestanak produkcije C-peptida i potreba za nadomještanjem inzulina), uz inzulinsku rezistenciju koja se javlja kao posljedica autosomno dominantne mutacije u *SIRT1* genu. Objavljen je slučaj obitelji koja je bila nositelj mutacije u *SIRT1* genu i svih 5 članova je razvilo autoimuni poremećaj – dijabetes tip 1 kod četiri člana obitelji i ulcerozni kolitis kod jednog (Biaison-Lauber i sur., 2013). *SIRT1* suprimira ekspresiju *TNF α* , a važno je da su obje bolesti snažno povezane s tim citokinom, a pokazalo se da terapija TNF antagonistima poboljšava stanje pacijenata oboljelih od obje bolesti (Yoshizaki i sur., 2010).

Osim genetske povezanosti, na učestalost javljanja dijabetesa kod pacijenata koji već boluju od IBD-a može utjecati i sama terapija IBD-a. Kako je IBD u osnovi poremećaj imunološkog odgovora (Eichele i Kharbanda, 2017; Neish i sur., 2000), kortikosteroidi predstavljaju lijek izbora za kontroliranje akutne bolesti. Malo je podataka o izravnoj povezanosti glukokortikoida i dijabetesa kod IBD pacijenata (Maconi i sur., 2014). Međutim, veliki broj studija pokazuje izravnu povezanost liječenja kortikosteroidima s hiperglikemijom (Clare i Thurby-Hay, 2009), ili čak s povišenim rizikom za razvoj dijabetesa (Maconi i sur., 2014; Blackburn, Hux i Madami, 2002.). Također, za glukokortikoide je poznato da izazivaju rezistenciju na inzulin (Capristo i sur., 1999), metaboličko stanje kod kojeg se inzulin iz različitih razloga slabije veže na receptor ili je sama ekspresija receptora niža, što rezultira kompenzatornom hiperinzulinemijom i hiperglikemijom (Wilcox, 2005).

Zanimljivo je da je sve veći broj studija koje ukazuju i na mogućnost da bi velike količine šećera u hrani mogle utjecati na razvoj IBD-a. Takozvana "zapadnjačka prehrana" (*engl. Western diet*) je bogata rafiniranim šećerima, umjetnim zaslađivačima i mastima, a dovedena je u izravnu vezu sa povećanom incidencijom IBD-a (Forbes i sur., 2017; Racine i sur., 2016) i s pogoršanjem simptoma (Eppinga i Peppelenbosch, 2016; Limdi, Aggarwal i McLaughlin, 2016). Međutim, nisu svi ugljikohidrati odgovorni za poticaj razvoja IBD-a jer se prehranom bogatom vlaknima mogu poništiti učinci jednostavnih i rafiniranih šećera na razvoj IBD-a (Racine i sur., 2016). Smatra se da je pozadina suprotnog učinka ova dva tipa ugljikohidrata na IBD u metaboliziranju dugolančanih ugljikohidrata u masne kiseline kratkog lanca od bakterijske mikroflore, jer je u stolici IBD pacijenata pronađena smanjena količina

masnih kiselina kratkog lanca (Takahashi i sur., 2016; Huda-Faujan i sur., 2010). Također je pokazano da kratkotrajna konzumacija veće količine šećera povećava broj bakterija koje mogu narušiti integritet mukoznog omotača (Khan i sur., 2020) i propusnost crijevne stijenke, dok je dodatak acetata u pitkoj vodi prije izlaganja hrani s visokim udjelom šećera pozitivno utjecao na propusnost crijevne stijenke umanjivši utjecaj jednostavnih ugljikohidrata (Laffin i sur., 2019).

1.2 Animalni modeli IBD-a

Animalni modeli IBD-a (Tablica 1) predstavljaju koristan alat za karakterizaciju osnovnih mehanizama ovih bolesti, identificiranja novih potencijalnih terapijskih meta i testiranje novih lijekova. Razvijeni su raznoliki modeli za proučavanje IBD-a s različitim načinima indukcije bolesti: spontano ili prirođeno, kemijski, uz pomoć mikroorganizma, prijenosom imunskih stanica, te s isključenim genima koji su dovedeni u vezu s razvojem bolesti (tablica 1). Ni jedan od ovih modela u cijelosti ne može reproducirati složenu kliničku sliku i histopatološke promjene prisutne kod IBD-a u ljudi, ali koristeći navedene modele može se približiti određenim karakteristikama ljudske bolesti u većoj ili manjoj mjeri pri čemu se dobije uvid u osnovne principe patogeneze IBD-a. Prema tome, ovisno o cilju i aspektu istraživanja treba se odabrati optimalan model (Eichele i Kharbanda, 2017).

Modeli koji uključuju kemijsku indukciju kolitisa korištenjem dekstran natrij sulfata (DSS) ili 2,4,6-tri-nitro-benzen-sulfonske kiseline (TNBS) najčešće su korišteni modeli, zbog njihove brzine i jednostavnosti induciranja upalnog odgovora. *Helicobacter bilis* inducirani kolitis u MDR1a^{-/-} i IL-10^{-/-} knockout miševa korisni su modeli za ispitivanje defekata u funkciji intestinalnih epitelnih stanica. Modeli adoptivnog transfera bolje prikazuju ulogu T stanica u razvoju IBD-a. Ovi modeli korišteni su rjeđe, no unatoč tome što su dugotrajniji i zahtijevaju veći broj životinja, bolje prikazuju kroničnu upalu kakvu nalazimo u ljudi s IBD-om (Bang i Lichtenberger, 2016).

Tablica 1 Pregled animalnih modela za IBD (preuzeto od Bang i Lichtenberger 2016)

SPONTANI	KEMIJSKI INDUCIRANI	BAKTERIJSKI INDUCIRANI	ADOPTIVNI TRANSFER	TRANSGENIČNI	KNOCKOUT
C3H/HeJBir	DSS	Salmonella	CD45RB ^{hi} →SCID	HLA-B27	IL-10 ^{-/-}
Cotton top tamarin	TNBS (DNBS)	Adherentno invazivni	BMC→CD3 ϵ Tg ϵ 26	STAT-4	TGF- β ^{-/-}
SAMP1/Yit	Oksazolon	E.coli	Hsp60 specific CD8 ⁺ cells→TCR β ^{-/-}	N-cadherin	IL-2 ^{-/-}
	Octena kiselina			IL-7 Tg	NOD2 ^{-/-}
	Karagenan			HSV tirozin kinaza	A20 ^{-/-}
	Indometacin				MDR1a ^{-/-}
	Jodoacetamid				IL-23 ^{-/-}
					XBPI ^{-/-}
					NEMO ^{-/-}

TNBS - 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid; DNBS - 2,4-dinitrobenzene sulfonic acid; SCID - severe combined immune deficiency disease; STAT - signal transducers and activating transcription; BMC - bone marrow cells; HSP - heat shock protein; HSV - herpes simplex virus.

1.2.1 DSS model kolitisa

Primjena dekstran natrij sulfata (DSS), supstance koja izaziva kolitis s antikoagulacijskim svojstvima, u vodu za piće C57BL/6 miševa jedan je od najkorištenijih pristupa za induciranje IBD-a. Ovaj model prvi puta su opisali Okayasu i suradnici (1990). Prednosti ovog modela su jednostavnost, niža stopa smrtnosti u usporedbi s modelom kolitisa izazvanog TNBS-om i jasno definiran tijek bolesti koji se da jednostavno kontrolirati, za razliku od nekih spontanijih modela u genetski modificiranih miševa (Eichele i Kharbanda, 2017; Melgar i sur., 2008). DSS sam po sebi ne izaziva upalu, već predstavlja izravni toksin za crijevni epitel. Tijekom trajanja pokusa, epitel kolona erodira, omogućavajući bakterijama, bakterijskim produktima i ostalim antigenima iz hrane prodiranje u mukozu, čime se potiče upala. Za izazivanje kolitisa se koristi isključivo DSS molekularne težine od 40-50 kDa jer ostale molekularne težine nisu u stanju

proći kroz mukoznu barijeru do crijevnog epitela i ne izazivaju oštećenja, a samim tim i ne dolazi do upale. DSS model je posebno praktičan jer se manipulacijom koncentracije DSS i režima primjene može postići akutni, kronični ili recidivirajući tijek upale (Bang i Lichtenberger, 2016; Chassaing i sur., 2014). Od laboratorijskih glodavaca najčešće se koriste miševi, češće mužjaci, i to sojeva osjetljivih na DSS; C57BL/6, BALB/C i C3H/HeJ koji se izlažu 1,5% - 3% DSS-u kroz razdoblje od 6 do 10 dana. Kronicitet se postiže izmjenjujućim ciklusima izloženosti i bez izloženosti DSS-a kroz razdoblje od nekoliko tjedana. U tom periodu razvijaju se simptomi čiji intenzitet raste sukladno duljini vremena izloženosti DSS-u; dijareja i krv u stolici te gubitak na težini (Eichele i Kharbanda, 2017; Kiesler, Fuss i Strober, 2015; Randhawa i sur., 2014; Wirtz i sur., 2007). Uz miševe, i štakori, posebice soj Sprague-Dawley, predstavljaju prikladnu vrstu za ovaj model (Martin, Beriou i Josien, 2016; Randhawa i sur., 2014; Gaudio i sur., 1999).

Patohistološke promjene postaju vidljive već i nakon jednog dana izloženosti DSS-u. Dolazi do promjene u ekspresiji TJ proteina okcludina, kladina u zonuli occludens. Ova promjena je sukladna nastupu bolesti kod ljudi za koju se smatra da je osnova sindroma propusnog crijeva i prolaska antigena u dublje strukture crijeвне stijenke. Početna blaga dijareja s pojačanjem propusnosti stijenke postaje sve intenzivniji, javlja se krvarenje, a može doći i do uginuća. Intenzivnije histološke promjene se očituju u gubitku vrčastih stanica i mucina, erozije epitela, ulceracije i infiltracije granulocita u laminu propriu i submukozu. Kod kronične izloženosti DSS-u dolazi do poremećaja u strukturi kripti, proširenje prostora između mišićnog sloja i baze kripti, limfocitoze i apscesa, što odgovara patološkim promjenama kod ljudi (Chassaing i sur., 2014; Perše i Cerar, 2012). Produžena izloženost DSS-u može dovesti i do razvoja adenokarcinoma.

Prilikom postavljanja protokola studije dobro je imati na umu da, za razliku od IBD-a kod ljudi, za razvoj bolesti u ovom modelu nisu potrebne T i B stanice – nositelji stečene imunosti, pa je model izrazito pogodan za istraživanje uključenosti prirodnog imuniteta. Ovdje posebnu ulogu imaju SCID i RAG-KO sojevi miševa koje karakterizira isključenje stečenog imuniteta (Chassaing i sur., 2014).

1.3 Ekspresija prijenosnika monosaharida na membrani enterocita i prijenos glukoze preko crijevne barijere

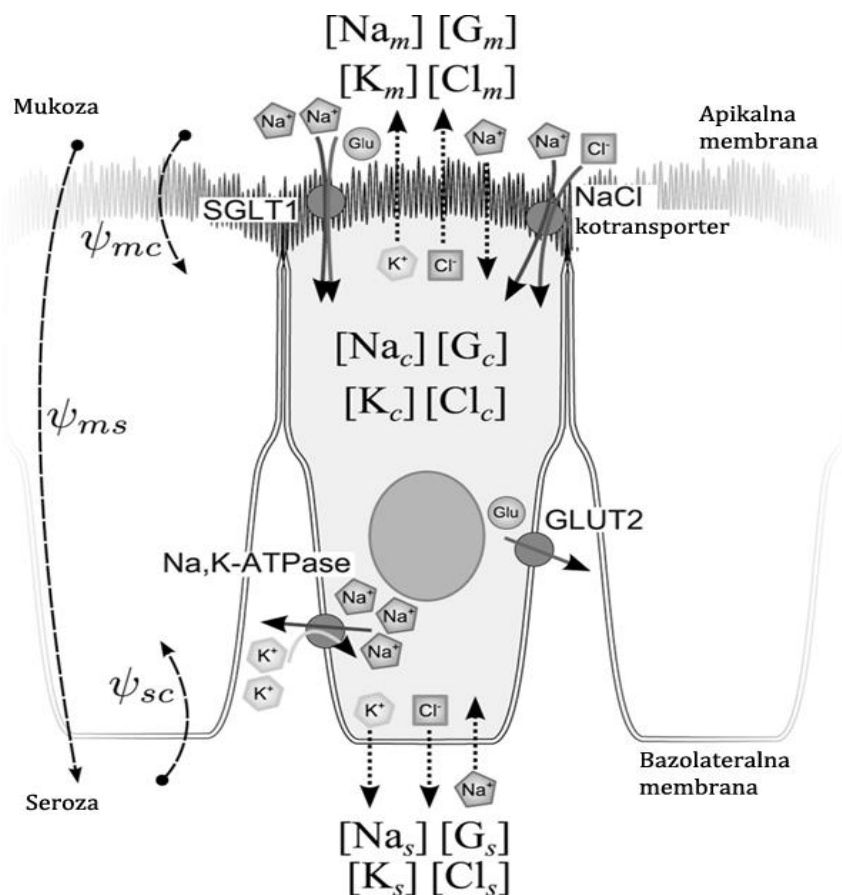
Prijenos monosaharida preko stanične membrane posredovan je dvjema porodicama staničnih prijenosnika. Prva porodica, SLC2 (*engl., solute carrier 2 family*) kod ljudi uključuje 14 izoformi od kojih sve mogu prenositi heksoze i poliole, a prvih pet je najdetaljnije istraženo i one su uključene u prijenos glukoze i fruktoze neovisno o natriju. Od spomenutih 14 izoformi glukozni uniporter 2 (*engl., glucose uniporter 2, GLUT2*) i glukozni uniporter 5 (*GLUT5*) su aktivno uključeni u prijenos monosaharida kroz stijenku crijeva kod ljudi i laboratorijskih glodavaca (Mueckler i Thorens, 2013; Drozdowski i Thomson, 2006).

GLUT2 je prijenosnik niskog afiniteta, ali visokog kapaciteta za glukozu ($K_m \sim 17\text{mM}$) koji je eksprimiran na bazolateralnoj membrani crijeva i to prvenstveno u tankom crijevu gdje se i odvija najveći udio apsorpcije glukoze upravo posredstvom ovog prijenosnika (Drozdowski i Thomson, 2006). Osim u probavnom sustavu, eksprimiran je u jetri, bubrezima, β -stanicama gušterače, neuronima, astrocitima i tancitima (Thorens, 2014). U crijevima, prilikom prijenosa glukoze iz stanice u međustanični prostor potpomognutom difuzijom, GLUT2 igra ulogu proteina nosača. Osim glukoze, GLUT2 je u mogućnosti sudjelovati u prijenosu s niskim afinitetom D-galaktoze ($K_m \sim 92\text{ mM}$) i fruktoze ($K_m \sim 92\text{ mM}$) te D-glukozamina s visokim afinitetom ($K_m \sim 0.08\text{ mM}$). Zanimljiva je činjenica da se ekspresija GLUT2 prijenosnika može očitovati na suprotnom, apikalnom kraju stanice kada se u lumenu crijeva nalazi izrazito velika koncentracija glukoze, pri čemu je navedena translokacija prijenosnika mehanizam maksimizacije apsorpcije glukoze (Koepsell 2020; Mueckler i Thorens, 2013).

Druga porodica kod ljudi uključuje 11 izoformi kodiranih *SLC5A* (*engl., solute carrier family 5A*) genima. Prijenosnici ove porodice su koprijenosnici, što znači da za svoje funkcioniranje moraju imati dva supstrata; u ovom slučaju natrij i glukozu (Drozdowski i Thomson, 2006, Wright i Turk, 2004). Prijenosnik glukoze ovisan o natriju (*engl., sodium-glucose linked transporter 1, SGLT1*) je najvažniji član ove porodice koji je eksprimiran u probavnom sustavu, pri čemu je ekspresija najviša u jejunumu. Osim u probavnom sustavu, nalazi se još i u bubrezima, zaušnoj, podviličnoj i podjezičnoj žlijezdi, prostati, jeziku, očima, gušterači, plućima i u maternici (Madunić i sur., 2017). Suprotno od prijenosnika GLUT2, SGLT1 ima visoki afinitet te niski kapacitet za glukozu, a prvenstveno je eksprimiran na apikalnom kraju stanice i odgovoran je za apsorpciju glukoze iz lumena crijeva u stanicu (Baud i sur., 2016; Wright i Turk, 2004).

Osim GLUT2 i SGLT1, koji izravno sudjeluju u prijenosu glukoze kroz enterocite, u tom prijenosu neizravno sudjeluje i treći prijenosnik čija je funkcija pribavljanja dovoljno iona natrija kako bi se neometano odvijao prijenos glukoze. Natrij-kalij pumpa (Na^+/K^+ ATP-aza) je transmembranski protein koji uz prijenos natrija i kalija regulira neuralnu signalizaciju, homeostazu iona i mišićnu kontrakciju (Thorseni sur., 2014; Wang i O'Doherty, 2012).

Prijenos glukoze je omogućen gradijentom natrija kojeg održava natrij-kalij pumpa na bazolateranoj membrani enterocita izbacujući tri atoma natrija u međustanični prostor pri čemu u enterocit unosi dva atoma kalija (Slika 4). Na suprotnom, apikalnom kraju enterocita, SGLT1 nadoknađuje 2 atoma natrija pri čemu simultano unosi i jednu molekulu glukoze iz lumena crijeva u enterocit. Dodatni atom natrija, potreban da se nadoknade izgubljena tri na bazolateralnoj membrani, unosi se uz pomoć natrij kloridnog kotransportera. U konačnici molekula glukoze olakšanom difuzijom izlazi iz enterocita u međustanični prostor. Ioni također difundiraju kroz ionske kanale u staničnoj membrani, a moguć je i prolaz kroz međustanične prostore (Thorseni sur., 2014).



Slika 4 Prijenos glukoze kroz enterocit (preuzeto od Thorseni sur., 2014)

U literaturi su dostupni podaci o aktivnosti prijenosnika monosaharida u poremećajima koji mogu voditi IBD-u ili se javljaju simultano s upalnom bolesti crijeva pa je tako translokacija GLUT2 kod velikih koncentracija glukoze u lumenu crijeva (Mueckler i Thorens, 2013) inhibirana inzulinom. Kod rezistencije na inzulin, inhibitorni učinak izostaje, što bi moglo doprinosti povećanoj apsorpciji glukoze (Tobin i sur., 2008). Apikalna ekspresija GLUT2 je također opisana i u debelom crijevu pacijenata koji imaju IBD, no ne navodi se jesu li pacijenti rezistentni na inzulin ili kakav im je dijabetički status (Merigio i sur., 2018). Međutim, Dyer i sur. (2002) navode da su kod dijabetičkih pacijenata povećane ekspresije SGLT1, GLUT2 i GLUT5 prijenosnika na stijenci crijeva. Dokazano je i da isključenje GLUT2 kod miševa vodi k stanju sličnom restrikciji kalorija, pri čemu dolazi do promjene sastava bakterijske mikroflore i poboljšanja upalnog statusa kod miševa kojima je isključen gen (Schmitt i sur., 2017).

Također, dokazana je povećana ekspresija koprijenosnika SGLT1 u duodenumu i ileumu kod akutnog i kroničnog kolitisa izazvanog DSS-om, a postoje i naznake promjene ekspresije GLUT2 prijenosnika (Park i sur., 2019), međutim nema dokaza o ekspresiji navedenih proteina u najvećem segmentu crijeva – jejunumu i onom najvažnijem za IBD – kolonu.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Iz pregleda literature jasno je vidljiva povezanost metabolizma ugljikohidrata, IBD-a i šećerne bolesti. Također, očita je i uloga prijenosnika monosaharida kod navedenih stanja. Iako postoje radovi koji potvrđuju promjenu ekspresije prijenosnika monosaharida u određenim segmentima crijeva prilikom kolitisa izazvanog DSS-om, ne postoji potpuna slika ekspresije prijenosnika uključenih u prijenos monosaharida – SGLT1, Na^+/K^+ ATP-aze i GLUT2 kroz stijenku crijeva u svim njihovim segmentima.

Cilj ovog rada je utvrditi ekspresiju prijenosnika uključenih u prijenos glukoze u gastrointestinalnom sustavu; natrij-glukoza kotransportera 1 (SGLT1), glukoznog transportera 2 (GLUT2) i natrij-kalij ATP-aze (Na^+/K^+ ATP-aze) u mišjem DSS modelu mjerenjem proteina u stijenci crijeva koristeći Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test. Osim toga, promatrat će se i utjecaj farmakološkog standarda na ekspresiju navedenih transportera.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Životinje

3.1.1 Identifikacija životinja

- Vrsta: miš
- Soj: C57BL/6
- Spol: muški
- Porijeklo životinja: Charles River, Njemačka
- Dob: 8 tjedana pri dolasku
- Tjelesna težina: ~ 20-25 g pri dolasku
- Identifikacija: 1 – 54
- Broj grupa: 3
- Datum dolaska: 30.10.2019.

3.1.2 Briga o životinjama

Aklimacijski period: Minimalno 5 dana

Smještaj: Kavezi s čvrstim podom (TECNIPLAST kavezi, tip III, materijal polisulfonat, površine 425 mm x 266 mm x 185 mm). U pojedinačnom kavezu bilo je smješteno 10 životinja. Unutrašnjost kaveza u kojima borave miševi obogaćaje se dodatkom materijala za izradu ležišta; na debelom sloju stelje od mljevenog klipa kukuruza debljine do 4 cm, uz dodatak papirnatog GLP certificiranog skloništa i drvenog prutića za glodanje.

Sobna temperatura: $22^{\circ}\text{C} \pm 2$

Relativna vlažnost zraka: $55 \pm 10 \%$

Izmjena zraka: 15 - 20 puta po satu

Ciklus svjetla i tame: 12 sati svjetla (7:00 do 19:00 h), 12 sati tame

3.1.3 Prehrana

Hrana: peleti za glodavce *ad libitum* (SDS VRF 1 (P), Charles River, UK)

Voda: voda za piće iz slavine (boce TECNIPLAST S.p.A. Italy) *ad libitum*.

3.1.4 Raspored životinja po grupama

Dan prije početka pokusa sve životinje su nasumice raspoređene u grupe prema tjelesnoj težini, kao što je navedeno u tablici 2. Svaki kavez imao je oznaku na kojoj je bilo čitljivo ispisano: broja pokusa, broja kaveza i životinja te vrstu aplikacije i vrijeme uzorkovanja. Životinje su raspoređene u tri grupe:

1. kontrolna grupa nosača (0,5 % metil celuloza) u kojoj su se nalazile životinje koje su za vrijeme pokusa dobivale vodu;

2. grupa nosača (0,5 % metil celuloza) u kojoj su se nalazile životinje kojima je za vrijeme pokusa izazivan kolitis s 3% DSS-om;

3. grupa tretirana referentnim spojem - ciklosporinom A (80 mg/kg/PO/QD) otopljenim u nosaču (0,5 % metil celuloza), a kojima je za vrijeme pokusa izazivan kolitis s 3 % DSS-om.

3.2 Materijali

U pokusu su korištene sljedeće kemikalije i drugi materijali:

- Xylazine 2% (2 mg/mL), Alfasan International B.V., Woerden, Nizozemska
- Narkamon (100 mg/mL ketamine chloride), Bioveta, a.s., Republika Češka
- Kolliphor HS 15; Sigma-Aldrich, 42966-1KG, Njemačka
- Methyl cellulose (MC), Sigma Aldrich, M0262-500g, Njemačka
- Dextran sulfate sodium salt reagent grade: MP Biomedicals, cat.no. 160110 (36-50 kDa), Kanada
- Aqua pro injection, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu
- Shandon Formal-Fixx-10 % Neutral Buffered Formalin, Thermo Fisher Scientific, (Cat. No.9990244), SAD
- Neoral-Sandimmun – Cyclosporine, LOT: ADP445249, Novartis, Belgija
- Sigmafast, protease inhibitor tablets, EDTA-Free, Sigma-Aldrich, S8830, Njemačka
- Mouse Insulin ELISA kit, cat no. MBS038565, MyBioSource, SAD
- Mouse Serum Amyloid A (SAA) ELISA kit, cat no. MBS776916, MyBioSource, SAD
- Mouse Sodium/Glucose Cotransporter 1 (SGLT1) ELISA kit, cat no. MBS750205, MyBioSource, SAD

- Mouse Glucose Transporter 2 (GLUT2) ELISA kit, cat no. MBS728429, MyBioSource, SAD
- Mouse Na-K-ATPase ELISA kit, cat no. MBS3806693, MyBioSource, SAD
- Perjodna kiselina, Cat. No. 100524, MERCK, Njemačka
- Schiffov reagens, Cat. No. 109033, MERCK, Njemačka
- Kalijev Metabisulfit, Cat. No. 105057, MERCK, Njemačka
- 100% Etanol, Cat. No. 100983, MERCK, Njemačka
- 96% Etanol, Cat. No. 100971, MERCK, Njemačka
- Xylol, Cat. No. 108681, MERCK, Njemačka
- Cytoseal XYL, Cat. No. 8312, Thermo Fisher Scientific, SAD

3.3. Plan izvođenja pokusa

Tablica 2 Plan izvođenja pokusa

Grupa	Broj životinje	Upalni poticaj Dan 1-dan 7	Referentni spoj Dan 1-dan 7	Doza i način administracije	Bolus glukoze	Terminalni postupci Dan 8 (uzorkovanje)
1	1-14	Voda	0,5% metil celuloza (MC)	-	2 g/kg	• Ocjena konzistencije stolice • Ocjena fekalnog krvarenja • Tjelesna masa • Indeks aktivnosti bolesti (ukupna ocjena)
2	15-34	DSS 3% u vodi za piće	0,5% metil celuloza (MC)	-	2 g/kg	• Duljina kolona • Težina kolona • Omjer duljine i težine kolona • Hematologija • SGLT1, GLUT2, Na^+/K^+ ATP-aza, inzulin i amiloid A protein (ELISA)
3	35-54		Ciklosporin A 0,5% metil celuloza (MC)	80 mg/kg QD/PO	-	• Histopatologija (Nishitani ocjena)

3.3.1 Eksperimentalni postupci

DSS prah je otopljen u vodi za piće (3 g DSS 36-50 kDa u 100 mL vode za piće za 3 % otopinu) te miješan magnetskom miješalicom na sobnoj temperaturi dok nije postignuta bezbojna otopina. Otopina je priređivana svakodnevno kroz 7 dana. Životinje u grupi 1 dobivale su samo vodu. Sve grupe imale su slobodan pristup vodi (ili DSS otopini).

3.3.2 Priprema formulacije i tretman

S tretmanom se počelo prvog dana i trajao je do sedmog dana studije.

Priprema referentnog spoja ciklosporina A:

- Ciklosporin A pripremljen je miješanjem 320 µl komercijalne otopine ciklosporina A (100 mg/kg) s 3680 µl 0,5% metil celuloze (MC) kako bi se postigla konačna koncentracija od 8 mg/mL. Volumen administracije bio je 10 mL/kg. Ciklosporin je pomoću intragastrične sonde administriran neanesteziranim životinjama u grupi 5 i 6 u koncentraciji od 80 mg/kg per os (PO) jednom dnevno. Prije svakog doziranja pripremljena je svježa otopina ciklosporina.

3.3.3 Dnevni postupci

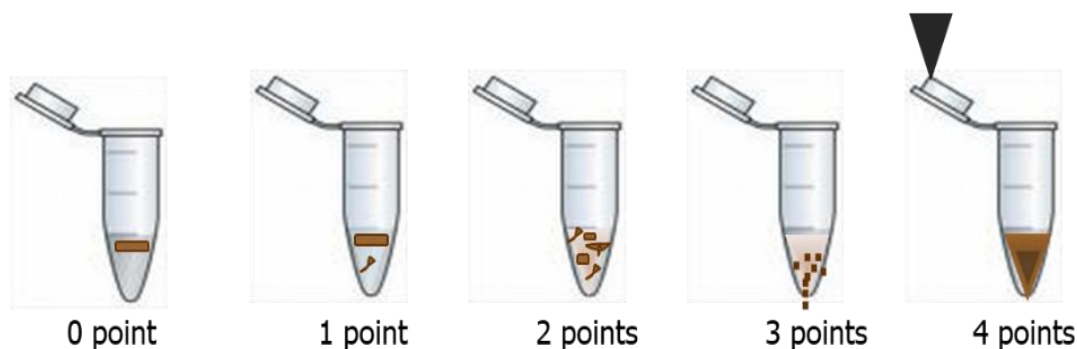
Prije početka eksperimenta, životinje su nasumično raspoređene u grupe kako bi se ujednačile srednje vrijednosti tjelesnih masa među grupama i eliminirale životinje koje su preteške ili prelagane. Kroz vrijeme trajanja eksperimenta, životinje su vagane svakodnevno, počevši s prvim danom, prije prvog DSS upalnog poticaja. Postotak promjene tjelesne mase računat je svakog dana, kako bi se osiguralo da životinje ne gube previše na tjelesnoj masi.

Utvrđivanje indeksa aktivnosti bolesti (engl. Disease Activity Index, DAI):

Kako bi se procijenio stupanj kolitisa, svakog dana se računao DAI, kao skupna ocjena tri parametra: a) gubitka na masi b) konzistencije stolice i c) kolorektalnog krvarenja. Maksimalna skupna ocjena je 12. Početna klinička ocjena procijenjena je prvog dana i ocjenjivanje se provodilo svakodnevno do kraja studije.

- a) Životinje su vagane svakodnevno, počevši s prvim danom, prije prvog DSS upalnog poticaja. Postotak promjene tjelesne mase računao se prema formuli: $[(\text{težina na dan X} - \text{početna težina}) / \text{početna težina}] \times 100$
- b) Uzorci stolice prikupljeni su svakodnevno. Uzorci su stavljani u Eppendorf tubice zapremine 2 mL u kojima je bio 1 mL vode i vorteksirani na maksimalnoj brzini 3-5 sekundi. Ocjenjivanje konzistencije stolice provodilo se na sljedeći način: ocjena 0 za čvrsto formiranu stolicu, ocjena 1 za formiranu, ali meku stolicu, ocjena 2 za meku i slabo formiranu stolicu, ocjena 3 za polutekuću stolicu i ocjena 4 za potpuno tekuću stolicu. Slikovni prikaz ocjenjivanja konzistencije stolice prikazan je na slici 5.
- c) Kolorektalno krvarenje ocjenjeno je ocjenom 0 ako nije bilo vidljivih tragova krvi oko analnog područja, ocjenom 2 ako je bilo male količine vidljivih tragova krvi ili ugrušaka oko analnog područja i ocjenom 4 ako je prisutno jako krvarenje i vidljivi tragovi krvi oko analnog područja.

Ocjene promjene tjelesne mase izražene pomoću brojeva od 1 do 4 te ocjene konzistencije stolice i kolorektalnog krvarenja prikazane su u tablici 4.



Slika 5 Slikovni prikaz ocjenjivanja konzistencije stolice

Tablica 3 Indeks aktivnosti bolesti (DAI)

Gubitak tjelesne mase (%)	Ocjena	Konzistencija stolice	Ocjena	Kolorektalno krvarenje	Ocjena
<1%	0	Formirana i čvrsta	0	Odsutno	0
1-5%	1	Formirana i meka	1		
6-10%	2	Meka i slabo formirana	2	Prisutno	2
11-15%	3	Polutekuća	3		
>15%	4	Tekuća	4	Jako	4

3.4 Mjereni pokazatelji

- Ocjena konzistencije stolice
- Ocjena fekalnog krvarenja
- Tjelesna masa
- Indeks aktivnosti bolesti (skupna ocjena)
- Duljina kolona
- Hematologija
- Glukoza
- SGLT1, GLUT2, Na⁺/K⁺ ATP-aza, inzulin i serumski amiloid A protein (ELISA)
- Histopatologija (Nishitani ocjena)

3.5 Terminalni postupak

3.5.1 Priprema anestezije

Životinje su anestezirane prikladnom dozom anestetika ketamina/ksilazina (80 mg/kg/ 16 mg/kg/intraperitonealno (IP)) koja dovodi do dubokog sna i miorelaksacije.

- Radna otopina
 - 1 mL ketamina (Narkamon)
 - 0,2 mL ksalazina
 - 9 mL fiziološke otopine

3.5.2 Uzorkovanje

Na dan testiranja, svim životinjama je oduzeta hrana 6 sati prije testa, a imale su slobodan pristup vodi za piće. U prethodno definiranim vremenskim točkama, koncentracija glukoze mjerena je ACCU-CHEK performa glukometrom (Roche Diagnostic GmbH) i izražena u mmol/L s granicom detekcije 35 mmol/L.

Glukoza je mjerena u sljedećim vremenskim točkama: 0' (neposredno prije davanja D-glukoze) i 30', 60' te 180' nakon davanja D-glukoze (2 g/kg) intragastričnom sondom.

Prije žrtvovanja, miševima je intraperitonealno (IP) administrirana anestezija, kombinacija ketamina i ksalazina.

Krv se skupljala krvarenjem jugularne vene. Za skupljanje krvi korištene su epruvete za serum koje sadrže inhibitore proteaza (Sigmafast – 62 µL na 0.5 mL krvi), nakon čega su ostavljene 30 minuta kako bi se krv spontano zgrušala. Sljedeći korak je centrifugiranje uzoraka krvi 15 minuta na 3500 rpm i temperaturi 21 – 22°C. Nastali serum odvojeni su i alikvotirani u polipropilenske epruvete. Alikvoti seruma zamrznuti su na -20°C za daljnje biokemijske analize (inzulin i serumski amiloid A protein). Mali volumen pune krvi (250 µL) skupljen je u epruvete s K₂-EDTA za hematološke analize koje su provedene odmah po uzorkovanju na automatiziranom hematološkom analizatoru Sysmex XT-2000iV.

Nakon uzorkovanja krvi, otvorena je peritonealna šupljina i izvađena su crijeva. Tanko i debelo crijevo mjerilo se ravnalom, od želuca do cekuma (tanko crijevo) i od cekuma do anusa (debelo crijevo), pri čemu se duljina cekuma izostavljala, i izmjerene vrijednosti su se unosili u tablicu. Crijeva su isprana ledenom fiziološkom otopinom i potom vagana.

Za histološku obradu, uzeta su 3 transverzalno odrezana uzorka duljine 4-5 mm svakog od pet dijelova crijeva (duodenum, jejunum, ileum, proksimalni i distalni kolon).

Mali dio preostalih segmenata crijeva (30 - 60 mg) pohranjen je na -80°C za daljnju analizu ELISA metodom koja će se provoditi za SGLT1, GLUT2 i Na⁺/K⁺ ATP-azu.

3.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test

3.6.1 ELISA – inzulin

Za kvantitativno određivanje koncentracije inzulina korišten je mišji inzulin ELISA kit proizvođača MyBioSource koji koristi sandwich princip. Mikrotitarska pločica obložena je monoklonalnim antitijelom specifičnim za inzulin. U jažice se dodaju standardi (50 µL) 1-6, odnosno uzorci seruma (50 µL). Koncentracije standarda su 3.12 mIU/L, 6,25 mIU/L, 12,5 mIU/L, 25 mIU/L, 50 mIU/L i 100 mIU/L. Zatim se u jažice dodaje 100 µL konjugiranog HRP-poliklalnog antitijela (HRP – *engl. horseradish peroxidase*) specifičnog za inzulin. Slijedi inkubacija 60 minuta na 37°C. Nakon inkubacije, pločica se ispiri s otopinom za ispiranje (10mL otopine + 190 mL destilirane vode). Ispiranje se ponavlja 5 puta, s razmakom od 1 minute između svakog ispiranja. Nakon ispiranja, u jažice se dodaju kromogeni A i B, oba u volumenu od 50 µL, kako bi došlo do razvoja boje. Inkubacije se odvija 15 minuta na 37°C zaštićeno od svjetla. Zadnji korak je dodavanje 50 µL sulfatne kiseline koja zaustavlja reakciju nakon čega slijedi spektrofotometrijska detekcija inzulina na 450 nm na Tecan Infinite F500 Microplate Readeru. Obojenje je proporcionalno koncentraciji inzulina u uzorcima.

3.6.2 ELISA – serumski amiloid A protein (SAA)

Za kvantitativno određivanje koncentracije serumskog amiloid A proteina korišten je mišji serum amiloid A ELISA kit proizvođača MyBioSource koji koristi sandwich princip. Mikrotitarska pločica obložena je monoklonalnim antitijelom specifičnim za SAA. U jažice se dodaju standardi (50 μ L) A-F, odnosno uzorci seruma i sample diluenta, u omjeru 1:4 (10 μ L seruma i 40 μ L sample diluenta). Koncentracije standarda su 0 μ g/mL, 0,5 μ g/mL, 1 μ g/mL, 2 μ g/mL, 4 μ g/mL i 8 μ g/mL. Zatim se u jažice dodaje 100 μ L konjugiranog HRP-poliklalnog antitijela (HRP – *engl. horseradish peroxidase*) specifičnog za SAA. Slijedi inkubacija 60 minuta na 37°C. Nakon inkubacije, pločica se ispiri s otopinom za ispiranje (10mL otopine + 190 mL destilirane vode). Ispiranje se ponavlja 5 puta, s razmakom od 1 minute između svakog ispiranja. Nakon ispiranja, u jažice se dodaju kromogeni A i B, oba u volumenu od 50 μ L, kako bi došlo do razvoja boje. Inkubacije se odvija 15 minuta na 37°C zaštićeno od svjetla. Zadnji korak je dodavanje 50 μ L sulfatne kiseline koja zaustavlja reakciju nakon čega slijedi spektrofotometrijska detekcija SAA na 450 nm na Tecan Infinite F500 Microplate Readeru. Obojenje je proporcionalno koncentraciji SAA u uzorcima.

3.6.3 ELISA – GLUT2

Za kvantitativno određivanje koncentracije GLUT2 korišten je mišji GLUT2 ELISA kit proizvođača MyBioSource koji koristi sandwich princip.

Prije provođenja ELISE, trebalo je provesti homogenizaciju tkiva crijeva. Uzorci su homogenizirani uređajem Precellys I Cryols Evolution, FA LO7002533, korištenjem PBS-a i koktela inhibitora proteaza. Priprema inhibitora proteaza u PBS-u napravljena je neposredno prije korištenja prema uputama proizvođača, 10 mL PBS-a i 1 tableta inhibitora proteaza (Mini EASYpack ROCHE, protease inhibitor cocktail tabletes, REF: 05892970001, lot: 41410100). Nakon dodavanja PBS-a, uzorci su centrifugirani 10 minuta 4°C i 8000 rpm u centrifugi Eppendorf Centrifuge 5810R. Dobiveni supernatanti su odijeljeni u 2 alikvota (400 μ L) i smrznuti na -80°C do provođenja analize.

Postupak ELISE sličan je kao i za inzulin i SAA. Koncentracije standarda 1-6 bile su 0, 5, 10, 25, 50 i 100 ng/mL. U jažice se dodaju standardi (50 μ L), odnosno uzorci homogenata tkiva u istom volumenu. Zbog toga što su uzorci homogenati tkiva, dodaje se 5 μ L balance solutiona. Zatim se u jažice dodaje 100 μ L konjugiranog HRP-poliklalnog antitijela (HRP –

engl. horseradish peroxidase) specifičnog za GLUT2. Slijedi inkubacija 60 minuta na 37°C. Nakon inkubacije, pločica se ispiri s otopinom za ispiranje (10 mL otopine + 190 mL destilirane vode). Ispiranje se ponavlja 5 puta, s razmakom od 1 minute između svakog ispiranja. Nakon ispiranja, u jažice se dodaju kromogeni A i B, oba u volmenu od 50 µL, kako bi došlo do razvoja boje. Inkubacije se odvija 15 minuta na 37°C zaštićeno od svjetla. Zadnji korak je dodavanje 50 µL sulfatne kiseline koja zaustavlja reakciju nakon čega slijedi spektrofotometrijska detekcija GLUT2 na 450 nm na Tecan Infinite F500 Microplate Readeru. Obojenje je proporcionalno koncentraciji GLUT2 u uzorcima.

3.6.4 ELISA – SGLT1

Za kvantitativno određivanje koncentracije SGLT1 korišten je mišji SGLT1 ELISA kit proizvođača MyBioSource koji koristi kompetitivni princip.

Prije provođenja ELISE, trebalo je provesti homogenizaciju tkiva crijeva. Homogenizacija je provedena jednako kao i za uzorke korištene u određivanju koncentracije GLUT2.

ELISA metoda za određivanje koncentracije SGLT1 koristi poliklonalna antitijela specifična za SGLT1 i SGLT1-HRP konjugat (HRP – *engl. horseradish peroxidase*). U jažice je dodano 100 µL standarda A-F, odnosno 100 µL uzorka i 10 µL balance solutiona. Koncentracije standarda bile su 0, 250, 500, 1000, 2500 i 5000 pg/mL. Zatim se u jažice dodaje 50 µL konjugiranog HRP-poliklonalnog antitijela (HRP – *engl. horseradish peroxidase*) specifičnog za SGLT1. Slijedi inkubacija 60 minuta na 37°C. Nakon inkubacije, pločica se ispiri s otopinom za ispiranje (10 mL otopine + 990 mL destilirane vode). Ispiranje se ponavlja 5 puta, s razmakom od 1 minute između svakog ispiranja. Nakon ispiranja, u jažice se dodaju kromogeni A i B, oba u volmenu od 50 µL, kako bi došlo do razvoja boje. Inkubacije se odvija 15 minuta na 37°C zaštićeno od svjetla. Zadnji korak je dodavanje 50 µL sulfatne kiseline koja zaustavlja reakciju nakon čega slijedi spektrofotometrijska detekcija SGLT1 na 450 nm na Tecan Infinite F500 Microplate Readeru. Obojenje je proporcionalno koncentraciji SGLT1 u uzorcima.

3.6.5 ELISA – Na⁺/K⁺ ATP-aza

Za kvantitativno određivanje koncentracije Na⁺/K⁺ ATP-aze korišten je mišji Na⁺/K⁺-ATP-aza kit proizvođača MyBioSource koji koristi sandwich princip.

Prije provođenja ELISE, trebalo je provesti homogenizaciju tkiva crijeva. Homogenizacija je provedena jednako kao i za uzorke korištene u određivanju koncentracije GLUT2 i SGLT1.

Mikrotitarska pločica obložena je monoklonalnim antitijelom specifičnim za Na⁺/K⁺-ATP-azu. U jažice se dodaju standardi (50 µL) A-F, odnosno uzorci seruma i sample diluenta, u omjeru 1:4 (10 µL seruma i 40 µL sample diluenta). Koncentracije standarda su 0, 1, 2, 4, 8 i 16 µmol/mL. Zatim se u jažice dodaje 100 µL konjugiranog HRP-poliklonalnog antitijela (HRP – *engl. horseradish peroxidase*) specifičnog za Na⁺/K⁺ ATP-azu. Slijedi inkubacija 60 minuta na 37°C. Nakon inkubacije, pločica se ispiri s otopinom za ispiranje (10mL otopine + 190 mL destilirane vode). Ispiranje se ponavlja 5 puta, s razmakom od 1 minute između svakog ispiranja. Nakon ispiranja, u jažice se dodaju kromogeni A i B, oba u volmenu od 50 µL, kako bi došlo do razvoja boje. Inkubacije se odvija 15 minuta na 37°C zaštićeno od svjetla. Zadnji korak je dodavanje 50 µL sulfatne kiseline koja zaustavlja reakciju nakon čega slijedi spektrofotometrijska detekcija Na⁺/K⁺ ATP-aze na 450 nm na Tecan Infinite F500 Microplate Readeru. Obojenje je proporcionalno koncentraciji Na⁺/K⁺ ATP-aze u uzorcima.

3.7 Histološka obrada

Tanko i debelo crijevo uzorkovano je za histološku obradu neposredno nakon izrezivanja te zatim stavljeno u prethodno označene histološke kazete, fiksirano u formalinu i ugrađeno u parafin *in toto* (dva bloka). Histološki naresci su rezani na debljinu od 3-5 µm, nanešeni na predmetno stakalce i uskladišteni do daljnje obrade.

Prije samog bojanja, naresci su trebali proći postupak deparafinacije i rehidracije:

- 1) xylol 3x5 – min
- 2) 100% etanol 5 – min
- 3) 96% etanol 5 – min
- 4) 70% etanol - 5 min
- 5) destilirana voda - 5 min

Nakon rehidracije naresci prolaze postupak PAS-bojanja:

- 1) perjodna kiselina – 10 min
- 2) destilirina voda – 5 min
- 3) Schiffov reagens – 30 min
- 4) kalij meatbisulfid – 3x2min, isprati u slavinskoj vodi i uroniti – 5 min
- 5) Mayerov hemalaum – 3 min, isprati u slavinskoj vodi i uroniti – 10 min
- 6) 96% etanol – 5 min
- 7) 100% etanol – 5 min.

Nakon bojanja narezak se naslojava medijem za pokrivanje (Cytoseal) i pokriva pokrovnicom. PAS-obojeni histološki preparati su pregledavani i ocjenjivanje je vršeno po kategorijama prema Nishitani i sur. (2009) kao što je prikazano u tablici 4. Ukupna ocjena za svaku životinju određena je kao zbroj individualnih ocjena (0-12).

Tablica 4 Histološke ocjene upalnih promjena epitela

	Težina upale	Zahvaćeni slojevi	Ocjena ozljede epitela	Opseg promjena
0	Bez upale	Bez upale	Bez ozljede	Bez promjena
1	Blaga	Mukozni	Narušena struktura epitela	Točkaste
2	Umjerena	Mukozni i submukozni	Erozija	Multifokalne
3	Teška	Transmuralni	Ulceracije	Difuzne

3.8 Statistička obrada rezultata

Za obradu podataka korišten je program MS Excel. Statistička obrada učinjena je u programu GraphPad Prism 9. Za ispitivanje statističke značajnosti između grupa korišten je Mann – Whitney U test. P vrijednost $P < 0,05$ je uzeta kao statistički značajna.

3.9 Dobrobit životinja

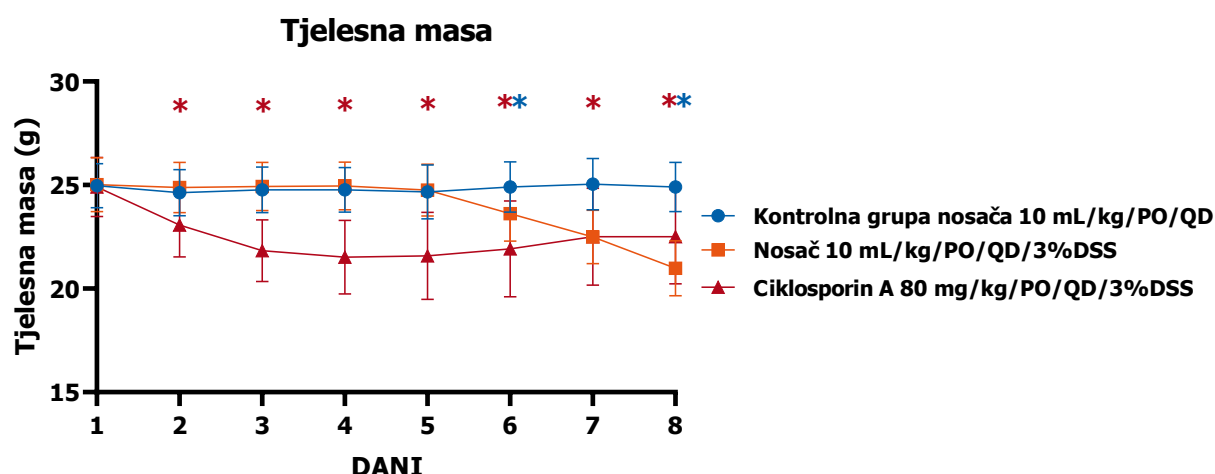
Sva istraživanja koja uključuju životinje provode se u skladu s 2010/63/EU (Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe) i državnom legislativom koje reguliraju korištenje laboratorijskih životinja u znanstvene i druge svrhe (Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, 2013, Zagreb, Narodne novine, broj 55 (NN 55/13)). Za ovaj diplomski rad dobiveno je odobrenje etičkog povjerenstva Fidele, Institutional Committee on Animal Research Ethics (CAREZG_13-06-14_45) te Ministarstva poljoprivrede (KLASA:UP/I-322-01/17-01/146, URBROJ: 525-10/0255-18-4). CARE-Zg brine o tome da se ne krše odredbe o dobrobiti životinja. Sve postupke sa životinjama, od tretiranja do žrtvovanja i uzimanja uzoraka, izvodile su licencirane osobe s potrebnom edukacijom za rad sa životinjama koje se koriste u znanstvene svrhe.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Promjena tjelesne mase od dana 1 do dana 8

4.1.1 Promjena tjelesne mase

Rezultati mjerenja tjelesne mase od dana 1 do dana 8 prikazani su na grafovima 1 i 2. Prosječna masa životinja na dan 1 bila je $24,96 \pm 0,05$ g. Životinje u grupi tretiranoj ciklosporinom A (80 mg/kg/PO/QD/3 % DSS) imale su značajno veći gubitak tjelesne mase prvih 6 dana u usporedbi s grupom tretiranom nosačem s 3 % DSS-om. Posljednja tri dana pokusa očit je i gubitak u grupi nosača u usporedbi s kontrolnom grupom, dok životinje tretirane ciklosporinom pokazuju značajnu razliku u promjeni tjelesne mase na dan 6 i dan 8 pokusa, pri čemu je na dan 6 zamjetna niža prosječna tjelesna masa, a na dan 8 viša prosječna tjelesna masa od životinja u grupi tretiranoj nosačem s 3% DSS-om. Na dan 8 masa životinja u grupi nosač s 3 % DSS dosegla je najnižu vrijednost (prosječno $20,98 \pm 1,33$ g), dok su životinje u ciklosporinskoj grupi dosegle minimum na dan 4 (prosječno $21,52 \pm 1,78$ g). Kada se promjena u tjelesnoj masi izrazi kao površina ispod krivulje grafa, grupa tretirana ciklosporinom A (80 mg/kg/PO/QD/3%DSS) pokazuje statistički značajan pad tjelesne mase u odnosu na grupu tretiranu nosačem s 3 % DSS-om.

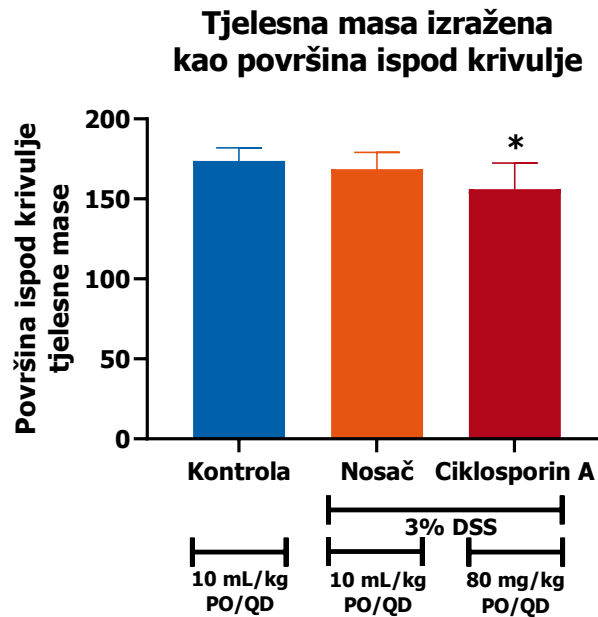


Mixed-effects analysis Mean $\pm$ SD;

*p<0.05 vs nosač 10

mL/kg/PO/QD/3%DSS

Graf 1 Promjena tjelesne mase tijekom trajanja pokusa

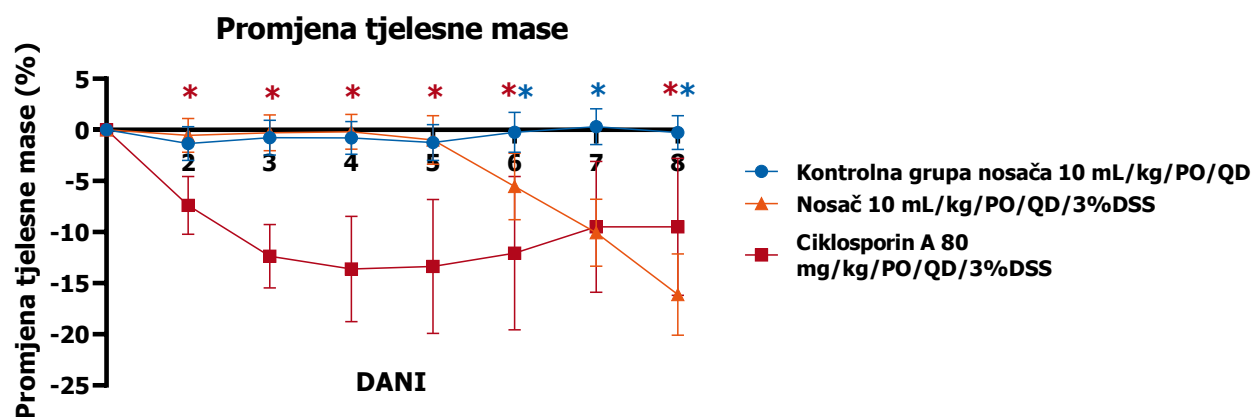


Ordinary one-way ANOVA Mean $\pm$ SD;
*p<0.05 vs nosač 10 mL/kg/PO/QD/3%DSS

Graf 2 Promjena tjelesne mase tijekom trajanja pokusa izražena kao površina ispod krivulje

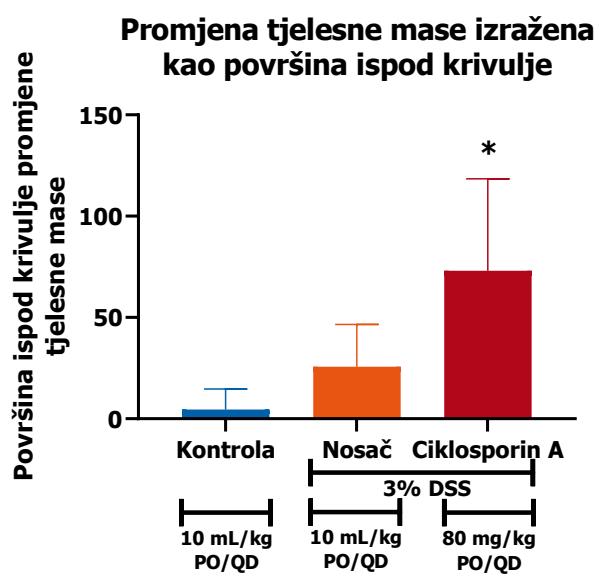
4.1.2 Udio promjene tjelesne mase

Udio promjene tjelesne mase od dana 1 do dana 8 prikazan je na grafovima 3 i 4. Do dana 6 životinje u grupi tretiranoj ciklosporinom imale su značajan gubitak tjelesne mase u usporedbi s grupom tretiranom nosačem s 3 % DSS-om. Posljednja tri dana studije, javlja se statistički značajan gubitak udjela tjelesne mase grupe nosača u usporedbi s kontrolnom grupom, dosežući vrhunac od prosječno 16,11 $\pm$ 3,98 % gubitka na dan 8. Životinje tretirane ciklosporinom pokazuju statistički veći pad udjela tjelesne mase na dan 6, dok je osmog dana vidljiv porast tjelesne mase u odnosu na grupu tretiranu nosačem s 3 % DSS-om. Kada se promjena udjela tjelesne mase izrazi kao površina ispod krivulje grafa, grupa tretirana ciklosporinom A (80 mg/kg/PO/QD/3%DSS) pokazuje statistički značajan pad tjelesne mase u odnosu na grupu tretiranu nosačem s 3 % DSS-om.



Mixed-effects analysis Mean±SD;
 *p<0.05 vs nosač 10 mL/kg/PO/QD/3%DSS

Graf 3 Udio promjene tjelesne mase tijekom cijelog trajanja pokusa

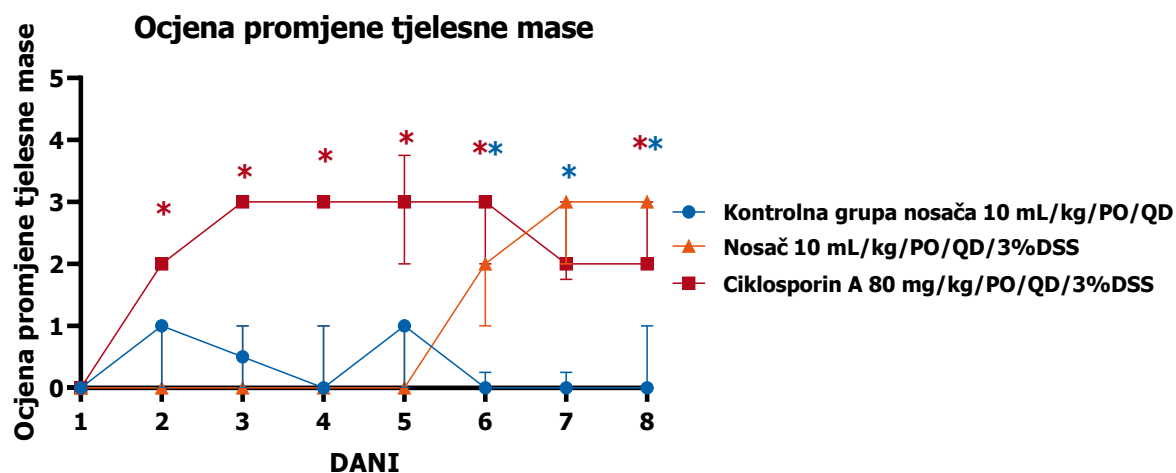


Ordinary one-way ANOVA Mean±SD;
 *p<0.05 vs nosač 10 mL/kg/PO/QD/3%DSS

Graf 4 Udio promjene tjelesne mase tijekom cijelog trajanja pokusa izražena kao površina ispod krivulje

4.1.3 Ocjena promjene tjelesne mase

Ocjena promjene tjelesne mase od dana 1 do dana 8 prikazana je na grafovima 5 i 6. Do dana 5, grupa tretirana ciklosporinom pokazuje značajni porast u ocjeni promjene tjelesne mase u odnosu na grupu tretiranu nosačem s 3 % DSS. Promjena u ovom periodu doseže ocjenu 3, odnosno gubitak od 11 do 15 %. Od dana 6 do dana 8, značajan je i porast ocjene grupe koja je dobivala nosačs 3s% DSS-om u usporedbi s kontrolnom grupom nosača koja je dobivala samo vodu. I u ovom slučaju ocjena doseže vrijednost 3. Grupa tretirana ciklosporinom od dana 7 do dana 8 ima manju ocjenu od nosača s 3 % DSS, ocjenu 2, odnosno manji gubitak na tjelesnoj masi (6-10 %), a statistički je značajna samo na dan 8. Kada se ocjena promjene tjelesne mase izrazi kao površina ispod krivulje grafa, grupa tretirana nosačem s 3 % DSS-om pokazuje značajni porast ocjene promjene tjelesne mase u odnosu na kontrolnu grupu. Grupa tretirana ciklosporinom A (80 mg/kg/PO/QD/3%DSS) pokazuje statistički značajan porast ocjene pada tjelesne mase u odnosu na grupu tretiranu nosačem s 3 % DSS-om.

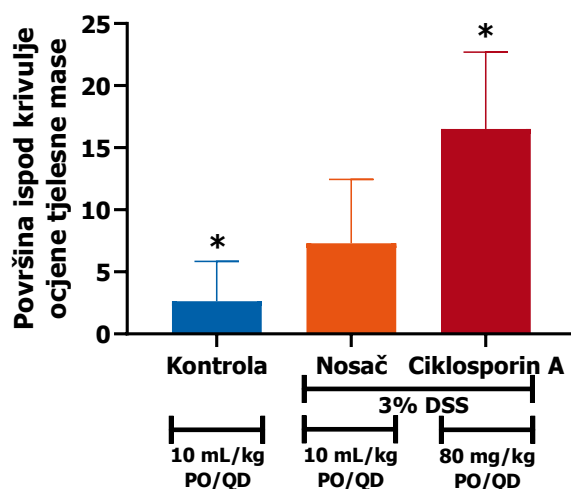


Mixed-effects analysis medijan±interkvartilni raspon;

*p<0.05 vs nosač 10 mL/kg/PO/QD/3%DSS

Graf 5 Ocjena promjene tjelesne mase tijekom cijelog trajanja pokusa

Ocjena promjene tjelesne mase izražena kao površina ispod krivulje



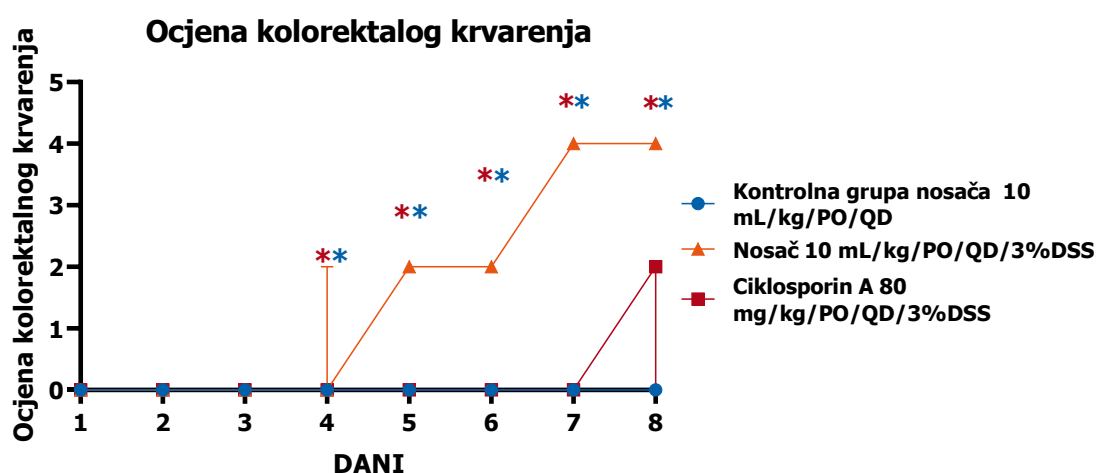
Ordinary one-way ANOVA Mean±SD;
*p<0.05 vs nosač 10 mL/kg/PO/QD/3%DSS

Graf 6 Ocjena promjene tjelesne mase tijekom cijelog trajanja pokusa izražena kao površina ispod krivulje

Pad tjelesne mase kod životinja kod kojih je upalno stanje izazvano DSS-om je dobro dokumentiran (Eichele i Kharbanda, 2017; Kiesler, Fuss i Strober, 2015; Randhawa i sur., 2014; Wirtz i sur., 2007). U ovom eksperimentu, životinje kojima je davan DSS su očekivano i progresivno gubile na tjelesnoj masi, a sukladno tome povećavao se udio promjene tjelesne mase i ocjena promjene tjelesne mase. Ciklosporin, referentni spoj koji dokazano olakšava simptome kolitisa nije imao pozitivan učinak na pad tjelesne mase. Štoviše, pad tjelesne mase, udio promjene tjelesne mase i ocjena promjene tjelesne mase su bili intenzivniji kod životinja tretiranih ciklosporinom A (80 mg/kg/PO/QD/3%DSS) nego kod životinja koje su tretirane nosačem s 3 % DSS-om, što je bilo i očekivano. Naime, iako je poznato da već i niske doze ciklosporina u nekim stanjima utječu na prirast (Jiang i sur., 2013), to u DSS modelu nije slučaj. Međutim, iako niske doze ciklosporina pokazuju pozitivne promjene na histološkim i nekim upalnim parametrima, klinička slika ostaje nepromijenjena (Melger i sur., 2008). Tek visokim dozama ciklosporina učinak postaje vidljiv i na indeksu aktivnosti bolesti (Halligan i sur., 2019; Tung, D i sur., 2011).

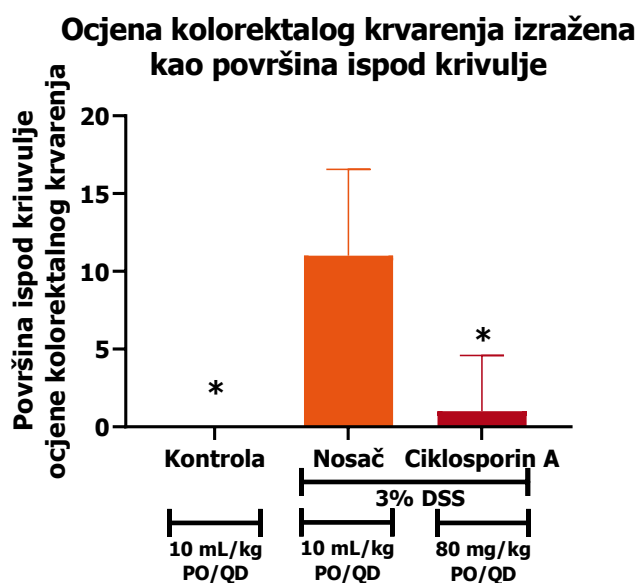
4.2 Ocjena kolorektalnog krvarenja od dana 1 do dana 8

Ocjene kolorektalnog krvarenja od dana 1 do dana 8 prikazane su na grafovima 7 i 8. Od dana 4, 3 % DSS inducirao je statistički značajno kolorektalno krvarenje u odnosu na kontrolnu grupu, koje se pojačavalo do osmog dana pri čemu je doseglo ocjenu 4 u danima 7 i 8. Kolorektalno krvarenje bilo je statistički značajno smanjeno u grupi tretiranoj ciklosporinom A u odnosu na grupu tretiranu nosačem s 3 % DSS-om, dok u kontrolnoj grupi nije primijećeno krvarenje. Prikaz rezultata kao površina ispod krivulje grafa pokazuje da je grupa tretirana nosačem s 3 % DSS-om imala statistički značajnu veću ocjenu krvarenja od kontrolne grupe i od grupe tretirane ciklosporinom A (80 mg/kg/PO/QD/3%DSS).



Mixed-effects analysis medijan $\pm$ interkvartilni raspon;
* $p < 0.05$ vs nosač 10 mL/kg/PO/QD/3%DSS

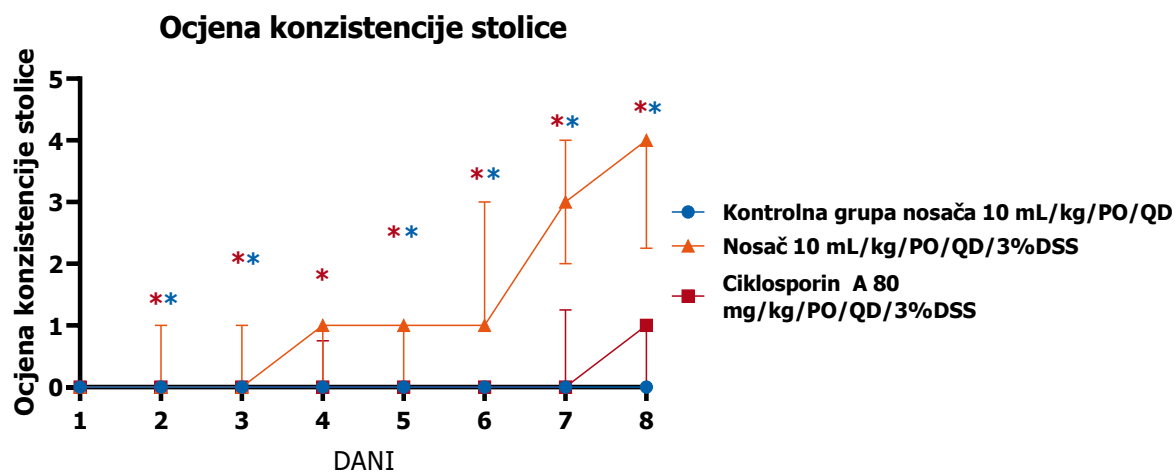
Graf 7 Ocjena kolorektalnog krvarenja tijekom cijelog trajanja pokusa



Graf 8 Ocjena kolorektalnog krvarenja tijekom cijelog trajanja pokusa izražena kao površina ispod krivulje

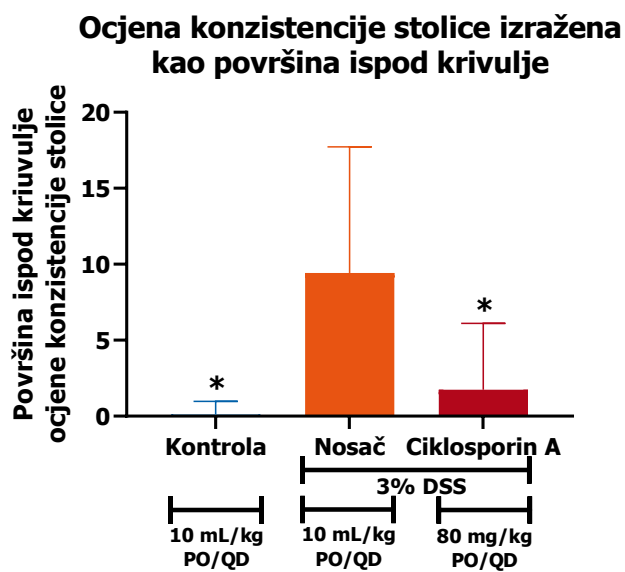
4.3. Ocjena konzistencije stolice od dana 1 do dana 8

Ocjene konzistencije stolice od dana 1 do dana 8 prikazane su na grafovima 9 i 10. Grupa tretirana nosačem s 3 % DSS-om tijekom cijelog trajanja studije imala je značajno višu ocjenu konzistencije stolice u odnosu na kontrolnu grupu, dosežući maksimalnu ocjenu 4 na dan 8. Značajna razlika primijećena je i u grupi tretiranoj ciklosporinom, čije su ocjene bile značajno niže u usporedbi s nosačem s 3 % DSS-om, dosežući najvišu ocjenu 1 na dan 8. Prikaz rezultata kao površina ispod krivulje grafa pokazuje da je grupa tretirana nosačem s 3 % DSS-om imala statistički značajnu veću ocjenu konzistenciju stolice od kontrolne grupe i od grupe tretirane ciklosporinom A (80 mg/kg/PO/QD/3%DSS).



Mixed-effects analysis medijan±interkvartilni raspon;
 *p<0.05 vs nosač 10 mL/kg/PO/QD/3%DSS

Graf 9 Ocjena konzistencije stolice tijekom cijelog trajanja pokusa

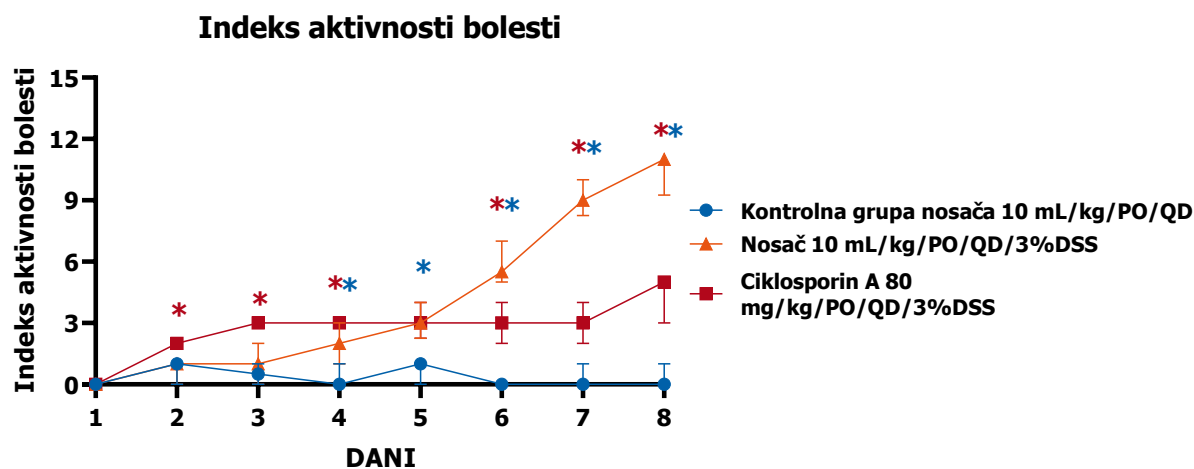


Ordinary one-way ANOVA Mean±SD;
 *p<0.05 vs nosač 10 mL/kg/PO/QD/3%DSS

Graf 10 Ocjena konzistencije stolice tijekom cijelog trajanja pokusa izražena kao površina ispod krivulje

4.4 Indeks aktivnosti bolesti od dana 1 do dana 8

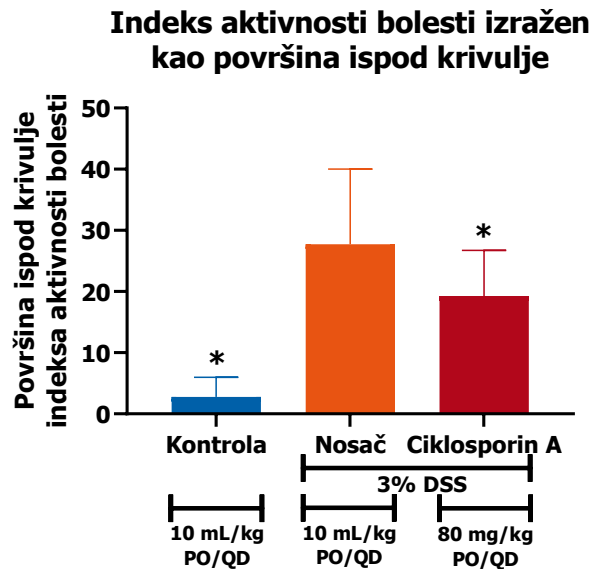
Indeks aktivnosti bolesti od dana 1 do dana 8 prikazan je na grafovima 11 i 12. Na kraju studije, na dan 8, indeks aktivnosti bolesti bio je značajno viši u grupi nosača tretiranoj 3% DSS-om (prosječno 10,35) u odnosu na kontrolnu grupu koja je dobivala samo vodu. Od dana 2 do dana 4, grupa tretirana ciklosporinom imala je nešto veći indeks aktivnosti bolesti od grupe tretirane nosačem s 3 % DSS-om, što se može pripisati doprinosu gubitka na tjelesnoj masi, koji je bio veći u ciklosporinskoj grupi. Ipak, tretman ciklosporinom značajno je usporio napredak kolitisa što je vidljivo u indeksima od dana 5 do dana 8 koji su značajno manji nego u grupi nosač s 3 % DSS. Kada se indeks aktivnosti bolesti izrazi kao površina ispod krivulje grafa, grupa tretirana nosačem s 3 % DSS-om pokazuje značajno višu aktivnost bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu i grupu tretiranu ciklosporinom.



Mixed-effects analysis medijan±interkvartilni raspon;

*p<0.05 vs nosač 10 mL/kg/PO/QD/3%DSS

Graf 11 Indeks aktivnosti bolesti tijekom cijelog trajanja pokusa



Ordinary one-way ANOVA Mean±SD;
*p<0.05 vs nosač 10 mL/kg/PO/QD/3%DSS

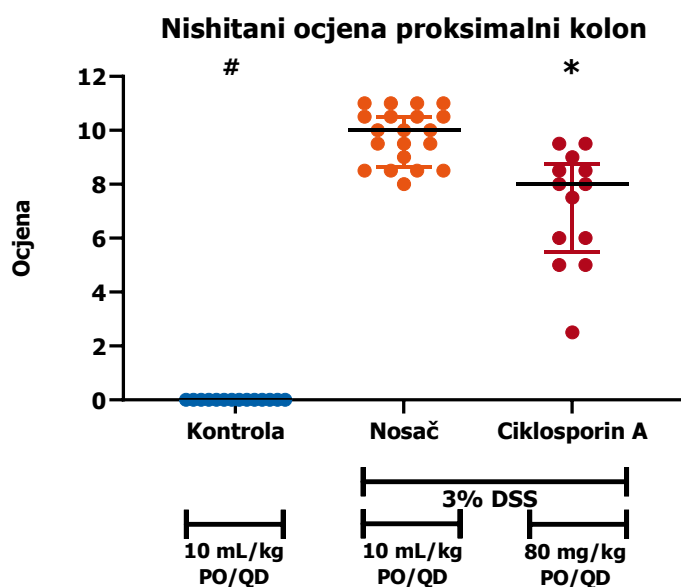
Graf 12 Indeks aktivnosti bolesti tijekom cijelog trajanja pokusa izražen kao površina ispod krivulje

Kolorektalno krvarenje i dijareja su očekivani simptomi u DSS modelu IBD-a (Eichele i Kharbanda, 2017; Kiesler, Fuss i Strober, 2015; Randhawa i sur., 2014; Wirtz i sur., 2007). U ovom eksperimentu, kolorektalno krvarenje je izostalo prva tri dana izazova DSS-om, međutim, od dana 4 pa do kraja eksperimenta krvarenje se pojačalo i doseglo maksimalnu ocjenu na osmom danu. Konzistencijom fecesa je u grupi tretiranoj nosačem s 3 % DSS-om postala mekša od prvog dana studije i prema osmom danu je napredovala u profuzni proljev kada je dosegnuta i najviša ocjena. Indeks aktivnosti bolesti, kao jasan klinički pokazatelj napredovanja upale je postao povišen već na prvom danu studije, a dosegao je statističku značajnost na danu 4 i porastao do dana 8 u grupi tretiranoj nosačem s 3 % DSS-om. Očekivano, tretman ciklosporinom je smanjio intenzitet krvarenja i proljev (Halligan i sur., 2019). Međutim, zbog visokog udjela ocjene gubitka težine grupa tretirana ciklosporinom pokazuje značajno visok indeks aktivnosti bolesti u odnosu na grupu tretiranoj nosačem s 3 % DSS-om već od prvog dana. Na petom danu razlike nema, i od šestog dana jasno je vidljiv pozitivan učinak ciklosporina na razvoj bolesti kada je indeks aktivnosti bolesti manji.

4.5 Histološka obrada

4.5.1 Nishitani ocjena u proksimalnom kolonu

Nishitani ocjena u proksimalnom kolonu prikazana je na grafu 13. Značajna razlika je zabilježena u kontrolnoj grupi nosača koja je dobivala vodu i grupi tretiranoj ciklosporinom A, u usporedbi s grupom tretiranom nosačem s 3 % DSS koja je imala višu ocjenu. Prosječna ocjena u grupi nosača s 3 % DSS bila je 10,00 (IQR: 8,63 - 10,50). Prosječna ocjena kontrolne grupe nosača bila je 0, dok je u ciklosporinskoj grupi ocjena bila prosječno 8,00 (IQR: 5,50 - 8,75).



#p<0.05 vs corresponding Vehicle; Wilcoxon Signed Rank Test

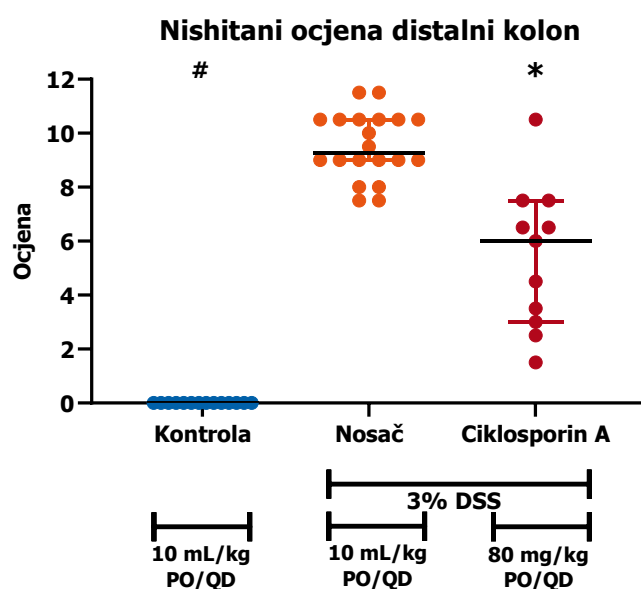
*p<0.05 vs corresponding Vehicle; Mann-Whitney Test

Graf 13 Nishitani ocjena u proksimalnom kolonu

4.5.2. Nishitani ocjena u distalnom kolonu

Nishitani ocjena u distalnom kolonu prikazan je na grafu 14. Značajna razlika Nishitani ocjene u distalnom kolonu je zabilježena u kontrolnoj grupi nosača koja je dobivala vodu i grupi tretiranoj ciklosporinom A, u usporedbi s grupom nosača s 3 % DSS koja je imala višu prosječnu ocjenu od 9,25 (IQR: 9,00 - 10,50).

Prosječna ocjena kontrolne grupe nosača bila je 0, dok je u ciklosporinskoj grupi ona prosječno iznosila 6,0 (IQR: 3,0-7,5).



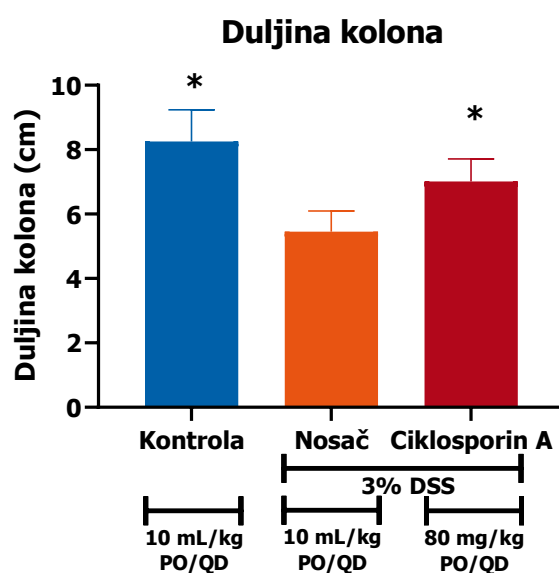
Graf 14 Nishitani ocjena u distalnom kolonu

Histološki je u debelom crijevu bila jasno vidljiva upala i oštećenje epitela u proksimalnom i distalnom dijelu izazvano DSS-om, što je potvrđeno Nishitani ocjenom (Nishitani i sur., 2009). Ciklosporin je imao pozitivan učinak na razvoj upale u kolonu i oštećenje epitela crijeva, što govori u prilog činjenici da je ciklosporin kvalitetan standard za ovaj model.

4.6 Duljina kolona na dan 8

Na dan 8 koloni životinja su izvađeni i ravnalom im je izmjerena duljina (od cekuma do anusa). Rezultati su prikazani na grafu 15.

Izlaganje 3 % DSS-u kroz 7 dana inducira značajno skraćivanje duljine kolona u uspoređi s kontrolnom grupom koja je dobivala samo vodu. Koloni životinja u grupi nosača s 3 % DSS imali su prosječnu duljinu $5,5 \pm 0,6$ cm, a koloni životinja kontrolne grupe nosača prosječno $8,3 \pm 1,0$ cm. Tretman ciklosporinom rezultirao je značajno manjim skraćivanjem duljine kolona, pri čemu je izmjerena prosječna duljina od $7,0 \pm 0,7$ cm.



Ordinary one-way ANOVA Mean $\pm$ SD;
*p<0.05 vs Vehicle 10
mL/kg/PO/QD/3%DSS

Graf 15 Duljina kolona na dan 8

Klinički nalaz je potvrđen i postmortalno gdje je došlo do skraćivanja kolona u grupi tretiranoj nosačem s 3 % DSS-om, kao i značajno smanjenje skraćivanja kolona nakon tretmana ciklosporinom (Halligan i sur., 2019).

4.7 Hematološki parametri

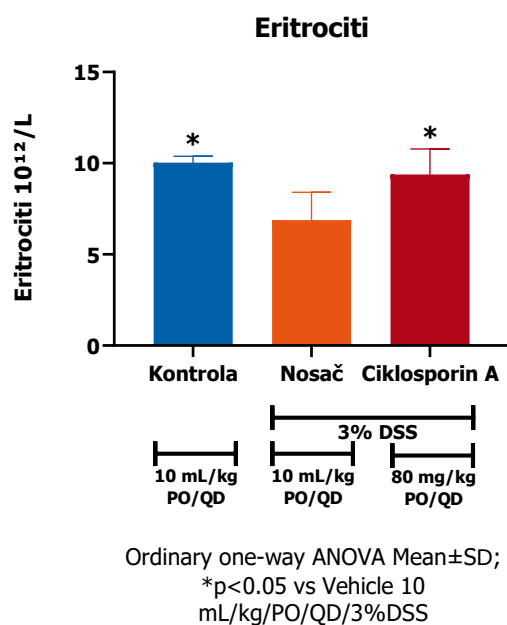
4.7.1 Crvena krvna slika

Mjereni parametri crvene krvne slike bili su broj eritrocita, hemoglobin i hematokrit. U sva tri mjerena parametra zabilježena je značajna razlika između kontrolne grupe nosača koja je dobivala samo vodu i ciklosporinske grupe, u usporedbi s grupom koja je dobivala nosač s 3 % DSS.

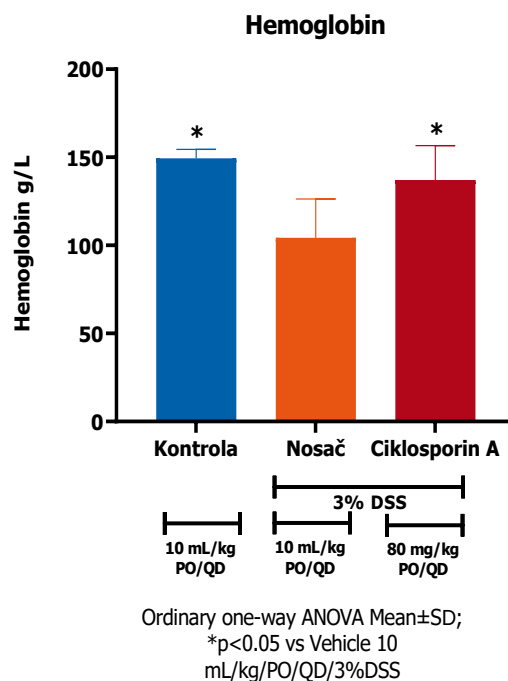
Broj eritrocita prikazan je na grafu 16. Kod životinja u grupi tretiranoj nosačem s 3 % DSS-om broj eritrocita bio je značajno manji u usporedbi sa životinjama u kontrolnoj grupi i ciklosporinskoj grupi. Prosječna vrijednosti broja eritrocita u grupi tretiranoj nosačem s 3 % DSS bila je $6,88 \pm 1,53 \times 10^{12}/L$, dok je u ciklosporinskoj grupi bila $9,39 \pm 1,393 \times 10^{12}/L$, nešto niža nego u grupi koja je dobivala samo vodu ($10,03 \pm 0,35 \times 10^{12}/L$).

Slični rezultati dobiveni su i za koncentraciju hemoglobina, a koji su prikazani na grafu 17. Ciklosporinska grupa imala je prosječnu koncentraciju hemoglobina $137,1 \pm 19,5$ g/L, nešto nižu od kontrolne grupe nosača ($149,4 \pm 5,2$ g/L), dok je ona bila značajno niža u grupi tretiranoj nosačem s 3 % DSS, prosječno $104,2 \pm 22,1$ g/L.

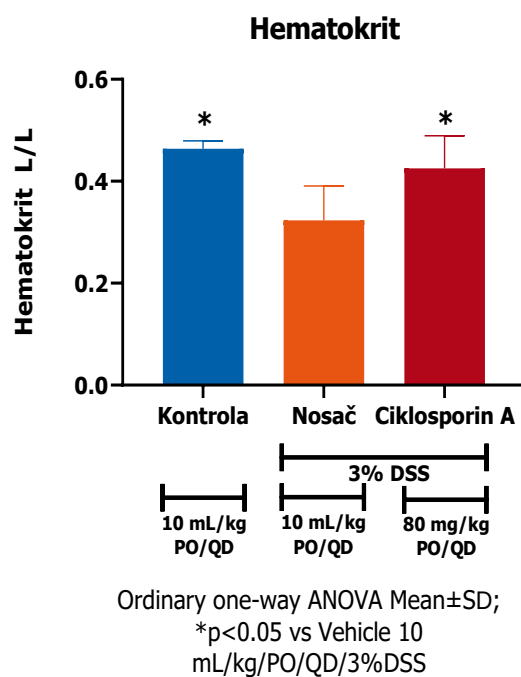
Hematokrit je prikazan na grafu 18. Hematokrit je pratio sličan trend, manji pad vrijednosti u ciklosporinskoj grupi (prosječno $0,43 \pm 0,06$ L/L) u odnosu na kontrolnu grupu koja je dobivala samo vodu i nosač (prosječno $0,46 \pm 0,02$ L/L) te veći pad vrijednosti u grupi tretiranoj nosačem s 3 % DSS (prosječno $0,32 \pm 0,07$ L/L).



Graf 16 Broj eritrocita na dan 8



Graf 17 Koncentracija hemoglobina na dan 8



Graf 18 Hematokrit na dan 8

4.7.2 Bijela krvna slika

Rezultati mjerenja broja ukupnih leukocita te subpopulacija neutrofilnih granulocita, limfocita, monocita i eozinofilnih granulocita prikazani su na grafovima 19-23.

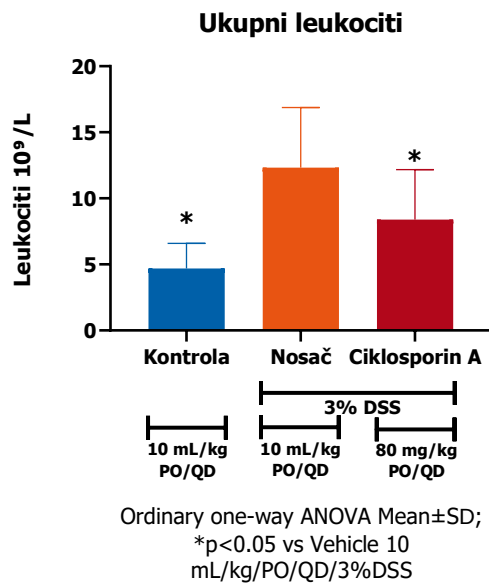
Ukupan broj leukocita prikazan je na grafu 19. Kod životinja u grupi tretiranoj nosačem s 3 % DSS bio je prosječno $12,32 \pm 4,54 \times 10^9/L$, značajno viši nego u grupi koja je dobivala samo vodu ($4,68 \pm 1,90 \times 10^9/L$). Kod životinja iz ciklosporinske grupe ukupan broj leukocita je bio značajno manji u usporedbi s grupom nosačem s 3 % DSS, prosječno $8,39 \pm 3,79 \times 10^9/L$.

Slični rezultati dobiveni su za broj neutrofilnih granulocita, prikazani na grafu 20. Kontrolna grupa nosača imala je prosječan broj neutrofilnih granulocita $1,19 \pm 0,58 \times 10^9/L$. Ciklosporinska grupa imala je prosječan broj neutrofilnih granulocita $3,09 \pm 1,35 \times 10^9/L$, dok je broj neutrofilnih granulocita bio značajno viši u grupi tretiranoj nosačem s 3 % DSS, prosječno $4,27 \pm 1,93 \times 10^9/L$.

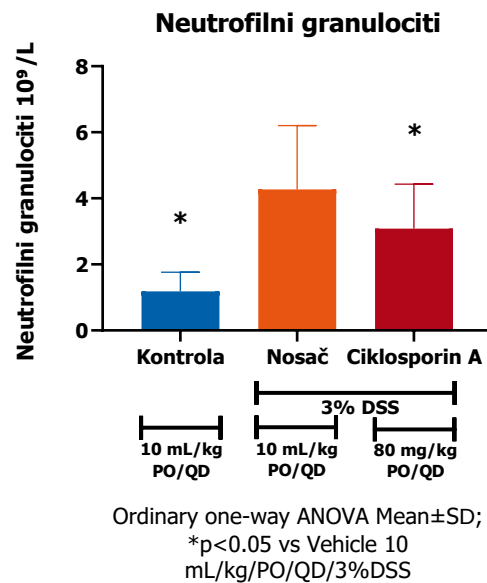
Broj limfocita prikazan je na grafu 21. Prosječan broj limfocita u grupi nosačem s 3 % DSS bio je $6,58 \pm 3,69 \times 10^9/L$, značajno viši od kontrolne grupe koja je dobivala samo vodu (prosječno $3,24 \pm 1,80 \times 10^9/L$) i ciklosporinske grupe (prosječno $4,29 \pm 2,23 \times 10^9/L$).

Broj monocita prikazan je na grafu 22. Kod monocita je izmjerena veća promjena. Značajna je bila razlika između grupe koja je dobivala samo vodu, prosječnog broja $0,20 \pm 0,12 \times 10^9/L$ i grupe tretirane nosačem s 3 % DSS, s prosječnim brojem monocita $1,47 \pm 0,85 \times 10^9/L$. Grupa tretirana ciklosporinom A nije pokazala statistički značajnu razliku u broju monocita u usporedbi sa grupom koje je tretirana nosačem s 3 % DSS-om.

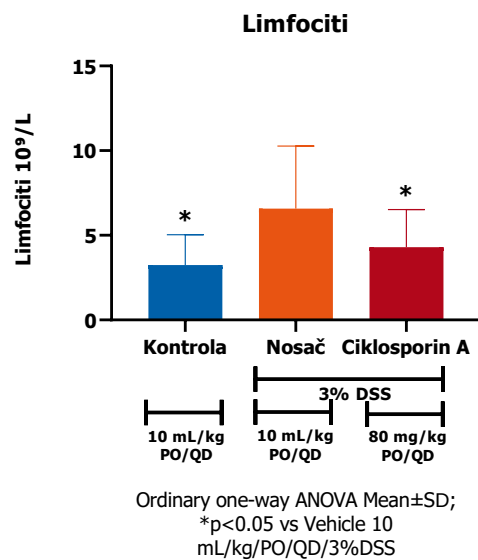
Broj eozinofilnih granulocita prikazan je na grafu 23. Prosječna vrijednost u grupi koja je dobivala samo vodu bila je $0,06 \pm 0,07 \times 10^9/L$, dok je u grupi tretiranoj nosačem s 3 % DSS bila značajno niža, prosječno $0,01 \pm 0,01 \times 10^9/L$. Grupa tretirana ciklosporinom A nije pokazala statistički značajnu razliku u broju monocita u usporedbi sa grupom koja je tretirana nosačem s 3 % DSS-om.



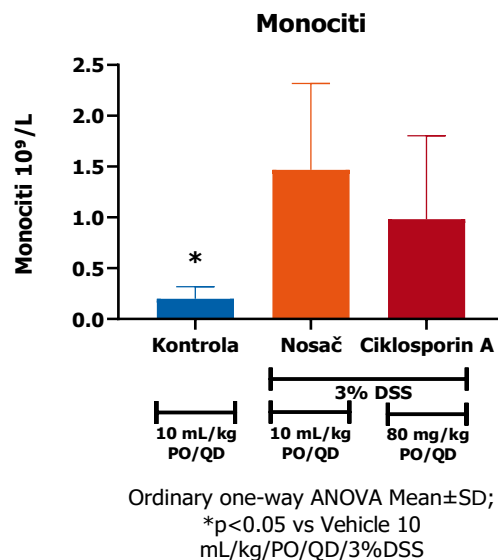
Graf 19 Ukupan broj leukocita na dan 8



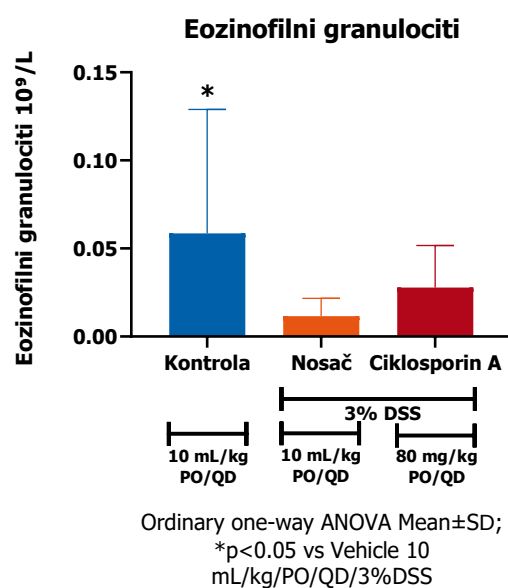
Graf 20 Broj neutrofilnih granulocita na dan 8



Graf 21 Broj monocita na dan 8



Graf 22 Broj monocita na dan 8

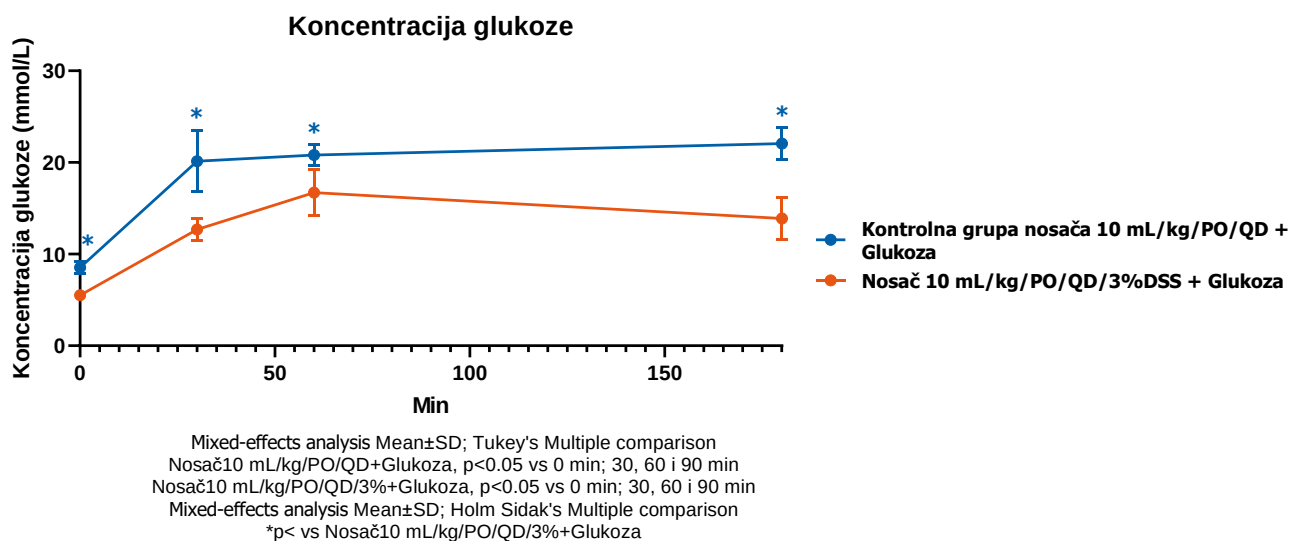


Graf 23 Broj eozinofilnih granulocita na dan 8

Hematološki parametri su jasno naznačili da je došlo do krvarenja i upale u grupi tretiranoj nosačems 3 % DSS-om. Tretman ciklosporinom je približio stanje onom izmjerenom kod kontrolne skupine. Svi navedeni rezultati su potvrdili da je tretman DSS-om uzrokovao kolitis, popraćen krvarenjem i profuznim proljevom, pri čemu je tretman ciklosporinom A (80 mg/kg/PO/QD/3%DSS) smanjio kliničke znakove i popravio opće stanje životinje, uz očekivani gubitak tjelesne težine.

4.8 Glukoza

Koncentracija glukoze u krvi nakon gladovanja/davanja bolusa glukoze je prikazana na grafu 24. Zabilježene su statistički značajne razlike u koncentraciji glukoze nakon gladovanja, pri čemu je kontrolna grupa životinja koje su pile vodu imala veću koncentraciju od grupe tretirane nosačem s 3 % DSS-om. Nakon davanja bolusa glukoze došlo je do statistički značajnog povećanja koncentracije glukoze u krvi u svim vremenskim točkama ($t = 30, 60, 180$ min) uzorkovanja u usporedbi s koncentracijom prije administracije bolusa ($t = 0$). Također, statistički značajna razlika između dvije grupe je prisutna u svim vremenskim točkama.



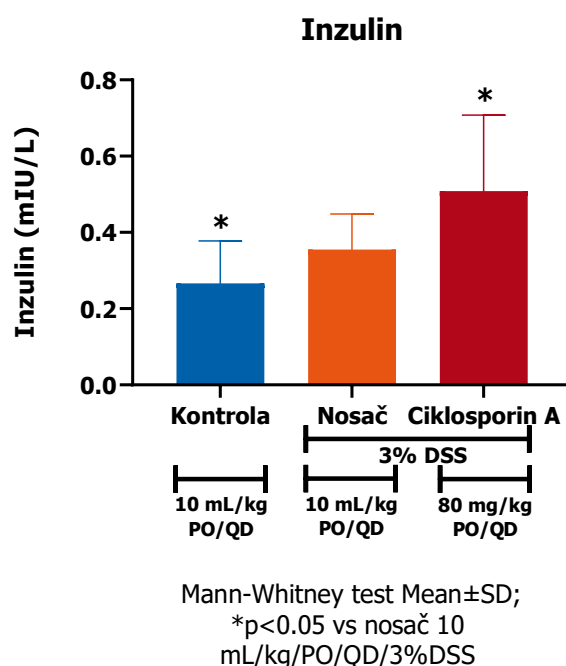
Graf 24 Koncentracija glukoze u vremenskim točkama 0', 30', 60', 180'

4.9 Inzulin i serumski amiloid A u serumu – određivanje ELISA metodom

4.9.1 Inzulin

Koncentracije inzulina u serumu prikazane su na grafu 25. Značajna je razlika dobivena u kontrolnoj grupi životinja koje su dobivale samo vodu, pri čemu je koncentracija inzulina bila manja (prosječno $0,267 \pm 0,111$ mIU/L) u odnosu na grupu tretiranu nosačem s 3 % DSS-om (prosječno $0,355 \pm 0,093$ mIU/L), dok je grupa tretirana ciklosporinom A (80

mg/kg/PO/QD/3%DSS) imala povećanu koncentraciju inzulina (prosječno $0,508 \pm 0,199$ mIU/L) u usporedbi s grupom tretiranom nosačem s 3 % DSS.

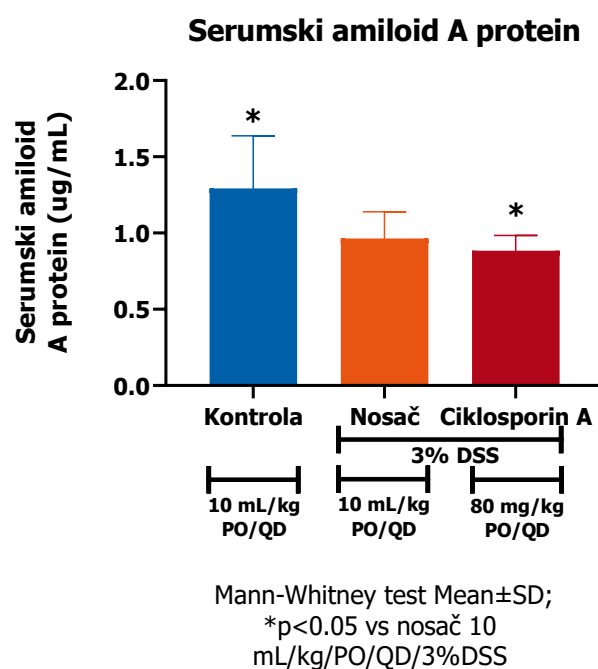


Graf 25 Koncentracija inzulina na dan 8

Koncentracija glukoze životinja je značajno niža u svim vremenskim točkama u odnosu na životinje koje su primale vodu i bile tretirane nosačem, što je sukladno podacima iz literature. Inzulin je hormon koji izravno utječe na smanjenje koncentracije glukoze u krvi i za očekivati je da smanjenje glukoze u krvi posljedica povišene koncentracije inzulina, kako je navedeno i u literaturi (Park i sur., 2019). Smanjenje koncentracije glukoze u krvi može biti i posljedica inhibitornog učinka inzulina na GLUT2 (Tobin i sur., 2008). Zanimljivo je da ciklosporin kod štakora pokazuje inhibitorni učinak na koncentraciju inzulina (Yale i sur., 1985), dok je u ovom eksperimentu koncentracija inzulina nakon tretmana ciklosporinom povećana. U ovom slučaju moguće objašnjenje je u razlikama u odgovoru na tretman između vrsta (Sabolić i sur., 2011).

4.9.2 Serumski amiloid A protein

Koncentracije serumskog amiloid A (SAA) proteina prikazane su na grafu 26. Značajna je razlika dobivena u kontrolnoj grupi životinja koje su pile vodu, pri čemu je koncentracija SAA bila veća (prosječno $1,292 \pm 0,345$ ug/mL) u odnosu na grupu tretiranu nosačem s 3 % DSS-om (prosječno $0,963 \pm 0,175$ ug/mL), dok je grupa tretirana ciklosporinom A (80 mg/kg/PO/QD/3%DSS) pokazala manju koncentraciju SAA (prosječno $0,884 \pm 0,101$ ug/mL) u usporedbi s grupom tretiranom s nosačem s 3 % DSS.



Graf 26 Koncentracija serumskog amiloid A proteina na dan 8

4.10 GLUT2, SGLT1, Na⁺/K⁺ ATP-aza iz homogenata crijeva – određivanje ELISA metodom

4.10.1 GLUT2

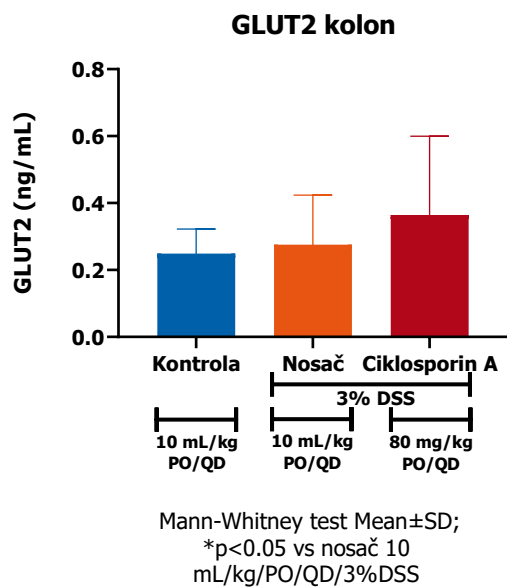
Koncentracije transportera GLUT2 iz homogenata crijeva po segmentima prikazane su na grafovima 27-30.

Na grafu 27 prikazane su koncentracije GLUT2 u kolonu. Koncentracije u kontrolnoj grupi prosječno su bile $0,249 \pm 0,073$ ng/mL, a u grupi tretiranoj nosačem s 3 % DSS-a i ciklosporinom više, prosječno $0,276 \pm 0,148$ ng/mL i $0,364 \pm 0,235$ ng/mL. Ipak, nije primijećena statistički značajna razlika između grupa.

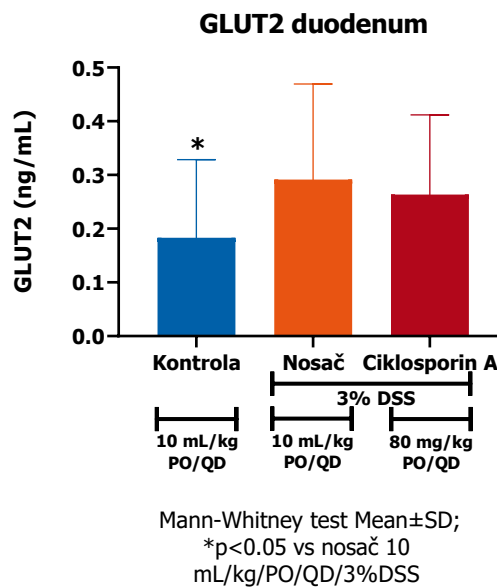
Na grafu 28 prikazane su koncentracije GLUT2 u duodenumu. Značajna razlika dobivena je između kontrolne grupe nosača i nosača s 3 % DSS-a. Prosječna koncentracija u kontrolnoj grupi bila je $0,183 \pm 0,145$ ng/mL, a u grupi tretiranoj s nosačem s 3 % DSS došlo je do povećanja koncentracije, s prosječnom vrijednosti $0,291 \pm 0,178$ ng/mL. Tretman ciklosporinom pokazao je blago smanjene koncentracije GLUT2 u stijenci duodenuma u odnosu na tretman nosačem s 3 % DSS-om (prosječno $0,263 \pm 0,149$ ng/mL), no razlika nije statistički značajna.

Na grafu 29 prikazane su koncentracije GLUT2 u jejunumu. Značajna razlika dobivena je u obje grupe; u kontrolnoj grupi koja je dobivala samo vodu koncentracija GLUT2 bila je viša (prosječno $0,075 \pm 0,034$ ng/mL) u odnosu na grupu tretiranu nosačems 3 % DSS ($0,052 \pm 0,044$ ng/mL), dok je u grupi tretiranoj ciklosporinom A koncentracija GLUT2 bila na najvišoj razini ($0,152 \pm 0,124$ ng/mL).

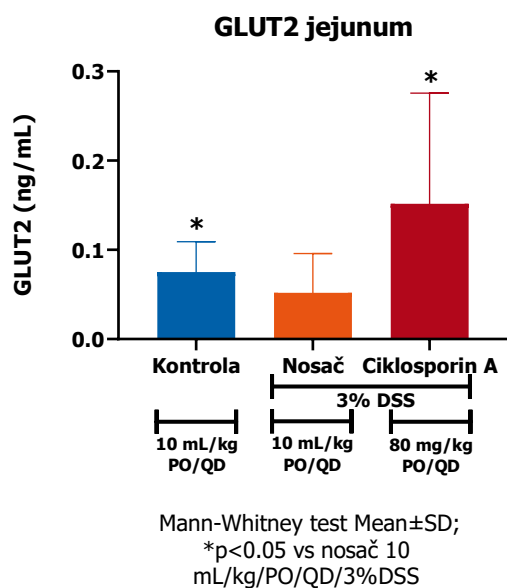
Na grafu 30 prikazane su koncentracije GLUT2 u ileumu. Iako je koncentracija GLUT2 u kontrolnoj grupi veća (prosječno $0,182 \pm 0,158$ ng/mL) u odnosu grupu tretiranu nosačem s 3 % DSS-a (prosječno $0,142 \pm 0,062$ ng/mL), razlika nije bila statistički značajna. U grupi tretiranoj ciklosporinom A zabilježen je značajan porast koncentracije GLUT2 ($0,195 \pm 0,097$ ng/mL) u odnosu na odnosu grupu nosača s 3 % DSS.



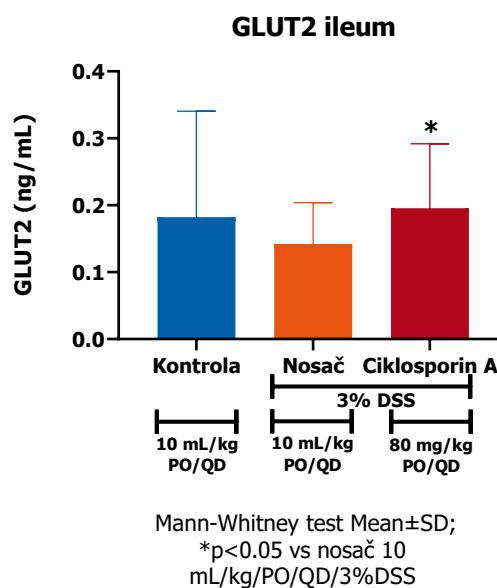
Graf 27 Koncentracija GLU2 u kolonu



Graf 28 Koncentracija GLU2 u duodenumu



Graf 29 Koncentracija GLU2 u jejunumu



Graf 30 Koncentracija GLU2 u ileumu

4.10.2 SGLT1

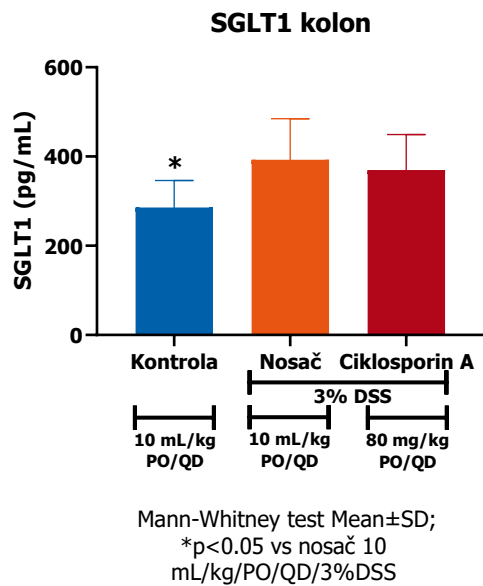
Koncentracije koprijenosnika SGLT1 iz homogenata crijeva po segmentima prikazane su na grafovima 31-34.

Na grafu 31 prikazane su koncentracije SGLT1 u kolonu. Značajna razlika dobivena je između kontrolne grupe životinja (prosječno $285,6 \pm 60,60$ pg/mL) i grupe tretirane nosačem s 3% DSS-a gdje je zabilježen porast koncentracije ($392,7 \pm 92,11$ pg/mL). Prosječna koncentracija u grupi tretiranoj ciklosporinom A iznosila je prosječno $369,8 \pm 79,55$ pg/mL, no ta razlika nije bila značajna.

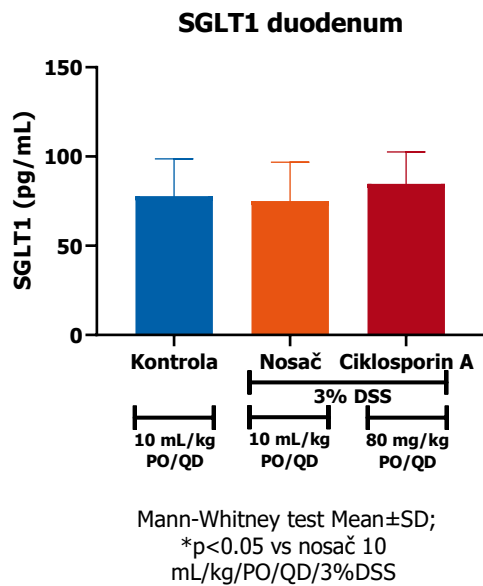
Na grafu 32 prikazane su koncentracije SGLT1 u duodenumu. Prosječna koncentracija u kontrolnoj grupi nosača bila je $77,86 \pm 20,77$ pg/mL, u grupi tretiranoj nosačem s 3% DSS $75,10 \pm 21,73$ pg/mL, a u grupi tretiranoj ciklosporinom najviša, $84,64 \pm 17,92$ pg/mL. Nije primijećena statistički značajna razlika između grupa.

Na grafu 33 prikazane su koncentracije SGLT1 u jejunumu. Prosječna koncentracija u kontrolnoj grupi nosača bila je najniža, $46,40 \pm 9,291$ pg/mL, u grupi tretiranoj nosačem s 3% DSS $59,05 \pm 20,25$ pg/mL i u grupi tretiranoj ciklosporinom najviša, $60,16 \pm 15,90$ pg/mL. Nije primijećena statistički značajna razlika između grupa.

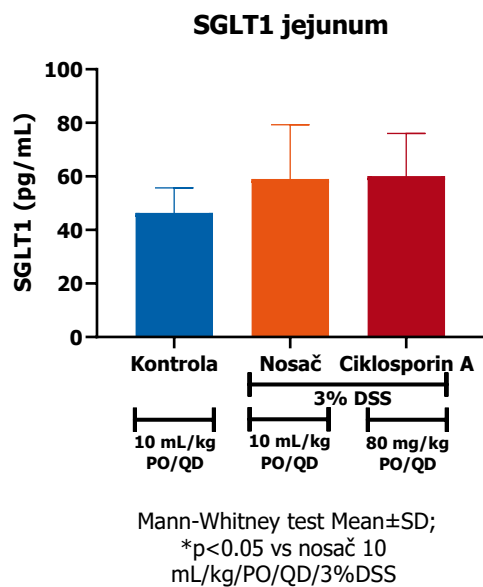
Na grafu 34 prikazane su koncentracije SGLT1 u ileumu. Niti u uvom dijelu crijeva nije primijećena značajna razlika između grupa. Prosječna koncentracija u kontrolnoj grupi nosača bila je $94,58 \pm 37,33$ pg/mL, u grupi tretiranoj nosačem s 3% DSS $113,2 \pm 38,03$ pg/mL i u grupi tretiranoj ciklosporinom najniža, $94,06 \pm 41,15$ pg/mL..



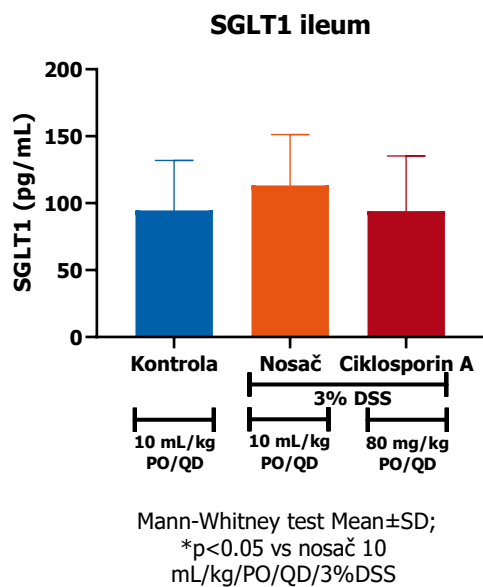
Graf 31 Koncentracija SGLT1 u kolonu



Graf 32 Koncentracija SGLT1 u duodenumu



Graf 33 Koncentracija SGLT1 u jejunumu



Graf 34 Koncentracija SGLT1 u ileumu

4.10.3 Na⁺/K⁺ ATP-aza

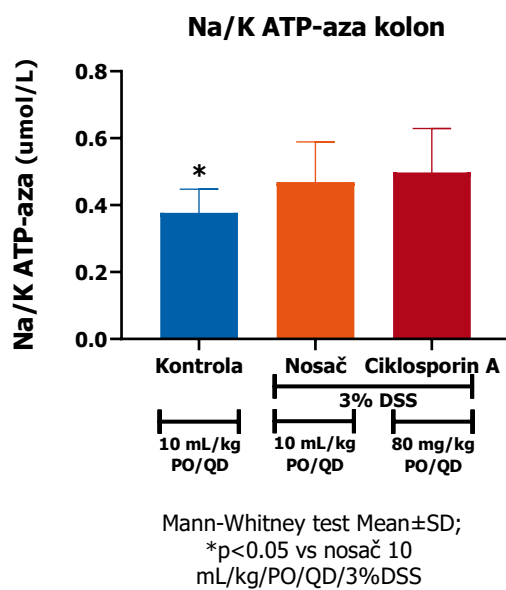
Koncentracije Na⁺/K⁺ ATP-aze iz homogenata crijeva po segmentima prikazane su na grafovima 35-38.

Na grafu 35 prikazane su koncentracije Na⁺/K⁺ ATP-aze u kolonu. Zabilježena je značajna razlika između kontrolne grupe nosača koja je dobivala vodu (prosječna koncentracija 0,377±0,071 umol/L) i grupe tretirane nosačem s 3 % DSS-a koja je imala veću prosječnu koncentraciju (0,469±0,120 umol/L). Prosječna koncentracije u grupi tretiranoj ciklosporinom A iznosila je 0,498±0,132 umol/L.

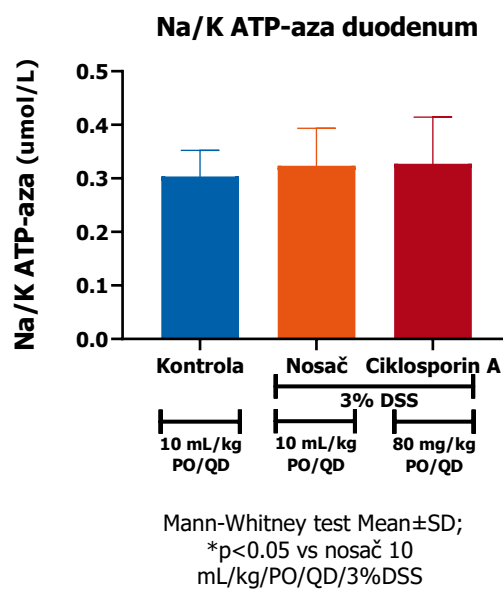
Na grafu 36 prikazane su koncentracije Na⁺/K⁺ ATP-aze u duodenumu. Prosječna koncentracija u kontrolnoj grupi nosača bila je najniža, 0,303±0,049 umol/L, u grupi tretiranoj s nosačem s 3 % DSS 0,324±0,070 umol/L i u grupi tretiranoj ciklosporinom najviša, 0,327±0,087 umol/L. Nije primijećena značajna razlika između grupa.

Na grafu 37 prikazane su koncentracije Na⁺/K⁺ ATP-aze u jejunumu. Značajna razlika zabilježena je između kontrolne grupe nosača koja je dobivala vodu (prosječna koncentracija 0,208±0,044 umol/L) i grupe tretirane nosačem s 3 % DSS-a gdje je izmjerena viša prosječna koncentracija (0,282±0,078 umol/L). Prosječna koncentracije u grupi tretiranoj ciklosporinom A iznosila je 0,276±0,067 umol/L.

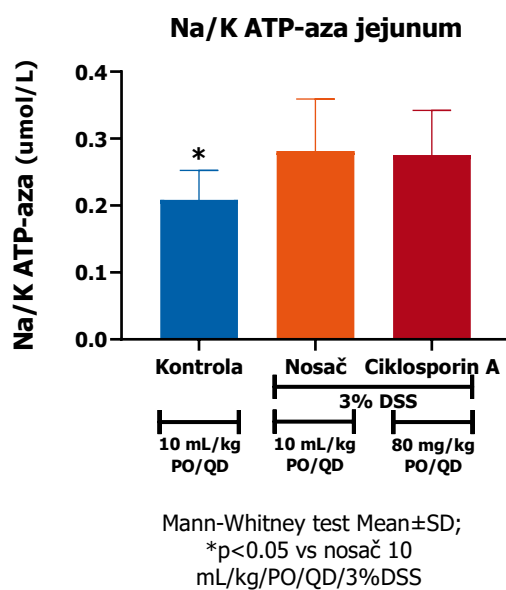
Na grafu 38 prikazane su koncentracije Na⁺/K⁺ ATP-aze u ileumu. Prosječna koncentracija u kontrolnoj grupi nosača bila je najniža, 0,335±0,103 umol/L, u grupi tretiranoj nosačem s 3 % DSS 0,399±0,127 umol/L i u grupi tretiranoj ciklosporinom najviša, 0,401±0,132 umol/L. Nije primijećena statistički značajna razlika između grupa.



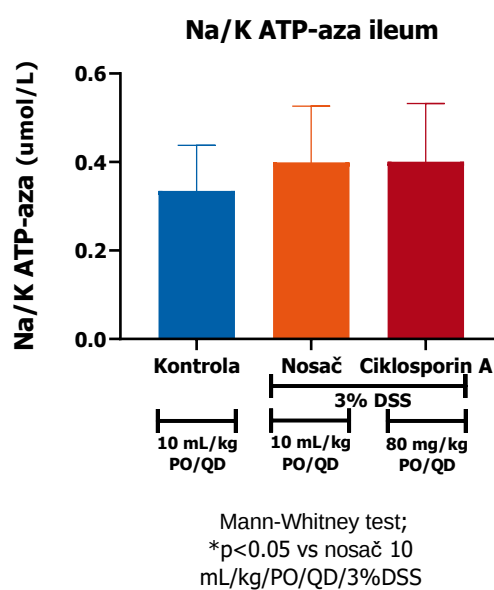
Graf 35 Koncentracija Na/K ATP-aze u kolonu



Graf 36 Koncentracija Na/K ATP-aze u duodenumu



Graf 37 Koncentracija Na/K ATP-aze u jejunumu



Graf 38 Koncentracija Na/K ATP-aze u

Dok literatura pokazuje porast ekspresije koprijenosnika SGLT1 u duodenumu i ileumu (Park i sur., 2019) u akutnom DSS modelu kod miševa, u ovom eksperimentu nismo uspjeli potvrditi taj nalaz. Ovdje, kod životinja koje su tretirane nosačem s 3% DSS-om nema porasta ekspresije SGLT1 ni u jednom segmentu tankog crijeva. Promjena ekspresije je zabilježena u kolonu skupine tretirane nosačem s 3 % DSS-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Ciklosporin A nije pokazao značajan učinak na ekspresiju SGLT1 u odnosu na ostale dvije skupine. U odnosu na SGLT1, GLUT 2 je pokazao veće varijacije u ekspresiji u tankom crijevu, dok promjene u debelom crijevu nisu zamijećene. U duodenumu životinja koje su tretirane nosačem s 3 %DSS-om je primijećen porast, a u jejunumu pad ekspresije, dok u ileumu nije bilo razlike u odnosu na kontrolnu skupinu. Kako je jejunum najduži segment crijeva i u njemu se očekivano odvija i najveći dio prijenosa monosaharida preko stanične membrane, smanjena ekspresija GLUT2 može utjecati na konačnu koncentraciju glukoze u krvi. Također, vidljivi pad ekspresije može biti i posljedica internalizacije proteina koji se odvija pod utjecajem inzulina (Tobin i sur., 2008), međutim ovakav tip promjena se ne može potvrditi ovakvom analizom, ali bi se stanična i substanična lokalizacija mogla dokazati imuno fluorescencijom. Ekspresija GLUT2 u životinjama tretiranih ciklosporinom je u jejunumu i ileumu narasla i vratila se na razinu kontrolnih životinja.

5. ZAKLJUČCI

Ovim diplomskim radom ispitivana je ekspresija prijenosnika uključenih u prijenos glukoze: SGLT1, GLUT2, i Na^+/K^+ ATP-aze preko crijevne stijenke u DSS modelu kolitisa kod miševa koristeći ELISA metodu.

Nakon 8 dana izloženosti DSS-u i tretmana ciklosporinom A pokazano je da:

- 1) 3% DSS u pitkoj vodi kroz vremensko razdoblje od 7 dana izaziva kolitis, čiji su primarni simptomi proljev i krvarenje koji su smanjeni uz tretman ciklosporinom A (80 mg/kg/PO/QD).
- 2) Životinje koje su razvile kolitis imaju smanjenu koncentraciju glukoze u krvi nakon oralnog testa tolerancije na glukozu, što može biti posljedica povišene koncentracije inzulina u krvi.
- 3) Iako je došlo do promjene ekspresije SGLT1 i GLUT2 na crijevnoj stijenci, one nisu dovoljnog intenziteta, uz izuzetak smanjenja GLUT2 u jejunumu, da bi im se mogao pripisati veći utjecaj na apsorpciju glukoze iz probavnog sustava.
- 4) Rezultati podupiru dosadašnja saznanja o povezanosti ugljikohidrata i IBD-a, međutim potrebno je napraviti veći broj detaljnijih analiza kako bi se preciznije odredila uloga navedenih prijenosnika u DSS modelu, a tako i u IBD-u.

6. LITERATURA

Abreu, M. T. (2002) The pathogenesis of inflammatory bowel disease: translational implications for clinicians. *Curr Gastroenterol Rep*, 4, 481–489.

Bang, B., Lichtenberger, L. M. (2016) Methods of inducing inflammatory bowel disease in mice. *Curr Protoc Pharmacol*, 72: 5.58.1-5.58.42.

Baud, G., Raverdy, V., Bonner, C., Daoudi, M., Caiazzo, R., Pattou, F. (2016) Sodium glucose transport modulation in type 2 diabetes and gastric bypass surgery. *Surg Obes Relat Dis*, 12(6), 1206-1212.

Bernstein, C. N., Wajda, A., Blanchard, J. F. (2005) The clustering of other chronic inflammatory diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology*, 129(3), 827-836

Biason-Lauber, A., Böni-Schnetzler, M., Hubbard, B. P., Bouzakri, K., Brunner, A., Cavelti-Weder, C., Keller, C., Meyer-Böni, M., Meier, D. T., Brorsson, C., Timper, K., Leibowitz, G., Patrignani, A., Bruggmann, R., Boily, G., Zulewski, H., Geier, A., Cermak, J. M., Elliott, P., Ellis, J. L., Westphal, C., Knobel, U., Eloranta, J. J., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Konrad, D., Matter, C. M., Fontana, A., Rogler, G., Schlapbach, R., Regairaz, C., Carballido, J. M., Glaser, B., Mc-Burney, M. W., Pociot, F., Sinclair, D. A., Donath, M. Y. (2013) Identification of a SIRT1 mutation in a family with type 1 diabetes. *Cell Metab*, 217, 448-455.

Binus, A. M., Han, J., Qamar, A. A., Mody, E. A., Holt, E. W., Qureshi, A. A. (2012) Associated comorbidities in psoriasis and inflammatory bowel disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 26: 644-650.

Blackburn, D., Hux, J., Mamdani, M. (2002) Quantification of the Risk of Corticosteroid-induced Diabetes Mellitus Among the Elderly. *Gen Intern Med*, 17(9), 717-20.

Bouma, G., Strober, W. (2003) The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 3, 521–533.

Capristo, E., Mingrone, G., Addolorato, G., Greco, A. V., Gasbarrini, G. (1999) Glucose metabolism and insulin sensitivity in inactive inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 13, 209-217.

Catana CS, Neagoe IB, Cosma V, Magdas C, Tabaran F, Dumitrascu DL. Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2015;21(19):5823–30.

Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., Vijay-Kumar, M. (2014) Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr Protoc Immunol*, 104, 15.25.1-15.25.14.

Clore, J. N., Thurby-Hay, L. (2009) Glucocorticoid-induced hyperglycemia. *Endocr Pract*, 15(5), 469-474.

Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. Dostupno na_: web stranica; Pristupljeno: (datum)

Drozdowski, L. A., Thomson, A. B. R. (2006) Intestinal sugar transport. *World J Gastroenterol*, 12(11), 1657–1670.

Dyer, J., Wood, S. I., Palejwala, A., Ellis, A., Shirazi-Beechey, S- P. (2002) Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282(2), G241-248.

Eichele, D. D., Kharbanda, K. K. (2017) Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 23(33), 6016–6029.

Eppinga, H. Peppelenbosch, M. P. (2016) Worsening of Bowel Symptoms Through Diet in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*, 22, E6–7.

Forbes, A., Escher, j., Hébuterne, X., Kłęk, S., Krznaric, Z., Schneider, S., Shamir, R., Stardelova, K., Wierdsma, N., Wiskin, A. E., Bischoff, S. C. (2017) ESPEN guideline: Clinical nutrition in inflammatory bowel disease. *Clin Nutr*, 6 (2), 321-347.

Gaudio, E., Taddei, G., Vetuschi, A., Sferra, R., Frieri, G., Ricciardi, G., Caprilli, R. (1999) Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci*, 44(7), 1458-1475.

Greuter, T., Manser, C., Pittet, V., Vavricka, S. R., Biedermann, L. (2020) Gender Differences in Inflammatory Bowel Disease. *Digestion*, 101(suppl 1), 98–104.

Halligan, D. N., Khan, M. N., Brown, E., Rowan, C. R., Coulter, I. S., Doherty, G. A., Tambuwala, M. M., Ta, C. T. (2019) Inflammation, Immunity, Fibrosis, and Infection Hypoxia-inducible factor hydroxylase inhibition enhances the protective effects of cyclosporine in colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 317, G90–G97.

Hanauer, S. B. (2006) Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities. *Inflamm Bowel Dis*, 12 (suppl 1), S3–S9.

Huda-Faujan, N., Abdulamir, A. S., Fatmiah, A. B., Anas, O. M., Shuhaimi, M., Yazid, A. M., Loong, Y. Y. (2010) The Impact of the Level of the Intestinal Short Chain Fatty Acids in Inflammatory Bowel Disease Patients Versus Healthy Subjects. *Open Biochem. J*, 4, 53-58.

Jiang. M., Wang,, W., Meng, Q., Li, F., Li, K., Luo, L., Sun, C. (2013) Cyclosporin A attenuates weight gain and improves glucose tolerance in diet-induced obese mice. *Mol Cel Endo*, 370(1-2), 96-102.

Kappelman, M. D., Galanko, J. A., Porter, C. Q., Sandler, R. S. (2011) Association of paediatric inflammatory bowel disease with other immune-mediated diseases. *Arch Dis Child*, 96, 1042-1046.

Khan, S., Waliullah, S., Godfrey, V., Khan, A. W., Ramachandran, R. A., Cantarel, B. L., Behrendt, C., Peng, L., Hooper, L. V., Zaki, H. (2020) Dietary simple sugars alter microbial ecology in the gut and promote colitis in mice. *SciTransl Med*, 12 (567): eaay6218.

Kiesler, P., Fuss, I. J., Strober, W. (2015) Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 1, 154–170.

Koepsell, H., (2020) Glucose transporters in the small intestine in health and disease. *Pflug Arch Eur J Phy*, 472, 1207–1248.

Krishnan, A., Korzenik, J. R. (2002) Inflammatory bowel disease and environmental influences. *Gastroenterol Clin North Am*, 31, 21–39.

Laffin, M., Fedorak, R., Zalasky, A., Park, H., Gill, A., Agrawal, A., Keshteli, A., Hotte, N., Madsen, K. L. (2019) A high-sugar diet rapidly enhances susceptibility to colitis via depletion of luminal short-chain fatty acids in mice. *Sci Rep*, 9, 12294.

Limdi, J. K., Aggarwal, D. McLaughlin, J. T. (2016) Diet and Exacerbation of Inflammatory Bowel Disease Symptoms—Food for Thought. *Inflamm Bowel Dis*, 22, E11.

Macia, L., Tan, J., Vieira, A. T., Leach, K., Stanley, D., Luong, S., Maruya, M., McKenzie, C. I., Hijikata, A., Wong, C., Binge, L., Thorburn, A. N., Chevalier, N., Ang, C., Marino, E., Robert, R., Offermanns, S., Teixeira, M. M., Moore, R. J., Flavell, R. A., Fagarasan, S., Mackay, C. R. (2015) Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat Commun*, (6), 6734.

Maconi, G., Furfaro, F., Sciurti, R., Bezzio, C., Ardizzone, S., de Franchis, R. (2014) Glucose intolerance and diabetes mellitus in ulcerative colitis: Pathogenetic and therapeutic implications. *World J Gastroenterol*, 20(13), 3507-3515.

Madunić, I. V., Breljak, D., Karaica, D., Koepsell, H., Sabolić, I. (2017) Expression profiling and immunolocalization of Na⁺-d-glucose-cotransporter 1 in mice employing knockout mice

as specificity control indicate novel locations and differences between mice and rats. *Pflug Arch Eur J Phy* , 469, 1545–1565.

Martin, J. C., Bériou, G., Josien, R. (2016) Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Acute Colitis in the Rat. *Methods Mol Biol*, 1371, 197-203.

Medical statistics from scratch; Ed. Bowers D, Wiley&Sons Ltd., 2002

Melgar, S., Karlsson, L., Rehnström, E., Karlsson, A., Utkovic, H., Jansson, L., Michaëlsson, E. (2008) Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. *Int Immunopharmacol*, 8(6), 836-844.

Melgar, S., Karlsson, L., Rehnström, E., Karlsson, A., Utkovic, H., Jansson, L., Michaëlsson, E. (2008) Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. *Int Immunopharmacol*, 8(6), 836-844.

Merigo, F., Brandolese, A., Facchin, S., Missaggia, S., Bernardi, P., Boschi, F., D’Inca, R., Vincenzo, E., Savarino, A. S., Sturniolo G. C. (2018) Glucose transporter expression in the human colon. *World J Gastroenterol*, 24(7), 775–793.

Mueckler, M., Thorens, B. (2013) The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters. *Mol Aspects Med*, 34(0): 121–138.

Neish, A. S., Gewirtz, A. T., Zeng, H., Young, A. N., Hobert, M. E., Karmali, V., Rao, A. S., Madara, J. L. (2000) Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I κ B- α ubiquitination. *Science*, 289, 1560–1563.

Ng, S. C., Bernstein, C. N., Vatn, M. H. Lakatos, P. L., Loftus, E. V., Tysk, C., O’Morain, C., Moum, B., Colombel, J. F. (2013) Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut*, 62, 630–649.

Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., Kaplan, G. G. (2018) Worldwide

incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*, 390(10114), 2769-2778.

Nishitani, Y., Tanoue, T., Yamada, K., Ishida, T., Yoshida, M., Azuma, T., Mizuno, M. (2009) Lactococcus lactis subsp. cremoris FC alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Int Immunopharmacol*, 9, 1444-1451.

Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., Nakaya, R. (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98, 694–702.

Park, J., Lee, I., Kim, K., Kim, Y., An, E., Jang, H. (2019) GI inflammation Increases Sodium-Glucose Cotransporter Sglt1. *Int J Mol Sci*, 20(10), 2537.

Perše, M., Cerar, A. (2012) Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 1-13.

Podolsky, D. K., (2002) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 347, 417–429.

Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, 2013, Zagreb, Narodne novine, broj 55 (NN 55/13); Dostupno na: (web adresa); pristupljeno (datum)

Racine, A., Carbonnel, F., Chan, S. S, M, Hart, A. R., Bueno-de-Mesquita, B., Oldenburg, B., van Schaik, F. D. M, Tjønneland, A., Olsen, A., Dahm, C .C., Key, T., Luben, R., Khaw, K., Riboli, E., Grip, O., Lindgren, S., Hallmans, G., Karling, P., Clavel-Chapelon, F., Bergman, M. M. Boeing, H., Kaaks, R., Katzke, V. A., Palli, D., Masala, G., Jantchou, P., Boutron-Ruault, M. (2016) Dietary Patterns and Risk of Inflammatory Bowel Disease in Europe: Results from the EPIC Study. *Inflamm Bow Dis*, 22(2), 345–354.

Randhawa, P. K., Singh, K., Singh, N., and Jaggi, A. S. (2014) A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents. *Korean J Physiol Pharmacol*, 18(4), 279–288.

Reif, S., Klein, I. Arber, N., Gilat, T. (1995) Lack of association between smoking and inflammatory bowel disease in Jewish patients in Israel. *Gastroenterology*, 108, 1683–1687.

Sabolić, I., Breljak, D., Ljubojević, M., Brzica, H. (2011) Are mice, rats, and rabbits good models for physiological, pharmacological and toxicological studies in humans? *Period Biol*, 113(1), 7-16.

Sandler, R. S., Loftus, E. V. Jr. (2004) Epidemiology of inflammatory bowel disease. U: Sartor, R. B., Sandborn, W. J., (ur), *Kirsner's Inflammatory Bowel Diseases*, 6th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, str. 245–262.

Satsangi, J., Morecroft, J., Shah, N. B., Nimmo, E. (2003) Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 17(1), 3-18.

Schmitt, C. C., Aranias, T., Viel, T., Chateau, D., Le Gall, M., Waligora-Dupriet, A., Melchior, C., Rouxel, O., Kapel, N., Gourcerol, G., Tavitian, B., Lehuen, A., Brot-Laroche, E., Leturque, A., Serradas, P., Grosfeld, A. (2017) Intestinal invalidation of the glucose transporter GLUT2 delays tissue distribution of glucose and reveals an unexpected role in gut homeostasis. *Mol Metab*, 6(1), 61–72.

Simpson, K. W., Dogan, B., Rishniw, M., Goldstein, R. E., Klaessig, S., McDonough, P. L., German, A. J., Yates, R. M., Russell, D. G., Johnson, S. E., Berg, D. E. Harel, J., Bruant, G., McDonough, S. P., Schukken, Y. H. (2006) Adherent and invasive *Escherichia coli* is associated with granulomatous colitis in boxer dogs. *Infect Immun*, 74, 4778–4792.

Szigethy, E., McLafferty, L., Goyal, A. (2010) Inflammatory Bowel Disease. *Child Adol Psych Cl*, 19(2), 301-318.

Takahashi, K., Nishida, A., Fujimoto, T., Fujii, M., Shioya, M., Imaeda, H., Inatomi, O., Bamba, S., Andoh, A., Sugimoto, M. (2016) Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Digestion*, 93, 59-65.

Thorens, B. (2014) GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia*, 58, 221–232.

Thorsen, K., Drengstig, T., Ruoff, P. (2014) Transepithelial glucose transport and Na⁺/K⁺ homeostasis in enterocytes: an integrative model. *Am J Physiol Cell Physiol*, 307(4), C320–C337.

Tobin V, Le Gall, M., Fioramonti, X., Stolarczyk, E., Blazquez, A. G., Klein, C., Prigent, M., Serradas, P., Cuif, M., Magnan, C., Leturque, E., Brot-Laroche, E., Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes*, 57(3), 555-562.

Tung, D., Cheung, P. H., Tudor, G., Booth, C., Saha, S.(2011) In Vivo Effects of Immunomodulators in a Murine Model of Fluorouracil-Induced Mucositis. *Curr Therap Resear*, 72(6), 262-272.

Wallace , K. L., Zheng, L. B., Kanazawa, Y., Shih, D. Q. (2014) Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 20(1), 6-21.

Wang, H. L., O'Doherty, G. A. (2012) Modulators of Na/K-ATPase: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 22(6), 587-605.

Wang, K., Baldassano, R., Zhang, H., Qu, H. Q., Imielinski, M., Kugathasan, S., Annese, V., Dubinsky, M., Rotter, J. I., Russell, R. K., Bradfield, J. P., Sleiman , P. M., Glessner, J.T., Walters, T., Hou, C., Kim, C., Frackelton, E. C., Garriss, M., Doran, J., Romano, C., Catassi, C., Van Limbergen, J., Guthery, S. L., Denson, L., Piccoli, D., Silverberg, M. S., Stanley, C. A., Monos, D., Wilson, D. C., Griffiths, A., Grant, S. F., Satsangi, J., Polychronakos, C., Hakonarson, H., (2010) Comparative genetic analysis of inflammatory bowel disease and type 1 diabetes implicates multiple loci with opposite effects. *Hum Mol Genet*, 19, 2059-2067.

Wilcox, G. (2005) Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem Rev*, 26(2), 19–39.

Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., Neurath, M. F. (2007) Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*, 2, 541–546.

Wright, E. M., Turk, E. (2004) The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflügers Arch*, 447(5), 510-518.

Yale, J. F., Roy, R. D., Grose, M., Seemayer, T. A., Murphy G. A. Marliss, E. B. (1985) Effects of Cyclosporine on Glucose Tolerance in the Rat. *Diabetes*, 34(12), 1309-1313.

Yoshizaki, T., Schenk, S., Imamura, T., Babendure, J. L., Sonoda, N., Bae, E. J., Oh, D. Y., Lu, M., Milne, J. C., Westphal, C., Bandyopadhyay, G., Olefsky, J. M. (2010) SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298, E419-E428.

Zhang, Y. Z., Li, Y. Y., (2014) Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 20(1), 91–99.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1 Sažetak

Iz pregleda literature jasno je vidljiva povezanost metabolizma ugljikohidrata, upalnih bolesti crijeva (IBD) i šećerne bolesti, kao i uloga prijenosnika monosaharida kod navedenih stanja.

Cilj ovog rada je utvrditi ekspresiju prijenosnika uključenih u prijenos glukoze u gastrointestinalnom sustavu; SGLT1, GLUT2 i Na^+/K^+ ATP-aze u mišjem DSS modelu koristeći ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) metodu. Promatrao se utjecaj farmakološkog standarda ciklosporina A na ekspresiju navedenih transportera.

Muški miševi C57BL/6 soja bili su podijeljeni u tri grupe: kontrolnu grupu koja je tretirana samo nosačem (0,5% metil celuloza), grupu koja je dobivala nosač i 3% DSS i grupu koja je uz DSS dobivala i ciklosporin A (80 mg/kg/PO/QD). Žrtvovanje je provedeno osmi dan i mjereni pokazatelji su bili: promjena tjelesne mase, ocjene konzistencije stolice i fekalnog krvarenja, indeks aktivnosti bolesti, duljina kolona, hematološki i histopatološki parametri te ELISA metodom koncentracije inzulina, serumskog amiloid A proteina, GLUT2, SGLT1 i Na/K ATP-aze mjerene ELISA metodom. Za ispitivanje statističke značajnosti između grupa korišten je Mann–Whitney U test ($p < 0,05$).

U grupi tretiranoj 3% DSS-om zabilježen je značajan porast ocjena konzistencija stolice, kolorektalnog krvarenja, indeksa aktivnosti bolesti te histološke Nishitani ocjene u odnosu na kontrolnu grupu, dok su ocjene u ciklosporinskoj grupi bile niže nego u DSS grupi. Duljina kolona bila je značajnije skraćena u DSS grupi nego u ciklosporinskoj. Hematološki parametri crvene krvne slike bili su sniženi, a ukupan broj leukocita kao i subpopulacija bio je povišen u DSS grupi. U DSS grupi pale su vrijednosti glukoze, a povećala se koncentracija inzulina. Nije primijećen porast ekspresije SGLT1, dok je GLUT2 u DSS grupi bio značajno viši u duodenumu, a niži u jejunumu, u usporedbi s kontrolom. Ekspresija GLUT2 u ciklosporinskoj grupi bila je viša no u DSS grupi. Značajno povećanje ekspresije Na^+/K^+ ATP-aze zamijećeno je u kolonu i jejunumu životinja iz DSS grupe.

Dobiveni rezultati podupiru dosadašnja saznanja o povezanosti ugljikohidrata i IBD-a, međutim potrebno je napraviti veći broj detaljnijih analiza kako bi se preciznije odredila uloga navedenih prijenosnika u DSS modelu, a tako i u IBD-u.

7.2 Summary

Available literature clearly shows the connection between the carbohydrate metabolism, inflammatory bowel disease (IBD) and diabetes, as well as the relevance of glucose transporters in these conditions.

The aim of this work is to determine the expression of the transporters included in the transport of glucose across the intestinal barrier: Sodium Glucose transporter 1 (SGLT1), Glucose transporter 2 (GLUT2), and Sodium/potassium ATPase (Na/K ATPase) in the mouse Dextrane Sodium Sulfate (DSS) model using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The effect of Cyclosporine A, a pharmacological standard, on the expression of the listed transporters will be measured as well.

Male C57BL6 mice were allocated in three groups: control vehicle (0.5% methyl cellulose), vehicle treated group challenged with 3% DSS and finally the group challenged with 3% DSS and treated with Cyclosporine A (80 mg/kg/PO/QD). During the course of the study body weight loss, stool consistency and colorectal bleeding were measured and the sampling was performed on day 8 of the study. Colon length, haematologic and histopathologic parameters were also measured. The concentrations of insulin and serum amyloid A protein in the serum, as well as the expression of GLUT2, SGLT1 and Na/K ATP-ase were measured by ELISA. Mann – Whitney U test ($p < 0,05$) was used to calculate statistical significance.

The group treated with 3% DSS showed significant increase of stool consistency, colorectal bleeding, disease activity index and Nishitani scores when compared to the control group, while the group treated with Cyclosporine A showed significant reduction of these scores. Haematological parameters were decreased, while total leukocyte count, as well as subpopulation counts were increased in the DSS challenged group. The DSS group showed lower concentrations of glucose while the insulin concentration was increased. No significant change of the SGLT1 expression was measured in the small intestines, while GLUT2 showed increased and decreased expression in duodenum and jejunum, respectively, when compared to control group. Significant increase in the expression of Na/K ATP-ase was observed in jejunum and colon in the group of animals treated with DSS.

These results support current knowledge regarding the link between the carbohydrates and IBD, however more detailed analyses are required in order to clearly describe the role of glucose transporters in the DSS model of IBD.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za Farmakologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Ekspresija prijenosnika uključenih u prijenos glukoze u gastrointestinalnom sustavu: SGLT1, GLUT2 i Na⁺/K⁺ ATP-aze u mišjem modelu upalnih bolesti crijeva

Anesa Čajević Glojnarić

SAŽETAK

Iz pregleda literature jasno je vidljiva povezanost metabolizma ugljikohidrata, IBD-a i šećerne bolesti, kao i uloga prijenosnika monosaharida kod navedenih stanja. Cilj ovog rada je utvrditi ekspresiju prijenosnika uključenih u prijenos glukoze u gastro intestinalnom sustavu; SGLT1, GLUT2 i Na/K ATP-aze u mišjem DSS modelu koristeći Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test. Promatrat će se i utjecaj farmakološkog standarda na ekspresiju navedenih transportera. Muški miševi C57BL/6 soja bili su podijeljeni u tri grupe: kontrolnu grupu nosača (0.5% metil celuloza), grupu koja je dobivala nosač i 3% DSS i grupu koja je uz DSS dobivala i ciklosporin A (80 mg/kg/PO/QD). Žrtvovanje je provedeno osmi dan i mjereni pokazatelji su bili – promjena tjelesne mase, ocjene konzistencije stolice i fekalnog krvarenja, indeks aktivnosti bolesti, duljina kolona, hematološki i histopatološki parametri te ELISA metodom koncentracije inzulina, serumskog amiloid A proteina, GLUT2, SGLT1 i Na/K ATP-aze. Za ispitivanje statističke značajnosti između grupa korišten je Mann – Whitney U test ($p < 0,05$). U grupi tretiranoj 3% DSS-om zabilježen je značajan porast ocjena konzistencija stolice, kolorektalnog krvarenja, indeksa aktivnosti bolesti te histološke Nishitani ocjene u odnosu na kontrolnu grupu, dok su ocjene u ciklosporinskoj grupi bile niže nego u DSS grupi. Duljina kolona bila je značajnije skraćena u DSS grupi nego u ciklosporinskoj. Hematološki parametri crvene krvne slike bili su sniženi, a ukupan broj leukocita kao i subpopulacija bio je povišen u DSS grupi. U DSS grupi pale su vrijednosti glukoze, a povećala se koncentracija inzulina. Nije primijećen porast ekspresije SGLT1, dok je GLUT2 u DSS grupi bio značajno viši u duodenumu, a niži u jejunumu, u usporedbi s kontrolom. Ekspresija GLUT2 u ciklosporinskoj grupi bila je viša no u DSS grupi. Značajno povećanje ekspresije Na/K ATP-aze zabilježeno je u kolonu i jejunumu životinja DSS grupe. Dobiveni rezultati podupiru dosadašnja saznanja o povezanosti ugljikohidrata i IBD-a, međutim potrebno je napraviti veći broj detaljnijih analiza kako bi se preciznije odredila uloga navedenih prijenosnika u DSS modelu, a tako i u IBD-u.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 69 stranica, 36 grafičkih prikaza, 5 slika, 4 tablice i 70 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: DSS kolitis, GLUT 2, SGLT1, Na⁺/K⁺ ATP-aza

Mentori: **Dr. sc. Lidija Bach-Roжеcky**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Hrvoje Brzica, znanstveni suradnik

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lidija Bach-Roжеcky**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Hrvoje Brzica, znanstveni suradnik
Dr. sc. Milena Jadrijević-Mladar-Takač, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: veljača 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Biochemistry
Department of Pharmacology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

The expression of glucose transporters in the gastrointestinal system: SGLT1, GLUT2 and Na⁺/K⁺ ATP-ase in mouse inflammatory bowel disease model

Anesa Čajević Glojnarić

SUMMARY

Available literature clearly shows the connection between the carbohydrate metabolism, inflammatory bowel disease (IBD) and diabetes, as well as the relevance of glucose transporters in these conditions. The aim of this work is to determine the expression of the transporters included in the transport of glucose across the intestinal barrier: Sodium Glucose transporter 1 (SGLT1), Glucose transporter 2 (GLUT2), and Sodium/potassium ATPase (Na/K ATPase) in the mouse Dextrane Sodium Sulfate (DSS) model using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The effect of Cyclosporine A, a pharmacological standard, on the expression of the listed transporters will be measured as well. Male C57BL/6 mice were allocated in three groups: control vehicle (0.5% methyl cellulose), vehicle treated group challenged with 3% DSS and finally the group challenged with 3% DSS and treated with Cyclosporine A (80 mg/kg/PO/QD). During the course of the study body weight loss, stool consistency and colorectal bleeding were measured and the sampling was performed on day 8 of the study. Colon length, haematologic and histopathologic parameters were also measured. The concentrations of insulin and serum amyloid A protein in the serum, as well as the expression of GLUT2, SGLT1 and Na/K ATPase were measured by ELISA. Mann – Whitney U test ($p < 0,05$) was used to calculate statistical significance. The group treated with 3% DSS showed significant increase of stool consistency, colorectal bleeding, disease activity index and Nishitani scores when compared to the control group, while the group treated with Cyclosporine A showed significant reduction of these scores. Haematological parameters were decreased, while total leukocyte count, as well as subpopulation counts were increased in the DSS challenged group. The DSS group showed lower concentrations of glucose while the insulin concentration was increased. No significant change of the SGLT1 expression was measured in the small intestines, while GLUT2 showed increased and decreased expression in duodenum and jejunum, respectively, when compared to control group. Significant increase in the expression of Na/K ATPase was observed in jejunum and colon in the group of animals treated with DSS. These results support current knowledge regarding the link between the carbohydrates and IBD, however more detailed analyses are required in order to clearly describe the role of glucose transporters in the DSS model of IBD.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 69 pages, 36 charts, 5 pictures, 4 tables and 70 references. Original is in Croatian language.

Keywords: DSS colitis, GLUT2, SGLT1, Na⁺/K⁺ ATPase

Mentors: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.
Hrvoje Brzica, Ph.D. scientific associate

Reviewers: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Hrvoje Brzica, Ph.D. scientific associate
Milena Jadrijević-Mladar-Takač, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: February 2021.