

Ivana Čaleta

**Kvantifikacija fekalnog eozinofilnog kationskog
proteina**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Diplomski rad je prijavljen na predmetu Biokemija Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić i suvoditeljstvom dr. sc. Renate Zrinski Topić.

Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Karmeli Barišić na svim savjetima, nesebičnoj pomoći, potrošenom vremenu i iskazanom strpljenju u izradi mog diplomskog rada. Također, hvala mojoj suvoditeljici dr. sc. Renati Zrinski-Topić na korisnim preporukama, strpljivosti i uloženom trudu pri izradi ovog diplomskog rada.

Beskrajno hvala mojoj obitelji, posebno mojim roditeljima i mojoj sestri koji su mi kroz cijeli studij bili bezuvjetna potpora i bez kojih danas ne bih bila gdje jesam.

Svojim prijateljicama iz srednje škole, Amini i Magdaleni, hvala što su bile uz mene i uljepšale mi studiranje. Kolegama i kolegicama s faksa, Aniti, Katarini i ostalima, hvala na lijepim trenucima po kojima ću pamtiti studentske dane.

Zahvaljujem se ekipi iz učeničkog doma Tin Ujević, u kojemu sam provela godine studiranja, na svim sretnim trenucima i zbog kojih su mi te godine bile manje stresne.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. EOZINOFILNI GRANULOCITI I ECP	2
1.2. UPALNE BOLESTI CRIJEVA (IBD)	3
1.2.1. Crohnova bolest	3
1.2.2. Ulcerozni kolitis	4
1.2.3. Kolagenozni kolitis	4
1.3. UPALNE BOLESTI CRIJEVA KOD DJECE	5
1.3.1. Klinička slika upalne bolesti crijeva u pedijatrijskih pacijenata	5
2. OBRAZLOŽENJE TEME	7
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1. MATERIJALI	9
3.1.1. Pribor i reagensi	9
3.2. METODE	10
3.2.1. Postupak ekstrakcije ECP-a iz fecesa	10
3.2.2. Modifikacija originalnog postupka	12
3.2.3. Stabilnost ECP-a u stolici	15
3.2.4. Analiza uzoraka pomoću Phadia100 UniCAP	15
3.2.4.1. ImmunoCAP ECP test	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. REZULTATI	17
4.1.1. Fekalne koncentracije ECP-a određene prema originalnom postupku	17
4.1.2. Utjecaj duljine inkubacije na izmjerene fekalne koncentracije ECP-a	18
4.1.3. Utjecaj razrjeđenja homogenata, inkubacijske otopine i načina pripreme homogenata na izmjerene koncentracije ECP-a	19
4.1.4. Stabilnost i ponovljivost mjerenja koncentracije ECP-a	20
4.2. RASPRAVA	21
4.2.1. Rasprava o metodi	22
4.2.2. Problemi metode	22
6. LITERATURA	25
7.1. Sažetak	30
7.2. Summary	31
8. PRILOZI	32

8.1. Kratice	32
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Eozinofilni granulociti imaju aktivnu ulogu u brojnim poremećajima kao što su alergijski, upalni i maligni poremećaji. Specifične granule eozinofilnih leukocita sadrže nekolicinu kationskih proteina kao što su eozinofilni kationski protein (ECP), eozinofilni protein X (EPX)/eozinofilni neurotoksin (EDN), glavni bazični protein (MBP) i eozinofilna peroksidaza (EPO). Ovi proteini imaju jak citotoksični učinak i otpuštaju se nakon aktivacije i stimulacije stanica. Intestinalna sluznica pacijenata s upalnom bolesti crijeva (IBD) karakterizirana je oštećenjem epitelnih stanica i infiltracijom različitih upalnih stanica. Upalne stanice obuhvaćaju neutrofilne granulocite, limfocite, plazma stanice, makrofage i eozinofilne granulocite. Neutrofilni granulociti u svojim granulama sadrže različite proteine kao što su laktoferin, polimorfonuklearna (PMN)-elastaza, mijeloperoksidaza i lizozimi (Saitoh i sur., 1999.).

Unazad nekoliko desetljeća dokazana je povezanost povišenih fekalnih razina proteina koji potječu iz granula neutrofilnih leukocita s aktivnim IBD-om. Uz neutrofilne biopokazatelje pojavili su se dodatni koji se smatraju važnima u patološkom procesu IBD-a, uključujući već spomenuti eozinofilni protein ECP, bazični protein, koji pokazuje aktivnost eozinofilnih granulocita u upalnim procesima.

1.1. EOZINOFILNI GRANULOCITI I ECP

Eozinofilni granulociti važne su efektorske stanice upalnoga odgovora. Ove stanice višestrukih bioloških funkcija uključene su u patogenezu brojnih procesa kao što su infekcije uzrokovane bakterijama, virusima ili parazitima, oštećenje tkiva i popravak, alergijske reakcije, astma i gastrointestinalni poremećaji (Rothenberg, 1998.; Weller, 1994.). Također mogu djelovati kao modulatori urođene i stečene imunosti. Eozinofilni leukociti su u malom broju prisutni u cirkulaciji i pretežno se smatraju stanicama lokaliziranim u različitim tkivima, gdje mogu preživjeti do nekoliko tjedana. U zdravih pojedinaca eozinofili su najistaknutiji u lamini proprii crijeva i u limfatičkom sustavu, ali su također prisutni u plućima i koži (Rothenberg i sur., 1987.; Wagner, 2010.). Eozinofili u svojoj strukturi sadrže granule u kojima se nalaze visoko kationski proteini koji se otpuštaju njihovom aktivacijom. Eozinofilni kationski protein (ECP) jedan je od proteina smještenih u primarnom matriksu granula eozinofila i uključen je u sustav imunosnog odgovora. Eozinofilni sekrecijski proteini također su aktivni u obrani domaćina od bakterijskih, parazitskih i virusnih infekcija. Osim toga, citotoksičnost ECP-a može oštetiti stanice epitela domaćina i eozinofili se smatraju prvim leukocitima odgovornima za oštećenje tkiva u upalnim bolestima (Boix i sur., 2001.). Citotoksični mehanizam temelji se na sposobnosti ECP-a da stvara pore u membranama stanica. Te pore, koje su promjera oko 5 nm, omogućuju prolaz vode i drugih malih molekula i uništavaju pogođene stanice osmotskom lizom (Venge i sur., 1999.). Regrutacija i degranulacija eozinofilnih granulocita korelira s patogeneзом astme i upale zbog virusnih infekcija. Specifično otpuštanje sekrecijskih proteina iz granula aktivacijom eozinofila analizirano je mjerenjem koncentracije ECP-a u biološkim tekućinama i uočena je korelacija s nekoliko efektorâ eozinofilnih stanica, kao što su imunoglobulini i komponente sustava komplementa (Boix i sur., 2001.).

Na genskoj razini, ECP sekvenca pokazuje visoku homologiju sa sekvencom EDN-a, još jednog proteina matriksa eozinofilnih granula. ECP, zbog homologije s ljudskom ribonukleazom (RNaza) i RNazama drugih vrsta kralježnjaka, također je poznat kao RNaza 3. Zajedno s EDN-om (poznat kao RNaza 2) čine ribonukleotidne enzime koji pripadaju superobitelji pankreasnih RNaza. ECP ima tri potencijalna glikozilacijska mjesta za šećerne strukture povezane preko asparginskog ostatka, a opisana su tri glikozilirana oblika nativnog ECP-a (s molekulskim masama od 18-, 20- i 22- kDa) (Peterson i sur., 1998.; Rosenberg i sur., 1994.) Nedavne studije pokazuju da diferencijalna glikozilacija ECP-a može biti kritična za regulaciju njegove biološke funkcije (Boix i sur., 2001.; Bystorm i sur., 2011.).

Serumske koncentracije ECP-a, te koncentracije u iskašljaju i ostalim tekućinama trenutno se koriste kao biopokazatelji za dijagnozu i praćenje terapijske učinkovitosti u akutnim i kroničnim upalnim bolestima, kao i kod drugih sindroma hipereozinofilije (Boix i sur., 2001.).

1.2. UPALNE BOLESTI CRIJEVA (IBD)

IBD obuhvaća ulcerozni kolitis, Crohnovu bolest i kolagenozni kolitis. To su poremećaji kroničnog karaktera koji su posljedica upalnog procesa u probavnom traktu, najčešće u tankom i debelom crijevu. Bolesti se razlikuju u lokaciji i prirodi upalnih promjena u probavnom traktu. Glavna karakteristika Crohnove bolesti jest transmuralnost upale koja može zahvatiti bilo koji dio probavne cijevi za razliku od ulceroznog kolitisa kod kojeg je upala ograničena samo na sluznicu kolona, a promjene se nalaze u kontinuitetu od rektuma prema proksimalnim dijelovima crijeva. Crohnova bolest i ulcerozni kolitis povezani su s komplikacijama i izvan probavnog sustava kao što su artritis, psorijaza, iritis, uveitis, problemi s jetrom itd. Mnoge od ovih komplikacija rezultat su agresivnih lijekova koji se koriste u liječenju osnovne bolesti, prvenstveno kortikosteroida i imunosupresiva. Simptomi ove dvije bolesti su slični: proljev, bol u trbuhu, krv i sluz u stolici. Ovi simptomi mogu se pojaviti, a zatim nestati s remisijama koje ponekad traju godinama. Bolovi u crijevima mogu također upućivati na ozbiljna stanja, kao što su apcesi ili perforacije crijevnih stijenke (informacije pružete sa web stranice Hrvatskog udruženja za Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis, www.hucuk.hr).

1.2.1. Crohnova bolest

Crohnova bolest predstavlja kroničnu transmuralnu upalu koja obično zahvaća distalni ileum i kolon ali također može nastati u bilo kojem dijelu gastrointestinalnog trakta. Uzrok Crohnove bolesti nije poznat, ali se sumnja na kombinaciju genske sklonosti i okolišnih čimbenika. Simptomi su proljev i bolovi u trbuhu. Moguć je nastanak apscesa, unutarnjih i vanjskih fistula kao i opstrukcije crijeva. Dijagnoza se postavlja pomoću kolonoskopije ili irigografije. Liječenje uključuje 5-aminosalicilnu kiselinu (5-ASA), kortikosteroide, imunomodulatore, anticitokine, antibiotike a često i kirurške zahvate. Iako je Crohnova bolest dugotrajna, kronična, liječenjem se može držati pod kontrolom te postići duga razdoblja bez simptoma (remisije). Liječenje se prilagođava svakom pacijentu posebno te ovisi o pogođenom dijelu probavnog sustava, tipu simptoma i aktivnosti bolesti. Brojna istraživanja

provode se kako bi se rasvijetlio uzrok bolesti te pronašli novi oblici liječenja (informacije pruzete sa web stranice Hrvatskog udruženja za Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis, www.hucuk.hr).

1.2.2. Ulcerozni kolitis

Ulcerozni kolitis upalna je bolest crijeva obilježena ponavljanim epizodama upale ograničene na sluznicu debelog crijeva. Gotovo uvijek uključuje završni dio debelog crijeva, rektum, a može se proširiti i na ostale njegove dijelove. Mogući su i ekstraintestinalni simptomi, poglavito artritis. U ovih bolesnika veliki je dugoročni rizik nastanka karcinoma. Dijagnoza se postavlja kolonoskopijom, a ulcerozni se kolitis prepoznaje temeljem karakteristične povijesti bolesti, tipičnog izgleda debelog crijeva za vrijeme endoskopske pretrage i rezultata analize tkiva. Rendgenska pretraga pomoću barijeve kaše može potvrditi dijagnozu, ali obično nije nužna. Kompjutorizirana tomografija može prikazati značajno zadebljanje zida debelog crijeva, ali ovaj se nalaz ne nalazi isključivo kod ulceroznog kolitisa. U dijagnostičkom postupku značajna je informacija o postojanju ulceroznog kolitisa kod članova obitelji i prvih rođaka. Liječi se davanjem 5-ASA, kortikosteroida, imunomodulatora, anticitokina, antibiotika, a ponekad i kirurški (informacije pruzete sa web stranice Hrvatskog udruženja za Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis, www.hucuk.hr).

1.2.3. Kolagenozni kolitis

Kolagenozni kolitis tip je mikroskopskog kolitisa, stanja karakteriziranog kroničnim tekućim ne-krvavim proljevom. Osobe s kolagenoznim kolitisom imaju normalnu stolicu i sliku crijeva kad se ono procjenjuje endoskopom, no mikroskopska analiza biopsije crijeva pokazuje upalu. Bez analize tkiva rezultati mogu voditi do krivih dijagnoza gastroenteritisa, upalne bolesti crijeva, celijakije ili stresa. Uzrok ovog poremećaja nije poznat. Mikroskopskim pregledom tkiva otkriva se zadebljani sloj subepitelnog kolagena. Slojevi kolagena prisutnih u normalnim crijevima odgovorni su za povezivanje površinskih slojeva crijeva, epitelnih stanica, s drugim unutrašnjim slojevima intestinalnog zida. Kod kolagenoznog kolitisa, ovaj je sloj značajno deblji (približno 5 puta) i praćen je povećanjem broja limfocita, plazma stanica i eozinofila u pogođenim slojevima (www.cochrane.org; www.badgut.org).

1.3. UPALNE BOLESTI CRIJEVA KOD DJECE

1.3.1. Klinička slika upalne bolesti crijeva u pedijatrijskih pacijenata

Kao i kod odraslih, klinička slika IBD-a u djece procjenjuje se s obzirom na lokaciju bolesti i stupanj upale. Najčešći simptomi ulceroznog kolitisa obuhvaćaju gubitak težine, rektalno krvarenje, proljev i abdominalnu bol, dok simptomi više karakteristični za Crohnovu bolest jesu napadi bolova u trbuhu i gubitak težine. Kod 35% pedijatrijskih pacijenata s IBD-om javlja se najmanje jedna manifestacija izvan probavnog trakta, od kojih je najčešći artritis. Iako tipično paralelni s pogoršanjem bolesti u odraslih, ekstraintestinalni simptomi kod djece s IBD-om mogu nastupiti godinama prije nego gastrointestinalni simptomi (Cuffari, 2009.).

Tablica 1. Kliničke manifestacije IBD-a izvan probavnog sustava.

SUSTAV U ORGANIZMU	SIMPTOMI
KRV	Anemija uzrokovana deficijencijom željeza
	Anemija kronične bolesti
	Trombocitoza
	Autoimuna hemolitička anemija
	Deficijencija vitamina B12
KOSTI	Osteoporoza
OKO	Uveitis
	Episkleritis
	Konjuktivitis
OPĆENITO	Vrućica
	Umor
	Gubitak težine
	Anoreksija
RAST	Odgođeni rast
	Odgođeni pubertet
ZGLOBOVI	Atralgija
	Artritis
	Ankilozni spondilitis
BUBREZI	Nefrolitijaza
	Opstruktivna hidronefroza
	Enterovezikalna fistula
	Infekcije urinarnog trakta
	Amiloidoza
JETRA	Primarni sklerozni kolangitis
	Hepatitis

	Kolelitijaza
PLUĆA	Pulmonarni vaskulitis
	Tromboza
USTA	Heilitis
	Stomatitis
	Afte
PANKREAS	Pankreatitis
KOŽA	Erythema nodosum
	Pyoderma gagenosum
	Perianalna bolest
	Metastatska Crohnova bolest

Broj eozinofilnih granulocita u upalnim tkivima najčešće korelira s koncentracijama eozinofilnih proteina, a posebice se to odnosi na ECP. ECP jest dobar indikator aktivnosti eozinofila. Ukoliko upala posredovana eozinofilima igra ulogu u nekom procesu, ECP se može koristiti za praćenje upalne komponente. Zahvaljujući širokoj rasprostranjenosti eozinofila u tkivima i tjelesnim tekućinama, primjerice serum, plazma, iskašljaj, suze, feces, omogućena su brojna ispitivanja povezanosti ECP-a s patološkim procesima kod upalnih stanja. Nedavno je predložen kao fekalni biopokazatelj upale crijeva kod nekoliko imunoposredovanih bolesti s gastrointestinalnom ekspresijom (Saitoh i sur., 1999.; Peterson i sur., 2002.). Zbog nedostatka informacija u dječjoj dobi, potrebno je definiranje referentnih vrijednosti prije daljnjih kliničkih ispitivanja.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Ulcerozni kolitis, Crohnova bolest i neklasificirana upalna bolest crijeva, a u širem smislu i mikroskopski kolitidi (limfocitni i kolagenozni kolitis) kronične su bolesti gastrointestinalnog trakta koje pripadaju upalnim bolestima crijeva. IBD je karakteriziran kroničnim tijekom i relapsom bolesti. Upalne lezije kod ulceroznog kolitisa i nedeterminiranog kolitisa locirane su u sluznici kolona, ali kod Crohnove bolesti mogu se nalaziti u bilo kojem dijelu probavnog trakta. Upala intestinalnog tkiva karakterizirana je akumulacijom upalnih stanica u pogođenom tkivu i otpuštanjem više upalnih medijatora u izvanstanični prostor (Wędrychowicz i sur., 2014.)

IBD je, osim upalnim lezijama u crijevima, karakteriziran i edemom sluznice i ulceracijama s osiromašivanjem vrčastih stanica i poremećajem proizvodnje sluzi. Histopatološkim analizama uzoraka upaljene sluznice dobivenih biopsijom opisane su intenzivne infiltracije limfocita, neutrofila i eozinofila. Eozinofili također imaju sposobnost migracije kroz stanice epitela probavne sluznice i stvaranja apcesa u IBD-u. Povećana infiltracija eozinofila zabilježena je u sluznici kolona kod pacijenata s aktivnim ulceroznim kolitisom (Fyderek i sur., 2009.; Woodruff i sur., 2011.; Luck i sur., 1997.).

IBD, uključujući Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis, najčešće započinju tijekom adolescencije i kod mlađih odraslih ljudi. Studija koju su proveli Abramson i suradnici u SAD-u pokazala je da se kod približno 25% pacijenata s IBD-om javlja prije 20 godine. Među djecom s IBD-om, kod 4% bolest se javlja prije 5. godine života, a kod 18% javlja se prije 10. godine s vrhuncem u adolescenciji. Incidencija pedijatrijskog IBD-a približno je 10 na 100000 djece u SAD-u i Kanadi i dalje raste (Abramson i sur., 2010.; Adamiak i sur., 2013.; Benchimol i sur., 2011.). Epidemiologija bolesti u zemljama zapadne Europe također ukazuje na povećanu incidenciju bolesti u djece i adolescenata tijekom zadnja tri desetljeća dok su se godine javljanja simptoma smanjile (Lindberg i sur., 2000.).

Procjena aktivnosti bolesti jest vrlo važna u dugoročnoj skrbi i terapiji djece sa IBD-om zbog kronične prirode bolesti i pojave relapsa. Za potpunu procjenu ozbiljnosti bolesti u lumenu gastrointestinalnoga trakta potrebno je izvesti endoskopiju koja je pouzdana metoda. Međutim zbog svoje invazivne naravi i visoke cijene, postoji potreba određivanja laboratorijskih pokazatelja kao indikatora aktivnosti bolesti metodom koja bi mogla biti pouzdana u procjeni intenziteta upalnih lezija u crijevima (Wędrychowicz i sur., 2014.). Budući da pojedine studije smatraju ECP kao izvrstan pokazatelj eozinofilne aktivnosti kod upalnih procesa gastrointestinalnog sustava povećan je interes za pronalaskom jednostavne,

neinvazivne i pouzdane metode koja bi se mogla koristiti za kvantifikaciju ECP-a posebice kod pedijatrijskih pacijenata.

Cilj ovog diplomskog rada jest ispitivanje primjenjivosti metode opisane u znanstvenom radu Petersona i suradnika (Peterson i sur., 2002.) za kvantifikaciju ECP-a u uzorcima fecesa.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Pribor i reagensi

Koncentracije ECP-a u uzorcima fecesa analizirani su na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Odjelu za medicinsku biokemiju i hematologiju Zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Klinike za dječje bolesti Zagreb.

Prilikom ispitivanja korišteni laboratorijski pribor i uređaji su:

- 1) epruvete od 1,5 mL i 2,0 mL (Eppendorf, Njemačka)
- 2) pipete od 10, 100 i 1000 μ L i pripadajući nastavci s filterom (Eppendorf, Njemačka)
- 3) ultrazvučni sonikator Ultrasonic Processor UP100H (Hielscher-Ultrasound Technology, Njemačka)
- 4) digitalna vaga (Kern & Sohn GmbH, Njemačka)
- 5) centrifuga (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Njemačka)
- 6) Phadia UniCap100 uređaj za analizu (Phadia® Laboratory Systems, Švedska)

Glavni reagensi korišteni za određivanje koncentracije ECP-a u fecesu:

- 1) destilirana voda
- 2) fosfatni pufer (pH=7,4)
- 3) glicerol (Kemika, Hrvatska)
- 4) goveđi serumski albumin (BSA; Sigma-Aldrich, SAD)
- 5) etilendiamintetraocetna kiselina (EDTA; Sigma-Aldrich, SAD)
- 6) N-cetil-N,N,N-trimetilamonijev-bromid (CTAB; Sigma-Aldrich, SAD)
- 7) ImmunoCAP® ECP kalibrator 200 μ g/L (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- 8) polietilen glikol sorbitan monolaurat/polioksietilensorbitan monolaurat (Tween 20; Sigma-Aldrich, SAD)

3.2. METODE

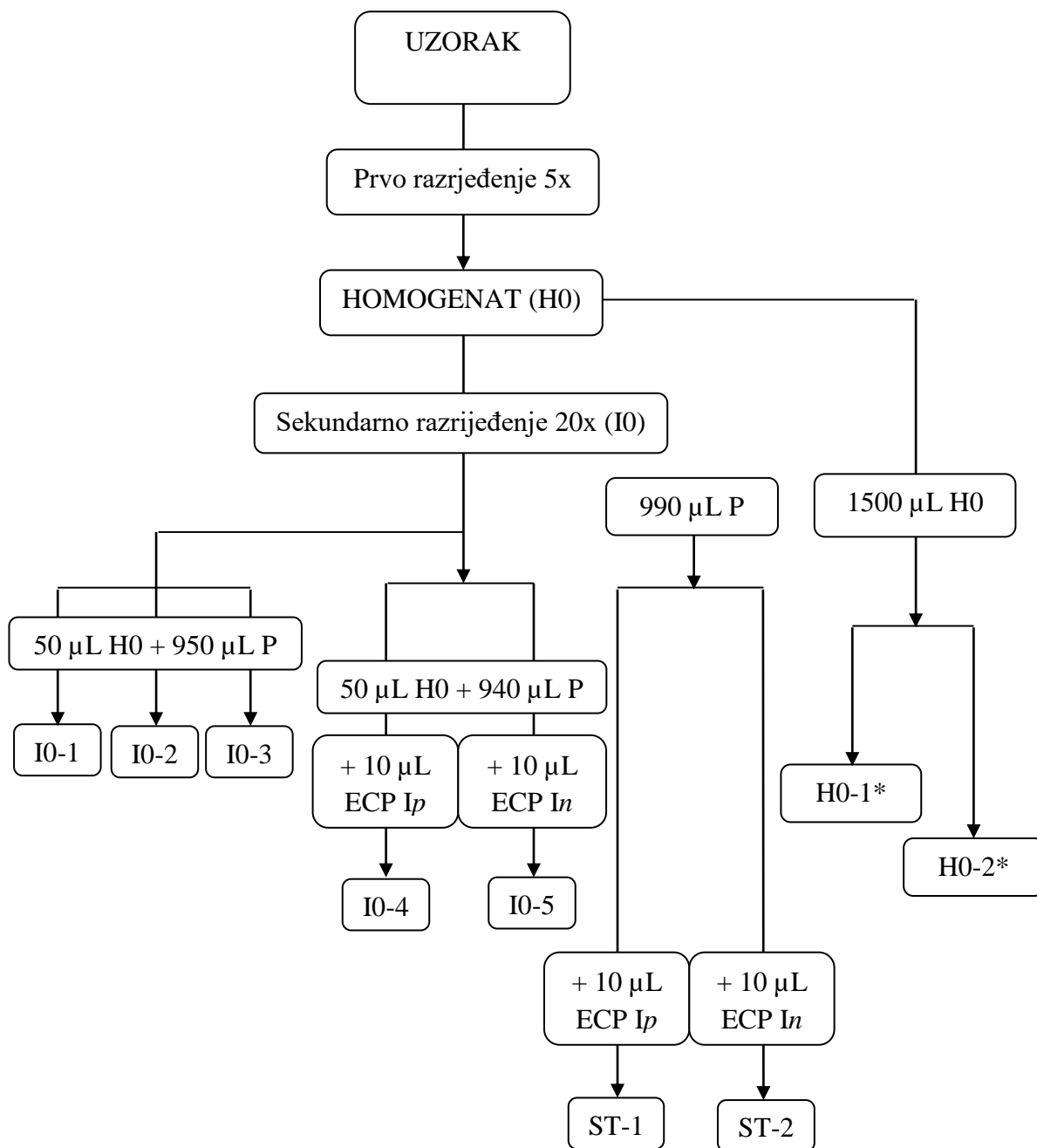
Uzorci stolice nasumice skupljeni smrznuti su odmah na -27°C ili pohranjeni u hladnjaku maksimalno 12 h prije smrzavanja. Uzorci stolice ostavljeni su preko noći u hladnjaku ili na sobnoj temperaturi koristeći ventilator kako bi se odmrznuli. Izvagano je približno 0,1-1 g fecesa i resuspendirano (pipetiranjem) u 4 volumena ekstrakcijskog pufera (fosfatni pufer pH 7,4, 10 mmol/L EDTA, 0,2% CTAB, 20% glicerol, 0,05% Tweenom 20, 1% BSA). Nakon toga, 0,5 mL homogenata (H0-5x dil) razrijeđeno je 20 puta ekstrakcijskim puferom (I0). Tako razrijeđeni homogenat inkubiran je na 6°C tijekom 30 minuta uz lagano miješanje. Pozavršetku inkubacije reakcijska smjesa podvrgne se centrifugiranju (20800 x g 30 minuta na 5°C). Supernatant se prenese u tri epruvete i zamrzne na -27°C za daljnju analizu. Dvije posebne epruvete, koje su sadržavale 1500 μL 5x razrijeđenog homogenata, izvagane su i centrifugirane na 20800 x g tijekom 30 minuta na 5°C . Masa polusuhog ostatka dobije se nakon odbacivanja supernatanta i vaganjem taloga (Peterson i sur., 2002.).

3.2.1. Postupak ekstrakcije ECP-a iz fecesa

U pokusu je primijenjen originalno opisan postupak (Peterson i sur., 2002.) uz resuspenziju fecesa u ekstrakcijskom puferu pipetiranjem,

Homogenat fecesa (H0-5xdil) priređen je dodatkom 400 μL ekstrakcijskoga pufera na 0,1 g fecesa (razrjeđenje 5 x, u Eppendorf epruveti od 1,5 mL). Po 50 μL H0-5xdil preneseno je u nove 3 epruvete označene kao I0-1, I0-2, I0-3 i dodano 950 μL ekstrakcijskog pufera (H0-5xdil razrijeđen 20 x). Epruvete I0-4 i I0-5 sadržavale su 50 μL H0-5xdil, 940 μL ekstrakcijskog pufera i 10 μL ECP standarda (ImmunoCAP® ECP kalibrator 200 $\mu\text{g/L}$). Epruvete u kojima je dodan referentni ECP razlikovale su se u vremenu njegovog dodavanja u inkubacijsku smjesu, gdje je u prvu epruvetu (I0-4+ECP) standard dodan prije, a u drugu (I0-5+ECP) nakon reakcijske smjese (30 min, $+6^{\circ}\text{C}$, lagano miješanje). Osim toga, pripremljene su dvije standardne otopine ST-1 i ST-2 koje su sadržavale 990 μL ekstrakcijskog pufera i 10 μL ECP standarda koncentracije 200 $\mu\text{g/L}$.

U dvije posebne Eppendorf epruvete od 1,5 mL, prethodno izvagane, preneseno je 1500 μL H0-5xdil (epruvete H0-5xdil-1, H0-5xdil-2), potom su centrifugirane (20800 x g, 30 min, $+5^{\circ}\text{C}$) te izvagane nakon odbacivanja supernatanta. Razlikom mase epruvete s talogom (m_2) i mase prazne epruvete (m_1) dobiva se masa polusuhog ostatka ($\text{SDMI} = m_2 - m_1$).



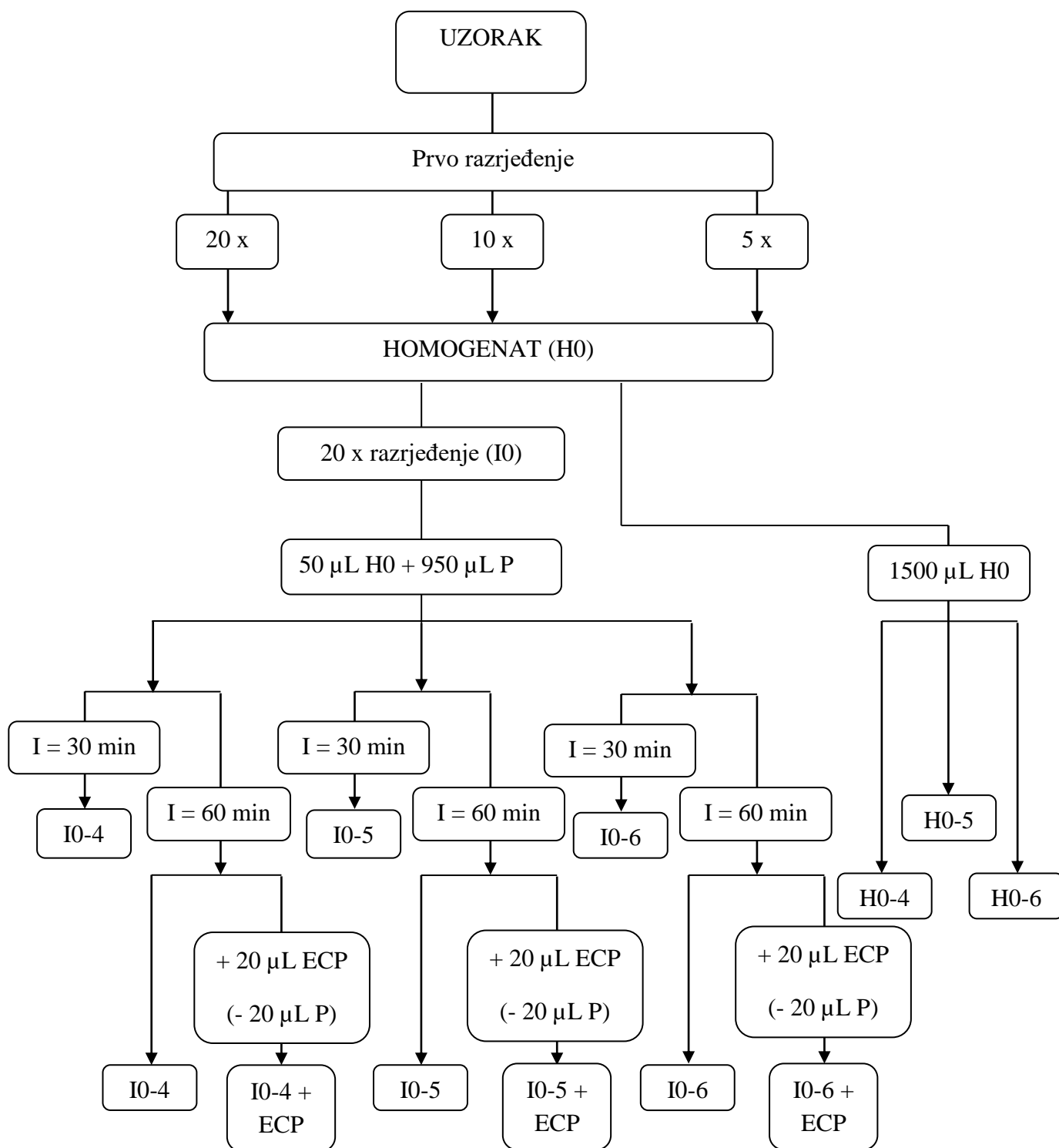
	H	H0*	I0	Ip	In	P
LEGENDA	Homogenat	Masa polusuhog ostatka	Inkubacijska smjesa pripravljena resuspenzijom	Inkubacija prije dodatka ECP standarda (200 µg/L)	Inkubacija nakon dodatka ECP standarda (200 µg/L)	Ekstrakcijski pufer

Slika 1. Shematski prikaz postupka prema originalnoj metodi.

3.2.2. Modifikacija originalnog postupka

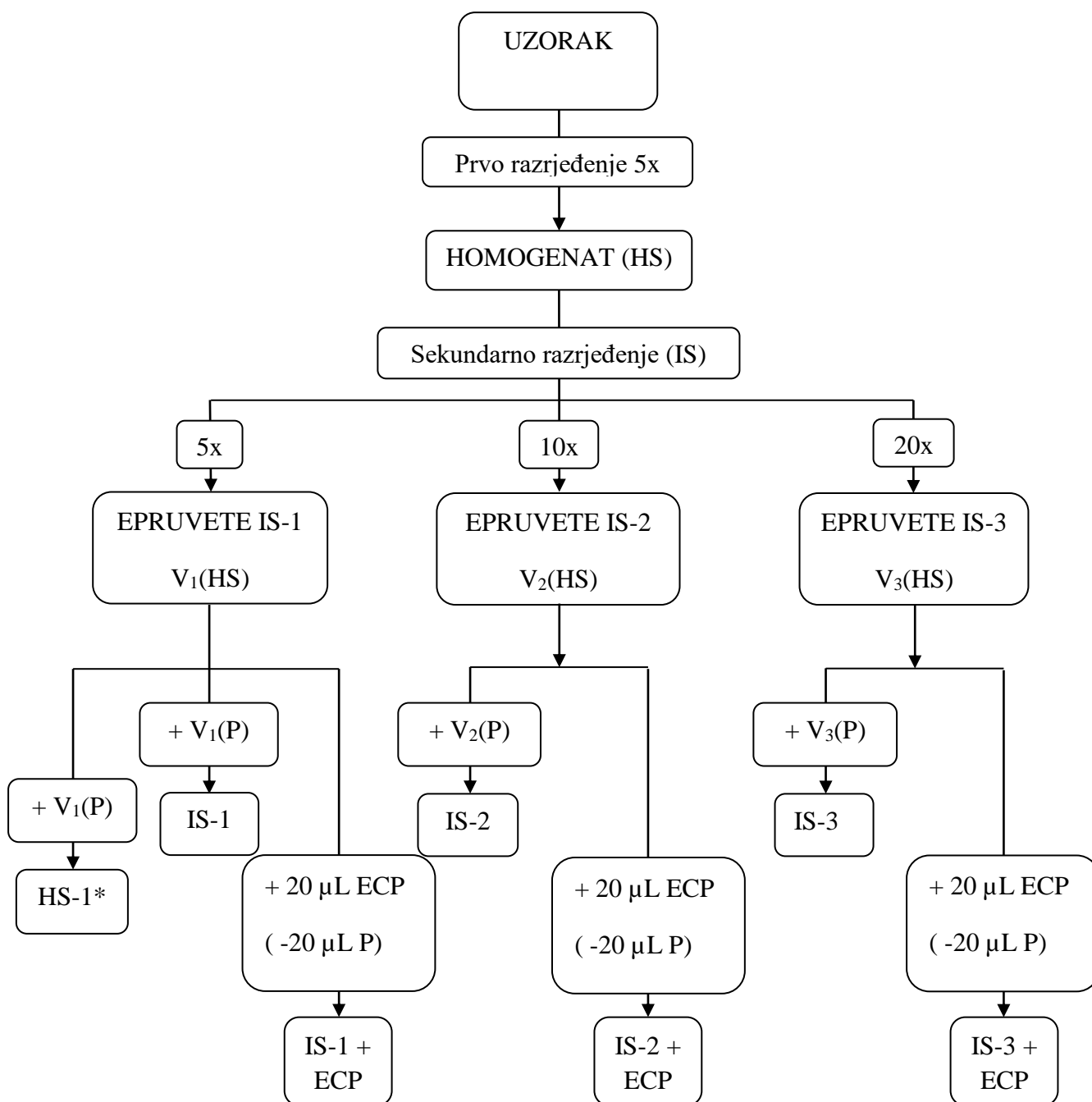
Originalni postupak modificiran je na dolje navedene načine. U prethodno opisani postupak (3.2.1.) uvedene su sljedeće izmjene:

1. priređeni su različiti homogenati razrjeđenjem ekstrakcijskim puferom 5 puta (H0-5xdil), 10 puta (H0-10xdil) i 20 puta (H0-20xdil).
2. vrijeme inkubacije produljeno je na 60 min.
3. za pripremu homogenata (HS) korišten je ultrazvučni sonikator Ultrasonic Processor UP100H (Hielscher-Ultrasound Technology) pri uvjetima od 100 W, 30 kHz te amplitudi 20%. HS-5xdil je homogeniziran u 3 serije po otprilike 20 sekundi s određenim vremenskim razmacima između svakog soniciranja.
4. priređene su različite inkubacijske smjese s 5 puta (I0-5xdil, IS-5xdil), 10 puta (I0-5xdil, IS-10xdil) i 20 puta (I0-5xdil, IS-20xdil) razrjeđenjem HS-5xdil u ekstrakcijskom puferu



	m	H	H0*	I	I0	P
LEGENDA	Masa uzorka	Homogenat	Masa polusuhog ostatka	Inkubacija	Inkubacijska smjesa pripremljena resuspenzijom	Ekstrakcijski pufar

Slika 2. Shematski prikaz prve i druge modifikacije originalne metode.



LEGENDA	m	HS	HS*	IS	P	V
	Masa uzorka	Soniciran homogenat	Masa polusuhog ostatka	Inkubacijska smjesa pripremljena sonikacijom	Pufer	Volumen

Slika 3. Shematski prikaz treće i četvrte modifikacije originalne metode.

3.2.3. Stabilnost ECP-a u stolici

Analizirana je stabilnost ECP-a u supernatantu inkubacijske smjese na način da je supernatant inkubacijske smjese korišten za određivanje koncentracije ECP-a svjež i nakon zamrzavanja.

3.2.4. Analiza uzoraka pomoću Phadia100 UniCAP

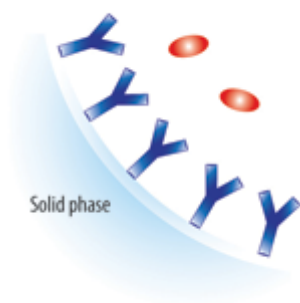
Uzorci priređeni kako je opisano pod 3.2.1. i 3.2.2. korišteni su za mjerenje koncentracije ECP-a u laboratoriju Odjela za medicinsku biokemiju i hematologiju Klinike za dječje bolesti Zagreb pomoću uređaja Phadia100 UniCAP. Analiza ovih uzoraka provedena je ImmunoCAP ECP testom.

3.2.4.1. ImmunoCAP ECP test

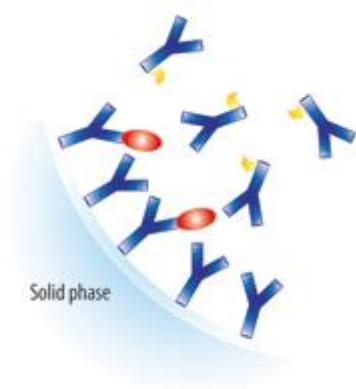
ImmunoCAP ECP test jest metoda kojom se pomoću instrumenta Phadia100 mjeri koncentracija ECP-a u uzorcima. Razrjeđivanje uzoraka najčešće nije zahtijevano. Za određivanje koncentracija viših od 200 µg/L ECP-a potrebno je razrijediti uzorke s ImmunoCAP IgE/ECP/Tryptaza uzorcima za razrjeđivanje.

Preporučeno je uklanjanje i zatvaranje kontrolnih bočica instrumenta čim se završi pipetiranje uzoraka i započne inkubacija uzoraka. Također je preporučeno lagano promiješati bočicu prije upotrebe. ImmunoCap ECP Control treba tretirati na isti način kao i pacijentov uzorak u postupku.

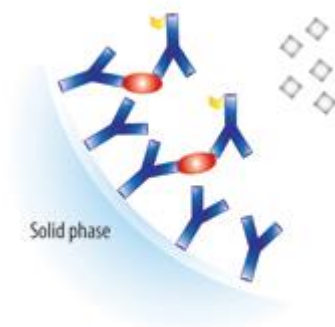
ImmunoCAP čvrsta faza sastoji se od derivata celuloze zatvorenog u kapsuli. Hidrofilni, visoko razgranati polimer omogućuje idealni mikrokoliš za alergene, vežući ih nepovratno pritom zadržavajući njihovu nativnu strukturu. Test je dizajniran kao sendvič imunoanaliza (informacije dobivene na web stranici www.phadia.com).



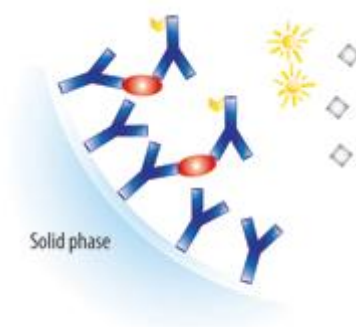
Anti ECP, kovalentno vezan na čvrstu fazu, reagira s ECP-om u serumu bolesnika.



Nakon ispiranja, dodaju se sekundarna antitijela na ECP obilježena enzimom da bi se formirao kompleks.



Nakon inkubacije, nevezani enzim-anti-ECP se ispere i vezani kompleks se zatim inkubira s agensom (supstrat s enzimom).



Nakon zaustavljanja reakcije izmjerena je fluorescencija eluata. Fluorescencija je izravno proporcionalna koncentraciji ECP u uzorku seruma.

Slika 4. Princip ImmunoCap ECP analize. Slike i informacije preuzete s web stranice www.phadia.com.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI

4.1.1. Fekalne koncentracije ECP-a određene prema originalnom postupku

Prema propisu originalne metode obrađen je uzorak fecesa dobiveni rezultati nisu bili u skladu s rezultatima temeljne metode, granica osjetljivosti bila je ispod ustanovljene. Razlika između uzorka IO-4, koji je sadržavao ECP standard dodan prije inkubacije uzorka, i IO-5 uzorka, kojemu je referentni ECP dodan nakon inkubacije uzorka, nije značajna. Tablice 2. i 3. prikazuju dobivene rezultate prema Petersonovoj metodi i masu polusuhog ostatka.

Tablica 2. Rezultati ekstrakcije uzoraka po propisima temeljne metode.

UZORAK	KONCENTRACIJA ECP-a ($\mu\text{g/L}$)
IO-1	< 2,00
IO-2	< 2,00
IO-3	< 2,00
IO-4	2,87
IO-5	2,59
ST-1	2,30
ST-2	2,28

Tablica 3. Polusuha masa uzoraka.

EPRUVETA	MASA POLUSUHOG OSTATKA (SDMI) $/\text{SDMI} = m_2 - m_1/$
H0-5xdil-1	0,01 g
H0-5xdil-2	0,012 g

4.1.2. Utjecaj duljine inkubacije na izmjerene fekalne koncentracije ECP-a

Za ispitivanje utjecaja duljine inkubacije na izmjerene koncentracije ECP-a proveden je postupak (Peterson i sur., 2002.) priređivanja homogenata i inkubacijske smjese. Inkubacija je provedena tijekom 30 i 60 minuta te potom izmjerene koncentracije ECP-a. Rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 4. Oni pokazuju da vrijeme inkubacije ne utječe na izmjerenu koncentraciju ECP-a. Stoga su sljedeći pokusi provedeni uz inkubaciju od 30 minuta.

Tablice 4 i 5. Utjecaj duljine inkubacije na izmjerene koncentracije ECP-a.

UZORCI H INKUBIRANI 30 min	KONCENTRACIJE ECP-a (µg/L)
I0-4	6,81
I0-4	7,29
I0-5	5,09
I0-5	13,1
I0-6	18,0
I0-6	26,0

UZORCI H INKUBIRANI 60 min	KONCENTRACIJE ECP-a (µg/L)
I0-4	7,26
I0-4	6,75
I0-5	6,07
I0-5	6,70
I0-6	17,6
I0-6	18,6
I0-4+ECP	15,0
I0-5+ECP	19,4
I0-6+ECP	26,8

Tablica 6. Polusuha masa uzoraka.

EPRUVETA	MASA POLUSUHO OSTATKA
H0-4	0,011 g
H0-5	0,075 g
H0-6	0,108 g

4.1.3. Utjecaj razrjeđenja homogenata, inkubacijske otopine i načina pripreme homogenata na izmjerene koncentracije ECP-a

Uzorak fecesa podvrgnut je homogeniziranju pomoću a) višestrukog resuspendiranja uzorka fecesa pipetiranjem (H0) i b) soniciranja (HS). Pri tome su priređeni homogenati dodatkom 5, 10 i 20 volumena ekstrakcijskoga pufera na 1 masu uzorka fecesa (H0-5xdil, H0-10xdil, H0-20xdil, HS-5xdil, HS-10xdil i HS-20xdil). Od svakog homogenata priređena je inkubacijska otopina daljnjim razrjeđivanjem homogenata 5, 10 i 20 puta. U supernatantima ovih uzoraka izmjerena je koncentracija ECP-a. Najbolji rezultati mjerenja dobiveni su kod mjerenja koncentracija ECP-a u supernatantima uzoraka nastalim petorostrukim razrjeđivanjem homogenata H0-5xdil i HS-5xdil ekstrakcijskim puferom i oni su prikazani u Tablici 5.

Tablica 7. Koncentracije ECP-a u supernatantima uzoraka fecesa koji su homogenizirani pipetiranjem i soniciranjem.

UZORCI H0-5xdil	KONCENTRACIJE ECP-a (µg/L)	UZORCI HS- 5XDIL	KONCENTRACIJE ECP-a (µg/L)
I0-7	26,8	IS-1	48,0
I0-7+ECP	35,5	IS-1+ECP	49,3
I0-8	19,9	IS-2	30,5
I0-8+ECP	22,3	IS-2+ECP	33,6
I0-9	29,5	IS-3	8,56
I0-9+ECP	< 2,00	IS-3+ECP	15,9

4.1.4. Stabilnost i ponovljivost mjerenja koncentracije ECP-a

Prema literaturi (Peterson i sur., 2002.) ECP u fecesu stabilan je u frižideru (6°C) 7 dana, dok je na sobnoj temperaturi (22°C) bio stabilan 3 dana, a na 34°C 2 dana. U supernatantima obrađenih uzoraka fecesa ECP nije pokazivao nestabilnost nakon 7 dana pohrane u frižideru na 6°C jer su se koncentracije ECP-a i 7. dan razlikovale za manje od 10%. Također je pokazano da tri ciklusa zamrzavanja na -27°C i odmrzavanja fecesa ili supernatanta nisu utjecala na koncentracije ECP-a (Peterson i sur., 2002.).

U ovom radu ispitivana je stabilnost ECP-a u supernatantima inkubacijskih smjesa koje su između dva mjerenja (razdoblje od 12 dana) bile pohranjene na -20°C. Dobiveni rezultati mjerenja koncentracije ECP-a ukazuju da je njegova stabilnost u tom razdoblju bila 95-99% (Tablica 6.).

Tablica 8. Prikaz koncentracija ECP-a izmjerenih u istim uzorcima u razdoblju od 12 dana. Između dva mjerenja uzorci su bili pohranjeni na -20°C.

UZORAK	ECP (µg/L)-12.5.2018.	ECP (µg/L)-24.5.2018.	% početne koncentracije
I0-7	26,8	25,9	97
I0-7+ECP	35,5	34,9	98
IS-1+ECP	48,0	45,6	95
IS-3	8,56	8,14	95

4.2. RASPRAVA

Rutinskim histološkim analizama sluznice crijeva u pacijenata s IBD-om ne uočavaju se degranulirani eozinofili. Imunohistokemijskom analizom koja koristi antitijela naspram eozinofilnih granulnih proteina korisna je za procjenu prisutnosti i aktivnosti eozinofila intestinalne sluznice (Talley i sur., 1992.). Međutim, kolonoskopija je potrebna za dobivanje uzoraka tkiva crijevne sluznice. Nasuprot tome, fekalni su testovi sigurni i mogu se izvesti više puta. Utvrđivanje metode mjerenja fekalnih eozinofilnih biopokazatelja važno je s kliničkog stajališta. Eozinofili proizvode i otpuštaju različite upalne medijatore, među njima i niz kationskih proteina prisutnih u njihovim granulama. (Saitoh i sur., 1999.). Visoke koncentracije ECP-a i EPX-a pronađene su u fecesu (Bischoff i sur., 1997; Saitoh i sur., 1999.), crijevnom perfuzatu (Carlson i sur., 1999.) i tekućini prilikom ispiranja crijeva (Levy i sur., 1997.), naglašavajući uključenost aktiviranih eozinofila u lumen crijeva (Dainese i sur., 2012.). Od otkrića ECP-a, razvijeni su testovi za utvrđivanje njegove koncentracije u biološkim uzorcima kod različitih bolesti. Koncentracije ECP-a koreliraju s povezanosti eozinofilnih granulocita s patofiziološkim stanjem, ali mogu biti povezane i s nekim bolestima bez do sada utvrđenog sudjelovanja eozinofilnih granulocita (Bystorm i sur., 2011.).

Pojedine studije pokazale su visok broj eozinofila u upaljenoj sluznici kod IBD-a (Bischoff i sur., 1996.; Raab i sur., 1998.; Winterkamp i sur., 2000.), iako su podaci ponekad kontradiktorni (Wedemayer i sur., 2008.). Zbog upitnih rezultata koncentracija ECP-a naspram drugih eozinofilnih granularnih proteina dobivenih metodom fekalnih testova neki autori nisu sigurni u ulogu ECP-a kao biopokazatelja u bolesnika s IBD-om. Ipak, brojni se autori (Peterson i sur., 2002.; Saitoh i sur., 1999.) slažu da fekalne razine ECP-a mogu dati informacije o eozinofilnoj aktivaciji u crijevnoj sluznici. Pokazano je da kliničke osobine mogu biti različite u bolesnika s IBD-om koji imaju aktivirane crijevne eozinofile i onih koji ih nemaju. Bilo bi zanimljivo istražiti postoje li sličnosti u kliničkim značajkama bolesnika s IBD-om koji imaju aktivirane crijevne eozinofile i pacijenata s eozinofilnim gastroenteritisom. Modificirano ili neobvezno liječenje može biti korisno u podskupini IBD bolesnika s jakom aktivacijom crijevnih eozinofila. Lijekovi koji inhibiraju migraciju i aktivaciju eozinofila mogu biti korisni kao terapija održavanja bolesti u mirnom stanju (Jones i sur., 1998.; Hällgren i sur., 1989.). Liječenje može biti važan čimbenik koji utječe na fekalne razine ECP-a.

Analize cijelog ispranog crijeva mogu biti točnije od fekalnih testova za procjenu ukupne količine medijatora koji su opušteni u lumen crijeva, ali ti su postupci složeni i nisu

za rutinsku uporabu (Bischoff i sur., 1997.; Ferguson i sur., 1995). Mjerenje ECP-a u stolici korisno je za procjenu aktivnosti bolesti i predviđanje recidiva u bolesnika s IBD-om (Saitoh i sur., 1999.). Osim ECP-a kao prikladni biopokazatelji razmatraju se i drugi proteini eozinofilnih granula.

4.2.1. Rasprava o metodi

Prema originalnoj metodi za ekstrakciju fekalnog ECP-a važno je u ekstrakcijski pufer dodati kationski detergent CTAB, za kojeg se Carlson i suradnici, 1994. slažu da uspješno ekstrahira proteine granula eozinofila i neutrofila. Različite mase fecesa (0,1- 0,4 g) nisu pokazale značajan utjecaj na rezultate mjerenja. Mijenjanjem početnog razrjeđenja uzoraka fecesa pri priređivanju homogenata s 5 puta na 10 i 20 puta, a nepromijenjenim sekundarnim razrjeđenjem (20 puta), kao što je pokazano u ovom radu, moguće je izmjeriti koncentracije ECP-a jer su one iznad granice osjetljivosti. Rezultati s inicijalnim razrjeđenjem od 5 puta te promijenjenim drugim razrjeđenjem pri priređivanju inkubacijske smjese (smanjenje na 10 i 5 puta umjesto originalno predloženog 20 puta) pokazali su se boljim nego rezultati dobiveni originalnim sekundarnim razrjeđenjem od 20 puta. Homogenizacija uzoraka ultrazvučnim soniciranjem čini se učinkovitijom u odnosu na homogenizaciju resuspenzijom i višekratnim pipetiranjem. Još jedan od parametara originalne metode koji je mijenjan jest i vrijeme inkubacije uzoraka, no njegovim mijenjanjem nije pokazan bitan učinak na povećanje ili smanjenje izmjerenih koncentracija ECP-a u uzorcima. Uzorci su prema originalnoj metodi pokazali stabilnost u uvjetima -27°C i 6°C kroz 7 dana. Stabilnost uzoraka ovog istraživanja ispitana je na -20°C kroz približno dva tjedna inkubacije i nije pokazala odstupanja.

4.2.2. Problemi metode

Nekoliko se problema javlja zbog kojih je teško interpretirati i usporediti koncentracije ECP-a u fecesu. Standardizirana tehnika za kvantifikaciju ECP-a ne postoji. Peterson i sur. opisali su metodu u kojoj se koristi ekstrakcijski pufer s CTAB-om, detergentom koji povećava ekstrakciju ECP-a, proteina s visoko kationskim nabojem ($P_i > 9$). Kod zdravih pojedinaca tom metodom dobivene su koncentracije gotovo 100 puta više nego što su dobivene uporabom 0,15 mol/L NaCl kao pufera (Garcia –Rubio i sur., 2007.). Osim toga, u nekim su istraživanjima dobivene niže koncentracije ECP-a uporabom ekstrakcijskog pufera koji ne sadrži CTAB (Saitoh i sur., 1999.), dok su druga istraživanja (Silva, 2007.) uporabom ekstrakcijskog pufera bez CTAB dobile slične koncentracije ECP-a u uzorcima stolice onima

od Petersona i sur. što ukazuje da prisustvo CTAB-a u ekstrakcijskom puferu vjerojatno nije ključno za ekstrakciju ECP-a.

Rezultati ECP-a značajno se razlikuju ovisno o konzistenciji fecesa/stolice. Potrebno je primijeniti korekcijski faktor ovisno o masi polusuhog fecesa; stoga, polazeći od inicijalno sličnih vrijednosti ECP-a u serumu, razine ECP-a u fecesu znatno će varirati. Ovo je točno osobito u upalnim procesima s tekućim stolicama, budući da se ECP veže za čvrsti dio stolice (Garcia-Rubio i sur., 2007.). Tehnike koje se koriste za mjerenje ECP-a nisu uvijek iste. Neki laboratoriji koriste fluorescentni enzimski imunotest dok drugi koriste radioimuno test. Važno je uzeti u obzir i veličinu studije koja se radi, odnosno broj osoba koje sudjeluju u istraživanju, te druge karakteristike kao što su primjerice dob (veći broj studija proveden je na odraslim pacijentima), spol, sklonost bolesti i geografsko područje. Peterson i suradnici odredili su razinu ECP i druge parametre u uzorku od 44 zdravih švedskih pacijenata i dobili prilično niske vrijednosti, medijan od 1,69 g / g i 95. percentila od 6,41 g / g. Nasuprot tome, u studiji sa španjolskom populacijom (Garcia-Rubio i sur., 2007.) razina je iznosila 14,53 g / g u uzorku od 39 zdravih osoba. Bischoff i sur. izmjerili su više vrijednosti ECP-a u fecesu bolesnika s ulceroznim kolitisom i Crohnovom bolesti nego u zdravih bolesnika. Drugi autori koji su proučavali ECP u stolici bolesnika s alergijom na hranu otkrili su više koncentracije ECP-a u fecesu dojenčadi sa simptomima alergijske reakcije na kravlje mlijeko prije i poslije napada (Majamaa i sur., 1999.) i također veće vrijednosti u djece s atopijskim dermatitisom i alergijom na različite hrane (Saarinen i sur., 2002.; Garcia-Rubio i sur., 2007.). Već spomenuti problem dječje populacije i malog broja ispitivanja koja ih uključuju ide u korist razvijanja boljih metoda za određivanje ECP-a u uzorcima fecesa zbog svoje neinvazivnosti te moguće koristi same metode za određivanje intestinalnih upalnih procesa i praćenje učinka liječenja.

5. ZAKJUČAK

1. Cilj ovog rada bio je modificirati i prilagoditi metodu mjerenja eozinofilnog kationskog proteina (ECP-a) u uzorcima fecesa.
2. Rezultati ovog istraživanja donekle su korelirali s rezultatima studije na čijoj se metodi temeljio postupak ispitivanja, no uspostavljen protokol metode razlikovao se u razrjeđenju uzoraka. Sekundarno razrjeđenje homogenata je po propisima originalne metode bilo 20 puta, dok su se u ovom radu rezultati razrjeđenja od 5 i 10 puta pokazali kao najbolji. Upotrijebljeni uzorci homogenizirani su pomoću ultrazvučnog sonikatora te resuspenzijom višekratnim pipetiranjem. Homogenizacija ultrazvučnim sonifikatorom nije upotrijebljena u originalnoj metodi, no u ovom istraživanju primjena sonikatora utjecala je izmjerene koncentracije ECP-a u stolici.
3. Stabilnost ECP-a u ispitanim uzorcima odgovarala je stabilnosti opisanoj u literaturi.
4. Mjerenje ECP-a i drugih eozinofilnih proteina u uzorcima fecesa vrlo je atraktivno s obzirom na potencijalni klinički značaj za različite patofiziološke procese u gastrointestinalnom traktu. Predložene modifikacije metode koje su ispitane u okviru ovoga diplomskoga rada trebalo bi verificirati kroz jedno opsežnije istraživanje koje bi uključilo zdrave i bolesne ispitanike s IBD-om različite dobi s posebnim fokusom na pedijatrijsku populaciju za koju je iznimno važna primjena neinvazivnih metoda za dijagnostiku i praćenje IBD-a.

6. LITERATURA

1. Abramson O, Durant M, Mow W, et al. Incidence, prevalence, and time trends of pediatric inflammatory bowel disease in Northern California, 1996 to 2006. *J Pediatr*, 2010, 157, 233–239.
2. Adamiak T, Walkiewicz-Jedrzejczak D, Fish D, et al. Incidence, clinical characteristics, and natural history of pediatric IBD in Wisconsin: a population-based epidemiological study. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19, 1218–1223.
3. Benchimol EI, Fortinsky KJ, Gozdyra P, Van den Heuvel M, Van Limbergen J, Griffiths AM. Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review of international trends. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17, 423–439.
4. Bischoff SC, Grabowsky J, Manns MP. Quantification of inflammatory mediators in stool samples of patients with inflammatory bowel disorders and controls. *Dig Dis Sci*, 1997, 42, 394–403.
5. Boix E, Carreras E, Nikolovski Z, Cuchillo CM, Victòria Nogués M. Identification and characterization of human eosinophil cationic protein by an epitope-specific antibody. *J Leukoc Biol*, 2001, 69, 1027–1035.
6. Bystorm J, Amin K, Bishop-Bailey D. Analysing the eosinophil cationic protein - a clue to the function of the eosinophil granulocyte. *Respir Res*, 2011, DOI: 10.1186/1465-9921-12-10
7. Carlson M, Öberg G, Peterson C, et al. Releasability of human hypereosinophilic eosinophils is related to the density of the cells. *Br J Haematol*, 1994, 86, 41–47.
8. Carlson M, Raab Y, Peterson C, Hällgren R, Venge P. Increased intraluminal release of eosinophil granule proteins EPO, ECP, EPX, and cytokines in ulcerative colitis and proctitis in segmental perfusion. *Am J Gastroenterol*, 1999, 94, 1876–1883.

9. Carvalho AT, Elia CC, de Souza HS, Elias PR, Pontes EL, Lukashok HP, et al. Immunohistochemical study of intestinal eosinophils in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol*, 2003, 36, 120–125.
10. Crohnova bolest, Ulcerozni kolitis, 2015., www.hucuk.com, pristupljeno 4.8.2018.
11. Collagenous colitis, 2003., <http://www.badgut.org>, pristupljeno 4.8.2018.
12. Cuffari C. Diagnostic Considerations in Pediatric Inflammatory Bowel Disease Management. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 2009, 5, 775–783.
13. Dainese R, Galliani EA, De Lazzari F, D’Inca R, Mariné-Barjoan E, Vivinus-Nebot M-H, Hébuterne X, Sturniolo GC and Piche T. Role of serological markers of activated eosinophils in inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2012, 24, 393–397.
14. Ferguson A, Humphreys KA, Croft NM. Technical report: Results of immunological tests on faecal extracts are likely to be extremely misleading. *Clin Exp Immunol*, 1995, 99, 70–75.
15. Fyderek K, Strus M, Kowalska-Duplaga K, et al. Mucosal bacterial microflora and mucus layer thickness in adolescents with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 2009, 15, 5287–5294.
16. Garcia-Rubio I, Martinez-Cocera C, Zayas L. Eosinophil cationic protein in feces: Reference values in healthy and atopic individuals and patients with digestive diseases. *Allergy Asthma Proc*, 2007, 28, 468–471.
17. Hällgren R, Colombel JF, Dahl R, et al. Neutrophil and eosinophil involvement of the small bowel in patients with celiac disease and Crohn’s disease: Studies on the secretion rate and immunohistochemical localization of granulocyte granule constituents. *Am J Med*, 1989, 86, 56–64.
18. Jones NL, Roifman CM, Griffiths AM, et al. Ketotifen therapy for acute ulcerative colitis in children. A pilot study. *Dig Dis Sci*, 1998, 43, 609–615.

19. Kristjánsson G, Venge P, Wanders A, Lööf L, R Hällgren. Clinical and subclinical intestinal inflammation assessed by the mucosal patch technique: studies of mucosal neutrophil and eosinophil activation in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome. *Gut*, 2004, 53, 1806–1812.
20. Lampinen M, Rönnblom A, Amin K, Kristjansson G, Rorsman F, Sangfelt P, et al. Eosinophil granulocytes are activated during the remission phase of ulcerative colitis. *Gut*, 2005, 54, 1714–1720.
21. Levy AM, Gleich GJ, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Steiner BL, Phillips SF. Increased eosinophil granule proteins in gut lavage fluid from patients with inflammatory bowel disease. *Mayo Clin Proc*, 1997, 72, 117–123.14. Hogan SP, Rothenberg ME. Review article: The eosinophil as a therapeutic target in gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004, 20, 1231–1240.
22. Lindberg E, Lindquist B, Holmquist L, Hildebrand H. Inflammatory bowel disease in children and adolescents in Sweden, 1984-1995. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000, 30, 259–264.
23. Luck W, Becker M, Niggemann B, Wahn U. In vitro release of eosinophil cationic protein from peripheral eosinophils reflects disease activity in childhood Crohn disease and ulcerative colitis. *Eur J Pediatr*, 1997, 156, 921-924.
24. Majamaa H, Laine S, and Miettinen A. Eosinophil protein X and eosinophil cationic protein as indicators of intestinal inflammation in infants with atopic eczema and food allergy. *Clin Exp Allergy*, 1999, 29, 1502–1506.
25. Peterson, CGB, Jornvall, H, Venge, P. Purification and characterization of eosinophil cationic protein from normal human eosinophils. *Eur. J. Haematol*, 1988, 40, 415–423.
26. Peterson CGB, Eklund E, Taha Y, Raab Y, Carlson M. A new method for the quantification of neutrophil and eosinophil cationic proteins in feces: establishment of normal levels and clinical application in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97, 1755–1762.

27. Peterson CGB, Lampinen M, Hansson T, Lidén M, Hällgren R, Carlson M. Evaluation of biomarkers for ulcerative colitis comparing two sampling methods: fecal markers reflect colorectal inflammation both macroscopically and on a cellular level, *Scand J Clin Lab Invest*, 2016, DOI: 10.1080/00365513.2016.1185145
28. Raab Y, Fredens K, Gerdin B, et al. Eosinophil activation in ulcerative colitis: Studies on mucosal release and localization of eosinophil granule constituents. *Dig Dis Sci*, 1998, 43, 1061–1070.
29. Rosenberg, HF, Tiffany, HL. Characterization of the eosinophil granule proteins recognized by the activation-specific antibody EG2. *J Leukoc Biol*, 1994, 56, 502–506.
30. Rothenberg ME, Owen WF, Jr., Silberstein DS, et al. Eosinophils cocultured with endothelial cells have increased survival and functional properties. *Science*, 1987, 237, 645-647.
31. Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med*, 1998, 338, 1592-1600.
32. Saarinen KM, Sarnesto A, and Savilahti E. Markers of inflammation in the feces of infants with cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol*, 2002, 13, 188–194.
33. Saitoh O, Kojima K, Sugi K, et al. Fecal eosinophil granule-derived proteins reflect disease activity in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 1999, 94, 3513–3520.
34. Silva AC, Levy L, Trindade JC, Mendonca P, Silva C, Lopes AI. Faecal and serum levels of eosinophil cationic protein in a healthy paediatric population. *Scand J Clin Lab Invest*, 2007, 67, 757–766.
35. Talley NJ, Kephart GM, McGovern TW, et al. Deposition of eosinophil granule major basic protein in eosinophilic gastroenteritis and celiac disease. *Gastroenterology*, 1992, 103, 137–145.
36. Test Principle ImmunoCAP ECP, 2012., <http://www.phadia.com>, pristupljeno 15.7.2018.

37. Tischendorf FW, Brattig NW, Lintzel M, Buttner DW, Burchard GD, Bork K, Muller M: Eosinophil granule proteins in serum and urine of patients with helminth infections and atopic dermatitis. *Trop Med Int Health*, 2000, 5, 898-905.
38. Treatments for collagenous colitis, 2017., <http://www.cochrane.org>, pristupljeno 4.8.2018.
39. Wagner M. Clinical and experimental studies on inflammatory bowel diseases with special emphasis on collagenous colitis. *Digital comprehensive summaries of Uppsala dissertations*, 2010, 565.
40. Wagner M, Peterson CGB, Stolt I, Sangfelt P, Agnarsdottir M, Lampinen M, Carlson M. Fecal eosinophil cationic protein as a marker of active disease and treatment outcome in collagenous colitis: A pilot study. *Scand J Gastroenterol*, 2011, 46, 849–854.
41. Wedemeyer J, Vosskuhl K. Role of gastrointestinal eosinophils in inflammatory bowel disease and intestinal tumours. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2008, 22, 537–549.
42. Wędrychowicz A, Tomasik P, Pieczarkowski S, Kowalska-Duplaga K, Grzenda-Adamek Z, Fyderek K. Clinical value of serum eosinophilic cationic protein assessment in children with inflammatory bowel disease. *Arch Med Sci*, 2014, 10, 1142–1146.
43. Weller PF. Eosinophils: structure and functions. *Curr Opin Immunol*, 1994, 6, 85-90.
44. Winterkamp S, Raithel M, Hahn EG. Secretion and tissue content of eosinophil cationic protein in Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol*, 2000, 30, 170–175.
45. Woodruff SA, Masterson JC, Fillon S, Robinson ZD, Furuta GT. Role of eosinophils in inflammatory bowel and gastrointestinal diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2011, 52, 650-661.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. Sažetak

ECP je bazični protein smješten u granulama eozinofilnih granulocita koji je uključen u sustav imunskog odgovora. U stanicama domaćina broj eozinofila korelira s koncentracijama eozinofilnog kationskog proteina (ECP) koji se oslobađa njihovom aktivacijom. Karakteristika ECP-a jest citotoksičnost i sudjelovanje u različitim upalnim procesima. Intestinalna sluznica pacijenata s upalnom bolesti crijeva (IBD) karakterizirana je oštećenjem epitelnih stanica i infiltracijom različitih upalnih stanica, uključujući i ECP. Cilj ovoga diplomskoga rada bio je ispitati učinkovitost i predložiti potencijalne modifikacije metode za kvantifikaciju fekalnog ECP-a. Za bolju ekstrakciju fekalnog ECP-a korišten je ekstrakcijski pufer s CTAB-om. Ispitane su modifikacije originalnog postupka ekstrakcije ECP-a u pogledu priređivanja homogenata uzorka fecesa i trajanja inkubacije. Također je ispitana stabilnost i ponovljivost mjerenja ECP-a. Uporabom instrumenta Phadia100 provedeno je ImmunoCAP ECP mjerenje koncentracija ECP-a u uzorcima. Bolji rezultati postignuti su homogenizacijom uzoraka ultrazvučnim sonifikatorom, te sekundarnim razrjeđenjem od 5 i 10 puta. Stabilnost uzoraka osigurana je pohranom u zamrzivaču na -20°C prije analiza.

7.2. Summary

ECP is a basic protein localized in granules of the eosinophil granulocytes and is included in immune response reactions. In host cells, eosinophil levels correlate with ECP levels that are released during their activation. Characteristic of ECP is cytotoxicity and involvement in various inflammatory processes. Intestinal mucose of the patients with IBD is characterized with damaged epithelial cells and infiltration of various inflammatory cells, including eosinophils. The goal of this research was to examine efficacy and suggest potential modifications of the method for the quantification of the ECP in stool samples. For better fecal ECP extraction, buffer mixture with CTAB was used. Modifications of the original ECP extraction procedure were examined in terms of stool samples preparation and incubation time. Stability and repeatability of ECP measurement was also tested. ImmunoCAP ECP assay performed with Phadia100 instrument was used for measuring ECP concentrations in samples. Better results were achieved by sample homogenization with ultrasonic sonicator and secondary dilution of 5 x and 10 x. Sample stability was secured by storing in the freezer at the -20°C before assays.

8. PRILOZI

8.1. Kratice

5-ASA – 5-aminosalicilna kiselina

BSA – Bovine serum albumine – goveđi serumski albumin

CT - Computed tomography – Kompjuterizirana tomografija

CTAB – N-cetil-N,N,N-trimetilamonijev bromid

ECP – Eosinophil cationic protein - Eozinofilni kationski protein

EDTA – Etilendiamintetraoctena kiselina

EDN – Eosinophil derived neurotoxin - Eozinofilni neurotoksin

EPO – Eosinophil peroxidase - Eozinofilna peroksidaza

EPX – Eozinofilni protein X

IBD/SIC – Irritable bowel syndrome/Sindrom iritabilnog crijeva

MBP – Major basic protein – Glavni bazični protein

RNaza – Ribonukleaza

Tween 20 – Polietilen glikol sorbitan monolaurat/polioksietillensorbitan monolaurat

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

KVANTIFIKACIJA FEKALNOG EOZINOFILNOG KATIONSKEG PROTEINA

Ivana Čaleta

SAŽETAK

ECP je bazični protein smješten u granulama eozinofilnih granulocita koji je uključen u sustav imunskog odgovora. U stanicama domaćina broj eozinofila korelira s koncentracijama eozinofilnog kationskog proteina (ECP) koji se oslobađa njihovom aktivacijom. Karakteristika ECP-a jest citotoksičnost i sudjelovanje u različitim upalnim procesima. Intestinalna sluznica pacijenata s upalnom bolesti crijeva (IBD) karakterizirana je oštećenjem epitelnih stanica i infiltracijom različitih upalnih stanica, uključujući i ECP. Cilj ovoga diplomskog rada bio je ispitati učinkovitost i predložiti potencijalne modifikacije metode za kvantifikaciju fekalnog ECP-a. Za bolju ekstrakciju fekalnog ECP-a korišten je ekstrakcijski pufer s CTAB-om. Ispitane su modifikacije originalnog postupka ekstrakcije ECP-a u pogledu priređivanja homogenata uzorka fecesa i trajanja inkubacije. Također je ispitana stabilnost i ponovljivost mjerenja ECP-a. Uporabom instrumenta Phadia100 provedeno je ImmunoCAP ECP mjerenje koncentracija ECP-a u uzorcima. Bolji rezultati postignuti su homogenizacijom uzoraka ultrazvučnim sonifikatorom, te sekundarnim razrjeđenjem od 5 i 10 puta. Stabilnost uzoraka osigurana je pohranom u zamrzivaču na -20°C prije analiza.

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

Rad sadrži: 32 stranice, 4 slike, 8 tablica i 45 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Eozinofili, ECP, IBD, metoda kvantifikacije u fecesu, imunoanaliza

Mentor: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Renata Zrinski-Topić, znanstvena suradnica, Klinika za dječje bolesti
Klaićeva, Zagreb

Ocjenjivači: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Renata Zrinski-Topić, znanstvena suradnica, Klinika za dječje bolesti
Klaićeva, Zagreb

Dr. sc. Renata Petlevski, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2018.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

QUANTIFICATION OF EOSINOPHIL CATIONIC PROTEIN IN FECES

Ivana Čaleta

SUMMARY

ECP is a basic protein localized in granules of the eosinophil granulocytes and is included in immune response reactions. In host cells, eosinophil levels correlate with ECP levels that are released during their activation. Characteristic of ECP is cytotoxicity and involvement in various inflammatory processes. Intestinal mucosa of the patients with IBD is characterized with damaged epithelial cells and infiltration of various inflammatory cells, including eosinophils. The goal of this research was to examine efficacy and suggest potential modifications of the method for the quantification of the ECP in stool samples. For better fecal ECP extraction, buffer mixture with CTAB was used. Modifications of the original ECP extraction procedure were examined in terms of stool samples preparation and incubation time. Stability and repeatability of ECP measurement was also tested. ImmunoCAP ECP assay performed with Phadia100 instrument was used for measuring ECP concentrations in samples. Better results were achieved by sample homogenization with ultrasonic sonicator and secondary dilution of 5 x and 10 x. Sample stability was secured by storing in the freezer at the -20°C before assays.

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

Thesis includes: 32 pages, 4 pictures, 8 tables and 45 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Eosinophil, ECP, IBD, quantification method in feces, immunoassays

Mentor: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Renata Zrinski-Topić, Ph.D. *Scientific associate*, Klaić Children's hospital, Zagreb

Reviewers: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Renata Zrinski-Topić, Ph.D. *Scientific associate*, Klaić Children's hospital, Zagreb

Renata Petlevski, Ph.D., *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2018.