

# Interlukini IL-33, IL17/IL-17-1 u bolesnika s ulceroznim kolitisom

---

Ajduković, Jasna

Doctoral thesis / Disertacija

2013

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:025081>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-07**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



Sveučilište u Splitu  
Medicinski fakultet

Jasna Ajduković

**INTERLUKINI IL-33, IL17/IL-17-1  
U BOLESNIKA S ULCEROZNIH KOLITISOM**

Doktorska disertacija

Split, 2013.

Ovaj je rad izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Ante Tonkića u Klinici za unutarnje bolesti i Odjelu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC Split, uz suradnju Odjela za transfuziju krvi.

Zahvaljujem djelatnicima KBC Split, Medicinskog fakulteta i dragovoljnim darivateljima krvi.

Disertaciju, sa zahvalnošću, posvećujem osobama s ulceroznim kolitisom koje su bile uključene u ovo istraživanje.

# SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA	4
1. UVOD	6
<b>1.1. Genetika</b>	6
<b>1.2. Imunopatogeneza</b>	7
1.2.1. Prirođena imunost u ulceroznom kolitisu	7
1.2.2. Stečena imunost u ulceroznom kolitisu	8
1.2.3. IL-33	12
1.2.4. IL-17	17
1.2.5. sPSGL-1	18
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	20
3. METODE ISTRAŽIVANJA	21
<b>3.1. Ispitanici</b>	21
<b>3.2. Postupci</b>	22
<b>3.3. Materijali</b>	23
<b>3.4. Statistički postupci</b>	23
4. REZULTATI	24
5. RASPRAVA	27
6. ZAKLJUČAK	30
7. SAŽETAK	31
8. SUMMARY	34
9. LITERATURA	36
10. ŽIVOTOPIS	42

## POPIS OZNAKA I KRATICA

alofikocijanin (engl. *allophycocyanin*)

CAI - indeks aktivnosti bolesti (engl. *colitis activity index*)

CARD - kaspazom unovačena regija (engl. *caspase recruitment domain family*)

DAMP - molekule povezane s obrascem molekula povezanih s oštećenjem stanica (engl. *damage-associated molecular pattern molecules*)

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

ETBF - enterotoksični *Bacteroides fragilis*

FITC- fluorescein izotiocijanat (engl. *fluroscein isothiocyanate*)

FRCs-fibroblastične retikularne stanice (engl. *fibroblastic reticular cells*)

GMCSF - poticajni čimbenik granulocitnih i makrofagnih skupina (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

HEVs - venule s povećanim endotelnim stanicama (engl. *high endothelial venules*)

HLA - sustav čovjekovih gena (engl. *Human leukocyte antigen*)

IBD - upalna bolest crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*)

IEC - crijevne epitelne stanice (engl. *intestinal epithelial cells*)

IFN- $\gamma$  - interferon gama

IL - interleukin

LPMC - mononukleari lamine proprije (engl. *lamina propria mononuclear cells*)

LPS - lipopolisaharid

LTB<sub>4</sub> - leukotrijen B<sub>4</sub>

NK - prirodne ubojice (engl. *natural killers*)

nTreg - prirodni regulacijski T limfociti (engl. *natural T regulatory cells*)

PBMC - mononukleari u perifernoj krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cells*)

PE - fikoeritrin (engl. *phycoerythrin*)

PBMC mononukleari u perifernoj krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cells*)

Pg - prostaglandin

ROR $\gamma$ -t – transkripcijski čimbenik orphan receptor povezan s receptorom retinoične kiseline (engl. *retinoid-related orphan receptor*)

sPSGL-1 - topljivi glikoproteinski ligand-1 za P-selekin (engl. *soluble P-selectin glycoprotein ligand-1*)

sST2 - topljivi receptor za IL-33 (engl. *soluble ST2*)

STAT-3 - signlni prijenosnik i aktivator transkripcije 3 (engl. *signal transducers and activators of transcription-3*)

TGF- $\beta$  - transformirajući čimbenik rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*)

Th - pomoćnički limfocitiT (engl. *T helper*)

TLR - receptor sličan toll bjelančevini (engl. *Toll-like receptors*)

TNF - čimbenik tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor*)

Tr - regulacijski T limfociti

TRAF6 – čimbenik povezan s receptorom za TNF (engl. *tumor necrosis factor (TNF)-receptorassociated factor 6*)

TSLP - timusni stromalni limfopoein (engl. *thymic stromal lymphopietin*)

## 1. UVOD

Ulcerozni kolitis kronična je crijevna bolest nepoznatog uzroka, u čiji je nastanak vjerojatno uključena aberantna imunološka aktivnost crijevne sluznice (1). Hipotetički model patogeneze upalnih bolesti crijeva pretpostavlja da u genetski predisponiranih osoba faktori okoline (infekt, luminalne bakterije) i endogeni faktori (membranska uloga, krvna opskrba, neuroni) potiču sluznični sustav na imunološki odgovor karakteriziran tkivnom upalom i destrukcijom (2-5).

### 1.1. Genetika

Otkriveno je više genskih lokusa koji su odgovorni za predispoziciju za razvoj IBD. Iako je većina tih genskih lokusa zajednička za sve upalne crijevne bolesti, neki su specifični za Crohnovu bolest (npr. IBD1 na 16. kromosomu), dok su drugi specifični za ulcerozni kolitis (IBD2 na 12. kromosomu). Unutar lokusa IBD1 identificiran je gen 15 koji kodira bjelančevinu koja djeluje kao senzor komponente staničnog bakterijskoga zida. Ta je bjelančevina važan regulator aktivnosti NF $\kappa$ B i upalnoga staničnog odgovora. Mutacije CARD15 u nekih naroda mogu biti povezane s Crohnovom bolešću, iako jasna veza još nije utvrđena (6).

Regija IBD3 na 6. kromosomu važna je za opću predispoziciju za razvoj upalnih crijevnih bolesti. Na tom se kromosomu nalazi i gen za TNF, a njegova se varijacija dovodi u vezu sa sklonošću za ulcerozni kolitis i Crohnovu bolest kolona (6).

Postoji povezanost ulceroznog kolitisa i s ovim genima: NKX2-3 (NK2- povezan sa transkripcijskim čimbenikom locus 3) s desetog kromosoma (funkcija transkripcijskog čimbenika koji utječe na razvoj limfnih čvorova i slezene), SLC22A4 (organski kationski transporter), 5q31 7 (plazma-membranski polispecifični, organski kationski transporter), 17q21 4 glavni STAT put za proizvodnju interleukina 6, 10, 17, 21, 22 i 23, STAT3 (signalni prijenosnik i aktivator transkripcije), IL12B (dio IL 23), IL23R (dio receptora za IL 23), IRGM (GTPaza M) 5q33 3 (potrebna za uklanjanje intracelularnih patogena, posredovano interferonom  $\gamma$ ) (7).

Receptor TLR4 na intestinalnim epitelnim stanicama ima ključnu ulogu u održavanju epitelne crijevne homeostaze. Njegova je ekspresija povećana u ljudi koji boluju od upalnih crijevnih bolesti. Neki oblici gena koji kodira taj receptor povezani su s ulceroznim kolitisom (6). S tom bolešću povezani su i oblici gena za IL-4 i IL-18 (8).

## **1.2. Imunopatogeneza**

### **1.2.1. Prirođena imunost (engl. innate immunity)**

Epitelne stanice zdravog crijeva osiguravaju barijeru patogenima i vrše sekreciju Ig A koji u njih dospijeva preko bazolateralne membrane, oslobađaju citokine i kemokine, predočuju antigene intraepitelnim limfocitima i limfocitima u lamini propriji (9). Citokini su bjelančevine sposobne modificirati biološki odgovor mnogih stanica, a kemokini stimuliraju i usmjeruju kretanje limfocita i monocita (10).

Neotopljene čestice luminalnih antigena ulaze u M stanice iz kojih se predočuju limfocitima preko različitih antigen-predočnih stanica (11).

U upalnim bolestima crijeva povećana je ekspresija adhezijskih receptora na endotelnim stanicama te se tako olakšava ulazak neutrofila u laminu propriju crijevne stijenke. Uz lučenje citokina (TGF- $\beta$ , IL-6 i IL-8), u upali je pojačana ekspresija molekula HLA-DR II na epitelnim stanicama (11). U kroničnoj upali izrazito se smanjuje gustoća živčanih završetaka u lamini propriji koji sadržavaju neuropeptid VIP (11).

Dendritične stanice i  $\gamma\delta$  T limfociti proizvode IL-17 (13). On pobuđuje oslobađanje raznih kemokina (npr. IL-8), čimbenika rasta iz mezenhimskih stanica, proupalnih citokina (npr. IL-6) i kostimulatornih molekula iz stromalnih stanica. Oslobađanje ovih molekula dovodi do pojačanja tkivne upale. Čini se da je broj limfocita  $\gamma\delta$  smanjen i u ulceroznom kolitisu i Crohnovoj bolesti (11).

Pokretljivost makrofaga, fagocitoza i sinteza bioaktivnih spojeva povećani su u obje bolesti. Makrofagi unovačeni iz cirkulirajućih monocita odgovaraju na lokalne upalne podražaje pojačanom aktivnošću NF $\kappa$ B i proizvodnjom upalnih limfokina (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 GM-CSF, eikosanoida) koji su važni medijatori tkivnog oštećenja. Glavna



značajka aktivne upalne crijevne bolesti je infiltracija intestinalnih lezija neutrofilima (11). Potaknuti kemotaksijskim medijatorima (IL-8, leukotrijenom B4 i drugima) oni migriraju iz krvi u laminu propriju gdje se inače ne nalaze. Nakon ulaska u tkivo, budu izloženi IL-1, TNF- $\alpha$ , GM-CSF ili LPS i pojačano stvaraju reaktivne kisikove spojeve. Čak i sam ekstracelularni matriks može potaknuti neutrofile na aktivaciju. Oni potom aktivno prolaze kroz epitel u i iz crijevnoga lumena (11, 12-21). Neutrofili su najodgovorniji za tkivna oštećenja u IBD i njihovoj se ulozi, osobito u ulceroznom kolitisu, obično posvećuje nedovoljna pažnja (11, 21).

Razina LTB<sub>4</sub> u sluznici kod ulceroznog kolitisa povećana je više od 50 puta u odnosu na normalnu sluznicu. C5a komponenta komplemента je povišena u upalnim crijevnim bolestima. Povišene su i razine PGE<sub>2</sub> i prostaciklina, koji su odgovorni za vazodilataciju, edem i eritem (21).

Izolirane stanice lamine proprije u bolesnika s Crohnovom bolešću proizvode više topljivog IL-2 receptora. T limfociti sluznice bolesnika s Crohnovom bolešću proizvode velike količine IFN- $\gamma$ , dok T limfociti sluznice bolesnika s ulceroznim kolitisom luče više IL-5. IFN- $\gamma$  i IL-12 povećani su u lezijama sluznice u Crohnovoj bolesti (11). Čini se da je razina IL-4 stalno niska i u ulceroznom kolitisu i u Crohnovoj bolesti. Razina IL-2 stalno je viša u Crohnovoj bolesti nego u ulceroznom kolitisu. T klonovi iz sluznice zahvaćene Crohnovom bolešću pojačano luče IFN- $\gamma$  i IL-12, za razliku od sluznice u ulceroznom kolitisu u kojoj se stvara više imunoglobulina. Razina IL-5 viša je u ulceroznom kolitisu. U obje je bolesti povišena razina IL-10, više u ulceroznom kolitisu (11,21). IL-15 je povišen u obje bolesti. Također je povišena i razina cirkulirajućih IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ . Ovi peptidi potiču proizvodnju bjelančevina akutne faze upale u jetri, vrućicu i gubitak apetita (21).

### 1.2.2. Stečena imunost u ulceroznom kolitisu

T limfociti aktivirani molekulama HLA i kostimulatornim molekulama na antigen predočnim stanicama kao i kemokinima, umnožavaju se i diferenciraju se na pomagačke T limfocite (engl. T helper) Th1 (zaštitna stanična imunost), Th2 (atopijsko

imunoreagiranje), regulacijske limfocite Tr1 i Th3 te pomagačke T limfocite koji luče interleukin 17 (Th17) (22). Tr1 i Th3 limfociti su po svom djelovanju slični CD4+CD25+Tr koji dolaze gotovi iz timusa. Tako aktivirani limfociti napuštaju crijevne folikule, ulaze u mezenteričke limfne žile i sustavnu cirkulaciju odakle selektivno migriraju natrag u gastrointestinalni trakt (11-14).

Regulacijski limfociti CD4+CD25+ suprimiraju razvoj Th1 i Th2 i izravnim staničnim kontaktom i supresivskim limfokinom TGF- $\beta$  ili IL-10 te tako onemogućuju aktivaciju i ekspanziju autoreaktivnih T limfocita (13-20). Biljezi funkcijsko sposobnih regulacijskih limfocita Treg su Foxp3 (specifični marker) te CD25 (dio receptora za IL-2). Foxp3 je transkripcijski čimbenik kodiran genom s X kromosoma. Ima inhibicijsko djelovanje na inhibitornu bjelančevinu Smad7 koja blokira funkcionalni regulacijski odgovor (limfocitnu proizvodnju TGF- $\beta$ ) (13-17). Ekspresija Foxp3 u populaciji anergijskih perifernih limfocita T CD25<sup>-</sup> (limfociti koji ne proliferiraju ili proizvode IL-2 na antigensku restimulaciju) inducira se interleukinima ili preko staničnoga T receptora. Tako nastaju regulacijski limfociti Tr1 i Tr3 kojima, dokazano je, obiluje probavni sustav (13-17).

Regulacijski limfociti T koji formirani izlaze iz timusa konstitutivno izražavaju visoku razinu glikoproteina CD25 (alfa lanac interleukinskoga receptora IL-2).

Za nastanak induciranih Treg u tkivima izvan timusa nužan je TGF- $\beta$  (23). Indukcija iz prekursora in vitro TGF- $\beta$  zajedno sa IL-2 iz CD4+CD25<sup>-</sup> u CD4+CD25<sup>+</sup> uz snažnu supresivnu aktivnost tih stanica također potiče ostale CD4+CD25<sup>-</sup> stanice na preobrazbu u TGF- $\beta$  ovisne supresivske limfocite. Metabolit retinoične kiseline značajno pojačava TGF- $\beta$  induciranu ekspresiju foxp3. Osim ekspresije biljega CD25, prekursori Treg stiču i biljege CTLA i GITR. Kostimulatorna molekula CD28 neophodna je za razvoj nTreg u timusu. Pokazano je da i TLR modulira ekspresiju foxp3. TLR2 izražen je intracelularno i u aktiviranim efektorskim limfocitima T i u CD4+CD25<sup>+</sup> regulacijskim limfocitima, ali ne i u stanicama u mirovanju. IL-6, bjelančevina akutne faze tijekom upale, značajno suprimira ekspresiju foxp3 i nastanak iTreg. IL-4 i transkripcijski čimbenik GATA3 inhibitorno djeluju na ekspresiju foxp3. Dokazano je da se GATA3 direktno veže na promotor foxp3 i tako prevenirajući indukciju toga gena, usmjerava

diferencijaciju limfocita u Th2 fenotip (24). Supresivna aktivnost jednakog broja nTreg jača je od aktivnosti ekvivalentne količine iTreg. Za održanje supresivne aktivnosti iTreg potrebna je restimulacija preko TCR (25).

Kontrola i stanična regulacija iznimno je značajna u održavanju mukozne homeostaze.

Regulacijski CD4+CD25+ limfociti važna su komponenta homeostaze imunološkoga sustava te poremećaj njihove aktivnosti dovodi do autoimunih i alergijskih bolesti (20). Iako mehanizam supresije ostaje još uvijek nerazjašnjen, potvrđena je imunosupresivna uloga citokina IL-10 i TGF- $\beta$ . T limfociti CD4+CD25+ direktno suprimiraju CD4+CD25- T limfocite, mijenjaju imunološki odgovor djelujući na dendritične stanice, citotoksično su učinkoviti čak i prema aktiviranim CD4CD8+ T stanicama, CD14 monocitima te nezrelim i zrelim dendritičnim stanicama (19).

Oprečnu aktivnost od regulacijskih T limfocita pokazuju Th17 limfociti. Njihovo proupalno djelovanje uključuje nespecifičnu aktivnost (apoptoza, sekrecija sluzi, remodeliranje) kao i specifično imunološko reagiranje (pojačanje sekrecije kemokina, proupalnih citokina, indukcija HLA molekula) (26). Odras neravnoteže između Tr limfocita i patogeničnih Th17 limfocita jesu razni oblici autoimunosti. Diferencijaciju Th17 inhibiraju Th1 i Th2 citokini i IFN- $\gamma$  (27, 28). Iz naivnih CD4+ limfocita razvoj Th17 pobuđuje in vivo IL-6 potičući ekspresiju IL-21 koji povratnom spregom inducira više IL-23 i IL-21 receptora na naivnim CD4+ limfocitima. IL-21 i IL-23 zajedno sa TGF- $\beta$  potiču proizvodnju IL-17 i pretvorbu u Th17.

IL-1 također ima značajnu ulogu u ranoj Th 17 diferencijaciji (29). Specifični transkripcijski čimbenici sudjeluju u nastanku raznih vrsta Th limfocita. Slično kao T-bet u pomoćničkim Th1 limfocitima i GATA3 u Th2 limfocitima, dva receptora koji reguliraju razvoj limfocita Th17 jesu ROR $\gamma$  i ROR $\alpha$ . Iako je foxp3 snažan inhibitor razvoja Th17 limfocita, IL-6 suprimira foxp3 ekspresiju u nTreg i iTreg i zajedno sa IL-1 potiče ekspresiju specifičnih Th17 gena. Transkripcijski čimbenik STAT3 potreban je i za inhibiciju ekspresije fox3 i za ekspresiju IL-17, a RORovi samo za ekspresiju IL-17. Ovi podaci sugeriraju plasticitet u diferencijaciji Treg/Th17. In vitro generirani limfociti

Th17 ne pokazuju stabilnu citokinsku ekspresiju i mogu biti konvertirani u limfocite Th1 u limfopeničnom okružju.

Zasad nisu potpuno razjašnjeni temelji plasticiteta limfocita Th17, molekulska kontrola njihove bazične Th17 uloge niti reprogramiranja (29).

Čini se da limfociti Th17 u ljudi nastaju iz CD161+ prekursora limfocita T detektabilnih u krvi iz corde umbilicalis i timusa koji konstitutivno izražavaju ROR $\gamma$ t i IL-23R i razvijaju se u Th17 kao odgovor na IL-1 $\beta$  i IL-23 u nedostatku TGF- $\beta$ .

Značajno je da isti citokini induciraju razvoj limfocita Th1 iz CD161+ i CD161-naivnih limfocita T, dok Th17 mogu nastati samo iz CD161+ T limfocita. Štoviše, pokazano je da, u prikladnim uvjetima, Th17 limfociti mogu proizvoditi IFN- $\gamma$  (30).

Limfociti Th17 proizvode citokine IL-17A(IL-17), IL-17F, IL-21 i IL-22. Diferencijacija prema T1 ili Th17 počinje nakon izlaganja citokinima (iz imunopredočnih stanica) kao IL-12 za Th1, i TGF- $\beta$ , IL-6, IL-1 $\beta$  i IL-23 za Th17. Limfociti  $\gamma\delta$  su snažni proizvođači IL-17 u vrijeme ranog imunološkog odgovora na unutarstanične infekcije (31).

Citokin TGF $\beta$  potreban je za razvoj i Treg i Th17. Memorijski limfociti T kultivirani u prisustvu IL-1 $\beta$  i bilo IL-6 ili IL-23 secerniraju IL-17. Treg se mogu preobraziti u stanice koje luče IL-17 uz egzogeni IL-1 $\beta$ , IL-23 ili IL-21. Iz navedenoga vidljivo je da je populacija CD4 limfocita dinamičan sustav koji se oblikuje signalima lokalnog okružja sa svrhom stvaranja prikladnog imunološkog odgovora (32). Čini se da IFN- $\gamma$  i IL-4 inhibiraju stvaranje stanica koje luče IL-17. Neovisna istraživanja dokazala su da proupalni citokini IL-6 i TGF- $\beta$  induciraju diferencijaciju naivnih T limfocita u stanice koje izlučuju IL-17 in vitro. IL-2 reducira stvaranje Th17 u prisustvu IL-6 i TGF- $\beta$ . IL-27, IL-25 i retinoična kiselina djeluju negativno na stvaranje Th17 (33).

TGF- $\beta$  ima poticajnu ulogu i u stvaranju regulacijskih limfocita iz naivnih T limfocita. Ključni regulator TGF- $\beta$  ovisnog imunološkog odgovora je metabolit retinoične kiseline sposoban inhibirati pretvorbu u Th17 potaknutu s IL-6. IL-6, IL-21 i IL-23 inhibiraju ekspresiju i moguće i funkciju Foxp3 i stvaranje regulacijskog limfocita (22).

Neočekivano, mnogi su autori opisali pretvorbu Treg fenotipa u Th17, potaknuto prikladnim upalnim poticajima (34).

Ovim se mogu objasniti neki od poremećaja viđenih u autoimunih bolesti (35, 36).

Ukupan broj T limfocita u lamini propriji u ulceroznom kolitisu i Crohnoj bolesti je povećan, ali omjer CD4+:CD8+ ostaje nepromijenjen (2:1). Broj T stanica s ekspresijom molekula HLA-DR II nije povećan, ali može biti povećan broj onih koji izražavaju IL-2 receptor (CD25), kao i onih s memorijskim fenotipom CD45RO<sup>+</sup>. Lamina proprija u upalnim bolestima crijeva sadržava dva do pet puta više limfnih stanica od normalne sluznice. Također sadrži više B limfocita, osobito onih koji luče IgG (11, 37).

### 1.2.3. IL-33

Poremećaj imunološke homeostaze u UC povezan je s predominacijom Th2 imunološkog odgovora. Sluznički limfociti T u osoba sa UC luče više Th2 citokina IL-4, IL-5, i IL-13 (11,37).

IL-33 je citokin koji potiče limfocite Th2 na proizvodnju IL-4, IL-5 i IL-13. Vjerojatno tako inducira patološke promjene u crijevnoj sluznici koje su otkrivene nakon njegove primjene (38-42). Topljivi IL-33 potiče pomoćničke limfocite na proizvodnju limfokina Th2 (38-42). U laboratorijskim uvjetima, miševi tretirani IL-33 pokazuju upalne crijevne promjene. Njegova cjelovita molekula (nije odcijepljena C terminalna regija pomoću kaspaze-1) u staničnoj jezgri inhibira transkripciju gena, što zahtijeva daljnja istraživanja. Uz poznati učinak topljivog IL-33 na T limfocite preko ST2 kao i njegovo djelovanje na aktivaciju monocita, bazofila i eozinofila, dokazano je da je IL-33 sastavni dio staničnih jezgra u mnogim tkivima, uključivo i probavnoga sustava.

Citokin IL-33 je prirodni ligand ST2L receptora IL-1. Gen koji kodira IL-33 također kodira topljivu molekulu (sST2)<sub>3</sub> i ST2v. ST2L je selektivno izražen na limfocitima Th2, ali ne i Th1, te na zrelim mišjim mastocitima (40). Ligand povezan s receptorom na Th 2 pojačava njegov imunološki odgovor, dok vezan za receptor ST2L na makrofazima i sST2 ima protuupalno djelovanje. In vitro IL-33 potiče aktivirane mišje

Th2 limfocite na pojačanu proizvodnju IL-5 i IL-13. Tretman živih miševa IL-13 selektivno inducira visoku razinu IL-4, IL-5 i IL-13 u raznim tkivima, zajedno s eozinofilijom i povišenim serumskim razinama IgE i IgA. Tako dovodi do jakog upalnog oštećenja pluća i probavnog sustava s eozinofilnim infiltratima, hiperplazijom epitela i pojačanim stvaranjem sluzi (40).

Ljudska mRNA IL-33 konstitutivno je izražena u epitelnim stanicama dišnoga sustava, glatkim mišićjem koronarnih i pulmonalnih arterija. Nedavni rezultati indiciraju dualnu funkciju IL-33 proupalnog citokina i unutarstanične regulacijske molekule (40).

Rekombinantni IL-33 inducira i kemotaksiju limfocita Th2, djeluje protektivno na srce, antiaerogeno. Učinak IL-33 je poništen u nedostatku signalne receptorske podjedinice IL-1R accessory protein (IL-1RAcP) koja je dio IL-1R kompleksa indicirajući da ST2/IL-1RAcP obuhvaća IL-33 signalni receptorski kompleks IL-33 in vivo (42).

IL-33 ima obilno u endotelnim stanicama venula bogatih endotelom (engl. high endothelial venules) (HEVs), specijaliziranih krvnih sudova koji posreduju privlačenje limfocita u limfoidne organe. IL-33 povezan je s kromatinom u jezgrama endotelnih stanica HEV. Sličnu dualnu funkciju kao IL-33 pokazuju IL-1a i chromatin-associated cytokine HMGB1. IL-1a i HMGB1 su definirani kao endogeni signali opasnosti (alarmini) koji mogu alarmirati imunološki sustav nakon staničnog i tkivnog oštećenja tijekom traume ili infekcije (42).

HEV endotelne stanice jedine su ljudske stanice koje konstitutivno izražavaju endogeni IL-33 na mRNA i proteinskoj razini uživo. Uz endotelne stanice, visoka razina nuklearnog IL-33 nađena je u fibroblastičnim retikularnim stanicama (fibroblastic reticular cells (FRCs)), keratinocitima i epitelnim stanicama trbuha.

Obilna je ekspresija IL-33 u jezgrama epitelnih stanica GIT-a koje su u kontaktu s okolišem (patogeni, alergeni i dr.) što podržava mogućnost da, slično IL-1, igra ulogu u odgovoru na ozljedu ili infekciju.

U svim epitelnim i endotelnim stanicama koje izražavaju proteinsku akumulaciju IL-33 u jezgri, nije nađeno dokaza za citoplazmatsku, membransku ili izvanstaničnu

lokalizaciju. Zato još nije jasno kako IL-33 može biti otpušten iz jezgre da bi pokazao svoju citokinu aktivnost prema ciljanim stanicama sa ST2 receptorom.

Najvjerojatnije IL-33 oslobađa se iz umrlih ili umirućih stanica tijekom traume ili infekcije i funkcionira kao alarmin. Uzimajući to u obzir, mastociti, konstitutivno glavni stanični cilj za IL-33 strateški su smješteni uz stijenke krvnih sudova i epitelnih površina izloženih okolišu, te mogu igrati važnu ulogu u odgovoru na alarmin IL-33 oslobođen iz oštećenih endotelnih stanica (42).

Poznata je mastocitna uloga u alergijskim bolestima, ali su također važni kao inicijatori i efektori nespecifičnog (innate immunity) odgovora.

IL-33 izlaze kao mogući kritični aktivator mastocita za vrijeme nespecifičnog imunološkog odgovora na patogene. IL-33 može djelovati sam ili sinkronizirano s ostalim medijatorima poput stromalnog limfopoetina iz timusa (TSLP) koji epitelne stanice oslobađaju kao odgovor na traumu ili upalu (42).

Pastorelli i suradnici dokazali su specifični porast sluzničkog IL-33 u aktivnom ulceroznom kolitisu, lokalizirano primarno u crijevnim epitelnim stanicama i upalnim iniltratima kolona, povećanu ekspresiju IL-33 pune duljine, predstavljajući najjaktivniji biološki oblik detektiran u epitelu, dok je elevirana razina odcijepljenog IL-33 u serumu bolesnika sa IBD (43). Tretman UC sa Infliximab (anti-TNF) smanjuje razinu cirkulirajućeg IL-33 i porast sST2, dok stimulacija HT-29 crijevnih epitelnih stanica (engl. intestinal epithelial cells (IEC)) potvrđuje regulaciju IL-33 i sST2 sa TNF. IL-33 je značajno povišen i korelira s jakosti bolesti i snažno inducira IL-5, IL-6.

IL-17 iz sluzničnih imunih stanica u SAMP miševa. Ukratko, IL-33/ST2 sustav igra važnu ulogu u IBD i ekperimentalnom kolitisu, modulirano sa anti TNF terapijom i može biti specifičan biomarker za aktivni UC.

Slično kao IL-1 i IL-18 bilo je smatrano da je IL-33 sintetiziran kao 30 kDa prekursorska molekula te odcijepljena kaspazom-1 u 18 kDa bioaktivnu formu. Nedavne studije promijenile su ovu paradigmu sugerirajući da je cijela duljina 30 kDa IL-33 bioaktivna forma a manje aktivna forma rezultat kaspaza-3 i kaspaza-7 odcijepljenja. IL-33 pokazuje specijalni efekt u crijevima, zato što miševi tretirani rekombinantnim IL-33

pokazuju epitelnu hiperplaziju i eozinofilno/neutrofilnu infiltraciju sluznice debeloga crijeva (43).

Za vrijeme aktivnog UC zamijećena je unutarstanična akumulacija cijele duljine IL-33 (full-length) i smanjenje ST2L i čini se da je regulirano TNF. TNF ima mogućnost poticanja pojačnog stvaranja oboje IEC-deriviranog f-IL-33 i sST2 in vitro. Tretman IBD pacijenata s anti-TNF modelira razinu cirkulirajućeg IL-33 i sST2, osobito u UC pacijenata. Takvo djelovanje TNF na stvaranje IL-33 također je potvrđeno u SAMP miševa, spontani model kronične crijevne upale karakterizirane miješanim Th1/Th2 imunim fenotipom u čemu je IL-33 povišen i korelira s težinom bolesti inducirajući IL-5, IL-6 i IL-17 iz mezenteričnih limfnih čvorova i pokazuje sličan obrazac sluznične stanične proizvodnje kao IBD pacijenti (43).

Zajedno, podaci sugeriraju da je sustav IL-33/ST2 snažno aktiviran u IBD i specifična neravnoteža između IL-33/ST2 može imati patogeničnu ulogu u UC.

Za vrijeme aktivnog UC i SAMP enteritisa IL-33 pojačano se stvara osobito u intestinalnim epitelnim stanicama i infiltriranim mononukleara u lamini proprijii.

Iako slične, mukozne stanice debelog crijeva izražavaju ST2, način ekspresije značajno je različit u endoskopskom bioptatu sluznice debelog crijeva zdravih osoba u usporedbi s IBD.

U makroskopski neupaljenom bioptatu zdrave osobe ST2 je primarno nađen u epitelu, dok u UC ili CD u lamini proprijii a prividno iščezlom u intraepitelim stanicama.

Zanimljivo, smanjene ili izostanak ST2 u oba, UC i CD, može biti specifično za IBD jer nespecifični kolitis ne pokazuje epitel specifični deficit (43).

Epitel je kritična komponenta crijevnog imunog sustava, jer predstavlja primarnu barijeru između domaćina i antigena okoline. IEC ima mogućnost prepoznati patogene preko receptora nespecifičnog imunog sustava, odgovarajući oslobađanjem antimikrobnih peptida i usklađivanjem početnih događaja imunološkog odgovora, npr. sekrecijom pro/anti upalnih medijatora i citokina (43).

IEC specifični porast IL 33 u aktivnom UC i SAMP, osobito 30kDa oblik s pojačanom proupalnom aktivnošću može biti posljedica interakcije sa komensalima i/ili



luminalim patogenima tako potičući upalni odgovor i kronični Th2 posredovani kolitis. IL-33 mRNA razina korelira s aktivnošću bolesti u SAMP miševa i in vitro IL-33 stimulacija aktiviranih MLN primarno transportiranih iz upaljenoga crijeva značajno povišuje proizvodnju IL-5 i IL-6, citokina kritičnih za SAMP enteritis zato što anti IL-1 i IL-6 strategija ublažava crijevnu upalu u ovom IBD modelu.

Iako u SAMP ileitisu uloga IL-17 i Th 17 imunološki odgovor još nije definiran, poznato je da oni igraju središnju ulogu u kroničnoj crijevnoj upali i njihova je indukcija IL-33 sukladna opisanim u drugim organskim sustavima.

Tako lokalna proizvodnja IL-33 može predstavljati primarnog posrednika u promicanju proupalnog sluzničnog imunološkog odgovora sposobog izazvati kroničnu crijevnu upalu (43).

Pokazano je značajno smanjenje ST2L, transmembranskog signalnog receptora u epitelu UC.

Obratno, sST2 je povišen i u koloničkim biopstatima i sistemske cirkulaciji, primarno proizveden od sluzničkih LPMC i vjerojatno cirkulirajućih PBMC.

Neutralizacija TNF dovodi do smanjenja IL-33. In vitro TNF inducira unutarstaničnu akumulaciju fIL-33.

Dokazano je da IL-33 i ST2 mogu biti kritični medijatori u patogenezi UC, prikazano u porastu IL-33/ST2 neravnoteže.

Izoforme IL-33 različito doprinose patogenezi. IEC derivirani IL-33 snažno potiče i podržava lokalni Th 2 sluznični odgovor, dok specifične izvanstanične proteaze odcjepljuju IL-33 u manje aktivne 20-do 22 kDa oblike. Oni su detektirani u visokoj razini u serumu pacijenata sa UC i mogu služiti kao cirkulirajući biomarker za UC.

Neutralizacija IL-33 u eksperimentalnih modela kolitisa i pacijenata sa UC osigurat će definitivni dokaz podršci patogene uloge sustava IL-33/ST2 u IBD (43).

IL-33 posjeduje sposobnost poticanja patogenog Th2 i Th17 odgovora u limfnome tkivu povezanom sa crijevima (mezenterijski limfni čvorovi, slezena, limfociti u mezenterijskom masnom tkivu), dok također pomaže cijeljenju upalno oštećene crijevne sluznice te funkcionira kao alarmin pripadajući velikoj obitelji molekula povezanih s

obrascem molekula povezanih s oštećenjem stanica (engl. damage-associated molecular pattern (DAMP) molecules (42).

Daljnje su studije potrebne za potvrdu moguće dihotomne uloge IL-33 tijekom kronične crijevne upale i rasvjetljenje uloge IL-33 u patogenezi IBD.

#### 1.2.4. IL-17

IL-17 je proizvod limfocita Th17, dendritičnih stanica i limfocita  $\gamma\delta$  T (44, 45). IL-17 (sinonim IL-17A) je arhetipska molekula za cijelu obitelj citokina IL-17. Funkcionalno je smješten na poveznici prirodene i stečene imunosti. Inducira oslobađanje kemokina i čimbenika rasta iz mezenhimskih stanica i danas ima značenje važnog lokalnog orkestratora nakupljanja neutrofila u raznim organima. Ta citokinska obitelj uključuje IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17F i IL-17E.

IL-17 je homodimerni glikoprotein sastavljen od 155 aminokiselina sa molekularnom težinom 35 kDa. Najveću strukturnu i funkcionalnu sličnost s njim pokazuje IL-17 i postoje dokazi da CD4 limfociti mogu proizvoditi i heterodimere IL-17–IL-17F sličnih proupalnih svojstava (44, 46). Za članove obitelji citokina IL-17 tipične su neke ključne karakteristike: pseudocistinski nabrani čvor napravljen od parova beta lanaca (povezanih disulfidnim vezama) i sličnog redoslijeda aminokiselina prema C-kraju (44).

U miševa početna polarizacija naivnih Th limfocita prema podtipu Th17 ovisi o receptorskom prijenosu signala i prisustvu transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta$  (engl. transforming growth factor-  $\beta$ ) i IL-6. Ova dva citokina induciraju ekspresiju transkripcijskog čimbenika ROR $\gamma$ -t (engl. retinoid-related orphan receptor) u STAT (engl. signal transducers and activators of transcription)-3-ovisnom putu (44).

Smatra se da je ROR $\gamma$ -t glavni regulator diferencijacije Th17 limfocita. TGF- $\beta$ , zajedno sa IL-6 potiče ekspresiju inducibilnog lanca receptora za IL-23. IL-23 snažno potiče limfocite Th17 na proizvodnju IL-17. IL-6 potiče stvaranje IL-21 za koji se čini da autokrino potiče diferencijaciju limfocita Th17. Interferon  $\gamma$  i IL-2 inhibiraju Th17

diferencijaciju (44, 35). CD8 i  $\gamma\delta$  limfociti T, Panethove stanice, čak i granulociti mogu proizvoditi IL-17.

IL-17 stimulira receptorski kompleks koji se sastoji od IL-17RA i IL-17RC. IL-17RA je transmembranska bjelančevina sastavljena od 293 ekstracelularnih aminokiselinskih domena, 21 transmembranskih i 521 citoplazmatskih. Ovaj je receptor izražen u epitelnim stanicama, fibroblastima, limfocitima T i B i stromalnim stanicama koštane srži. IL-17RC također je transmembranska bjelančevina sa više od 90 opisanih izoformi u čovjeka. Otkriveni su i drugi IL-17 receptori (IL-17RB, IL-17RD i IL-17RE) (44, 47).

IL-17 uglavnom aktivira transkripcijski NF- $\kappa$ B put preko aktivatora Act1 i TRAF6 (engl. tumor necrosis factor (TNF)-receptorassociated factor (TRAF)6. Kaskadni slijed u konačnici rezultira aktivacijom transkripcijskih čimbenika poput NF- $\kappa$ B, C/EBP-b i C/EBP-g i indukcijom sekrecije citokina koji mobiliziraju neutrofile (44, 47). Postoje i drugi signalni putovi neovisni o Act-1 kojima IL-17 dovodi do genske aktivacije i sekrecije citokina (uključena Janus kinaza 1).

IL-17 inducira oslobađanje raznih kemokina (npr. IL-8), čimbenika rasta iz mezenhimnih stanica (npr. GM-CSF-poticajni čimbenik granulocitnih i makrofagnih skupina), proupalnih citokina (npr. IL-6), kostimulatornih molekula (npr. unutarstanična adhezijska molekula-1) iz stromalnih/mezenhimskih stanica i antimikrobnih molekula (poput  $\beta$  defenzina u crijevima).

Oslobađanje ovih molekula dovodi do novačenja i aktivacije neutrofila i pojačanja tkivne upale sa značajnom ulogom u razvitku autoimunih bolesti (44).

#### 1.2.5. sPSGL-1

Selektini P, E i L pripadaju staničnim adhezijskim molekulama i oni su površinski stanični glikoproteini odgovorni za inicijalno povezivanje leukocita iz krvotoka s endotelnim stanicama žilne stijenke i posljedično kotrljanje uz endotel i ekstravazaciju u okolno tkivo (48).

Selektini su sastavljeni od N-terminalne lecitinske domene, domene epidermalnog čimbenika rasta (engl. epidermal growth factor (EGF)), 2, 6 ili 9 ponavljajućih sljedova aminokiselina, transmembranske i citoplazmatske domene (49).

L selektin je izražen na leukocitima, P i E na aktiviranim endotelnim stanicama. Aktivirani trombociti izražavaju P selektin (50).

Selektini su uključeni u migraciju neutrofila, monocita, limfocita T i trombocita. Nedostatak selektina ili selektinskih liganada dovodi do opetovanih bakterijskih infekcija i kronične bolesti (49).

Selektini se labavo vežu na sialilLewisx slične glikane (Slex), ali s visokim afinitetom prema receptorima PSGL-1 (48). PSGL-1 je transmembranska bjelančevina koja oblikuje homodimere preko disulfidnih veza. Sadrži 2 jednaka glikoproteinska lanca od 120 kD.

PSGL-1 ima brojne sialatne fukozilatne O vezane oligosaharidne ogranke od kojih mnogi završavaju u sLex epitopu.

Kao dodatak fukozi i sialičnoj kiselini, interakcija PSGL-1 i P selektina zahtijeva barem jedan tirozin sulfat smješten u aminoterminalnoj sekvenci. PSGL-1 konstitutivno izražavaju svi leukociti i posreduju u kotrljanju neutrofila na P selektinu. PSGL-1 služi kao ligand za L selektin u neutro-neutrofilnim interakcijama (50, 51).

Miševi uzgojeni s nedostatkom gena koji kodira PSG-1 pokazuju usporenje privlačenja neutrofila ka stijenci krvnih žila i umjerenu neutrofiliju (trostruko povećanje), slično kao i u miševa bez gena za P selektin.

Posljedično nedostatak selektina ili selektinskih liganada dovodi do opetovanih bakterijskih infekcija i kronične bolesti u životinja i ljudi. Poznata je rijetka bolest deficijencija adhezije leukocita tip II (engl. leukocyte adhesion deficiency type II (LAD-II)). U tih osoba postoji mutacija gena za prijenosnik fukoze i nema učinkovite ugradnje fukoze u PSGL-1. Posljedično, neutrofilni ne dolaze na mjesto infekcije i stalne su bakterijske upale (49)

Monoklonska Pt na PSGL-1 prepoznaju epitop unutar tirozin sulfatnog motiva i blokiraju prepoznavanje P selektina (52). Solubilni oblik PSGL-1 ima također sposobnost

vezivanja P selektina i kompetitivan je staničnom PSGL u mnogim fiziološkim i patološkim procesima.

Inhibicija trombocitno leukocitnog vezivanja sa rekombinantnim SGL-1 Ig (ligand visokog afiniteta za P selektin) pokazuje korist u životinjskih modela angioplastike karotida značajno reducirajući adheziju neutrofila i trombocita na oštećene arterijske stijenke (53).

Vowinkel i suradnici dokazali su da su privlačenja leukocita i trombocita u inflamiranim venulama kolona miševa s kolitisom induciranim dekstran natrij sulfatom međusobno povezani i uključuju interakciju P selektina izraženog na endotelnim stanicama i trombocitima sa PSGL-1 s površine leukocita i endotelnih stanica.

Tretman protutijelima protiv PSGL-1 značajno je smanjio upalu u DSS kolitisu (54).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. izmjeriti i usporediti serumske koncentracije IL-33 u krvi ispitanika koji boluju od ulceroznog kolitisa i u krvi zdravih ispitanika. Dualna funkcija IL-33 (ekstracelularno i unutar stanične jezgre priječi postavljanje hipoteze o mogućim razlikama između skupina.
2. izmjeriti i usporediti serumske koncentracije IL-17 u krvi ispitanika koji boluju od ulceroznog kolitisa i u krvi zdravih ispitanika iz kontrolne skupine. Očekuje se da će koncentracija IL-17 biti viša u krvi ispitanika s ulceroznim kolitisom.
3. izmjeriti i usporediti serumske koncentracije sPSGL-1 u krvi ispitanika koji boluju od ulceroznog kolitisa i u krvi zdravih ispitanika iz kontrolne skupine.

Očekuje se da će koncentracija sPGL-1 biti viša u krvi ispitanika s ulceroznim kolitisom u odnosu na kontrolnu skupinu.

### 3. METODE ISTRAŽIVANJA

#### 3.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u KBC Split u skupini bolesnika s ulceroznim kolitisom, obaju spolova, kojima je napravljena kolonoskopija te histološki dokazan ulcerozni kolitis, koji su u razdoblju od 18. rujna 2008. do 01. travnja 2009. posjetili ili bili pozvani u gastroenterološke jedinice i ambulante KBC Split. Tri su od 21 prikladnih ispitanika bili isključeni iz istraživanja poradi prethodne imunomodulatorne i/ili imunosupresivne terapije kortikosteroidima. Skupina bolesnika uključivala je 18 ispitanika (10 muškaraca i 8 žena) dobi između 20 i 65 godina (medijan 52 godine), s prosječnim indeksom kliničke aktivnosti (CAI) od 4.5.

U kontrolnoj skupini bilo je 16 zdravih dragovoljaca (10 muškaraca i 6 žena) bez anamneze gastrointestinalnih bolesti. Oni su unovačeni među dragovoljnim darivateljima krvi u dobi između 19 i 59 godina (medijan 46.5).

Istraživanje sPSGL.1 provedeno je u KBC Split, tijekom druge polovice 2012. godine, u skupini bolesnika s ulceroznim kolitisom obaju spolova, kojima je napravljena kolonoskopija te histološki dokazan ulcerozni kolitis. Dva su ispitanika isključena poradi kortikosteroidne i imunobiološke terapije.

Skupina bolesnika uključivala je 20 ispitanika (9 muškaraca i 11 žena) dobi između 19 i 65 godina (medijan 42 godine), 19 je bilo na preparatima ASA, jedno bez terapije.

U kontrolnoj skupini bilo je 20 zdravih dragovoljaca (18 muškaraca i 2 žene) bez anamneze gastrointestinalnih bolesti. Oni su unovačeni među dragovoljnim darivateljima krvi u dobi između 21 i 64 godina (medijan 38.5).

### 3.2. Postupci

#### Određivanje citokina

Centrifugirani uzorci krvi uzeti od ispitanika koji boluju od ulceroznog kolitisa i zdravih ispitanika iz kontrolne skupine pohranjeni su na -20 stupnjeva do analize. Dvoslojni (sandwich) imunoenzimski test (ELISA) na poluautomatskom analizatoru mini-Boss (Biomedica Medizinprodukte GmbH, Vienna, Austria) korišten je za kvantitativno određivanje serumske koncentracije IL-33 i IL-17. Koncentracija IL-33 u serumu određena je ELISA testom iz standardne krivulje, primjenom standarda poznate koncentracije (od 0 pg/ml do 500 pg/ml). Osjetljivost je testa manja od 7 pg/ml. U radu su korišteni testovi Human IL-33 ELISA Quantitation Kit, tvrtke GenWay Biotech, Inc. (6777 Nancy Ridge Drive San Diego, CA 92121). Uzorci seruma su pohranjeni na temp od -20°C do određivanja.

Koncentracija IL-17 u serumu određena je ELISA testom iz standardne krivulje, primjenom standarda poznate koncentracije (od 0 pg/ml do 2000 pg/ml). Prema navodu proizvođača osjetljivost je testa manja od 15 pg/ml. U radu su korišteni testovi Quantikine Human IL-17 Immunoassay ELISA, tvrtke R&D Systems, Inc. Uzorci seruma su pohranjeni na temp od -20°C do određivanja.

Koncentracija sPSGL-1 u serumu određena je ELISA testom iz standardne krivulje, primjenom standarda poznate koncentracije (od 1.6 do 50 U/ml). Prema navodu proizvođača osjetljivost testa je manja od 1.0 U/ml.

U radu su korišteni testovi Human sPSGL-1 Platinum ELISA, tvrtke eBioscience. Uzorci seruma su pohranjeni na temp od -20°C do određivanja.

### 3.3. Materijali

Human IL-33 ELISA Quantitation Kit, tvrtke GenWay Biotech, Inc. (6777 Nancy Ridge Drive San Diego, CA 92121);

Quantikine Human IL-17 Immunoassay ELISA, tvrtke R&D Systems, Inc;

Human sPSGL-1 Platinum ELISA, tvrtke eBioscience;

poluautomatski analizator mini-Boss (Biomedica Medizinprodukte GmbH, Vienna, Austria).

### 3.4. Statistički postupci

Koncentracije interleukina su kvantitativne varijable. Mjerna jedinica je pg/ml.

Statistička značajnost razlika koncentracija IL-33 između skupine ispitanika s ulceroznim kolitisom i kontrolne skupine analizirana je korištenjem Mann-Whitney U-testa. Prihvaćena razina značajnosti razlika bila je  $p < 0.05$ . Podaci dviju skupina prikazani su kao medijani i interkvartilni rasponi.

Statistička značajnost razlika koncentracija IL-17 između skupine ispitanika s ulceroznim kolitisom i kontrolne skupine analizirana je korištenjem Mann-Whitney U-testa. Prihvaćena razina značajnosti razlika bila je  $p < 0.05$ . Podaci dviju skupina prikazani su kao medijani i interkvartilni rasponi.

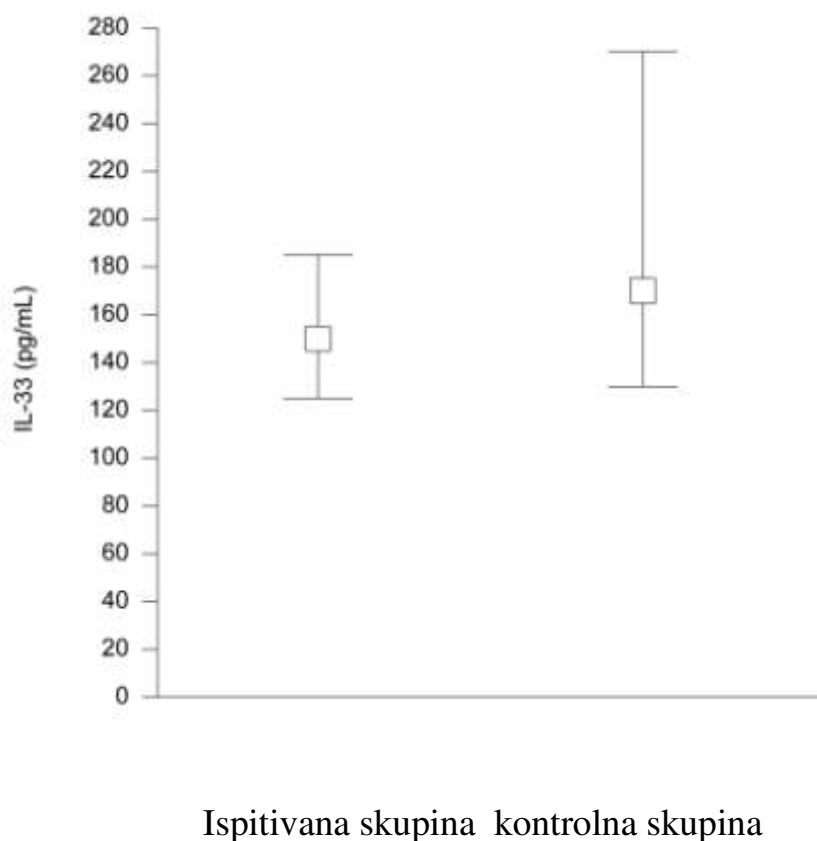
Statistička značajnost razlika koncentracija sPSL-1 između skupine ispitanika s ulceroznim kolitisom i kontrolne skupine analizirana je korištenjem Studentovog t-testa. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD. Prihvaćena razina značajnosti razlika bila je  $p < 0.05$ . Za analizu je korišten Statistical Package for the Social Sciences 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).



## 4. REZULTATI

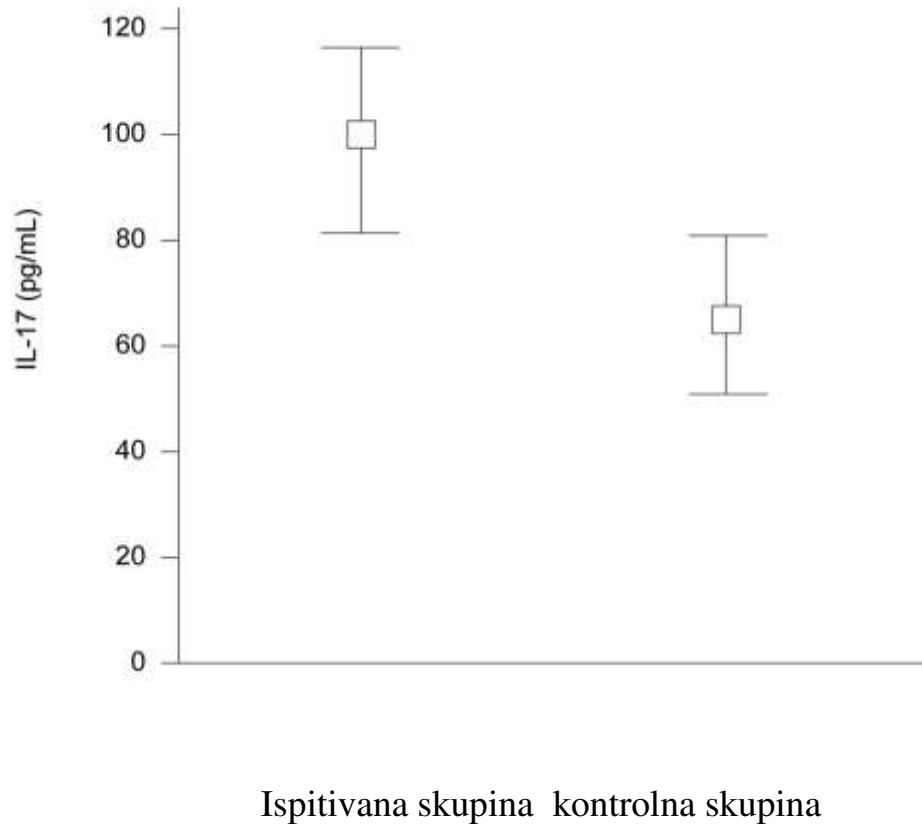
Medijan koncentracije IL-33 u skupini s ulceroznim kolitisom bio je 140 pg/ml s interkvartilnim rasponom (Q) 72.5, a medijan koncentracije IL-33 u kontrolnoj skupini (16 ispitanika) bio je 165 s interkvartilnim rasponom 140 (slika 1).

Razlika između dviju skupina nije bila statistički značajna (Mann-Whintney U= 112, p= 0,281).



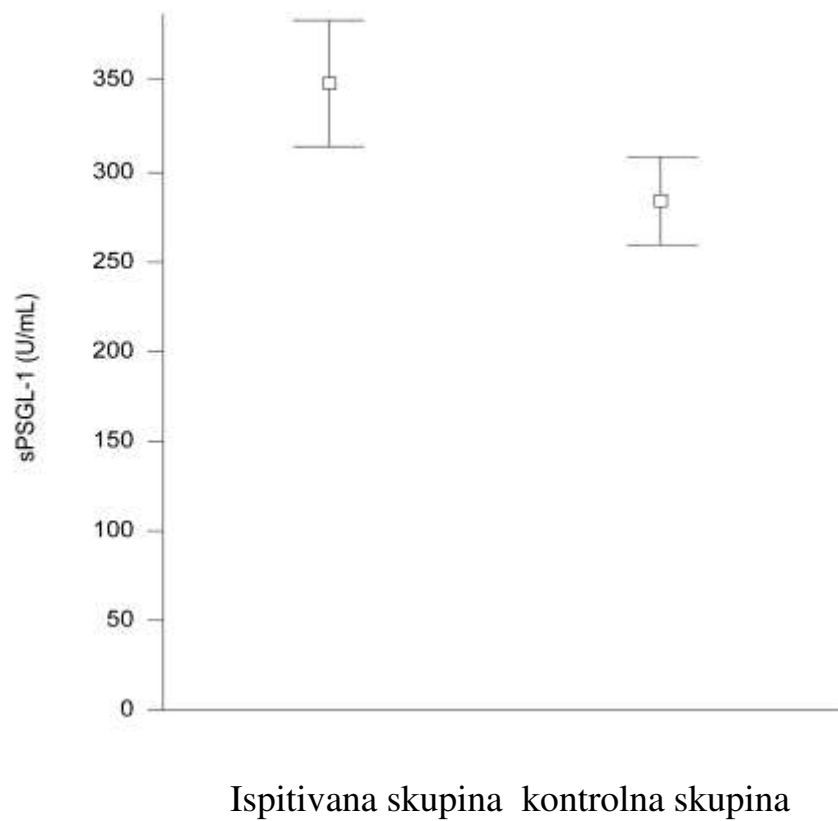
**Slika 1.** Razine serumskog IL-33 u ispitanika s ulceroznim kolitisom i u kontrolnoj skupini. Kvadrati - medijan; omeđene crte - interkvartilni raspon

Medijan koncentracije IL-17 mjerene u krvi 18 ispitanika iz skupine s ulceroznim kolitisom bio je 100, u kontrolnoj 65 pg/ml. Razlika je statistički značajna (Mann-Whintney  $U = 233$ ,  $p = 0.0023$ ) (slika 2).



**Slika 2.** Serumska razina IL-17 u ispitanika s ulceroznim kolitisom i u kontrolnoj skupini. Kvadrati - medijan; omeđene crte - interkvartilni raspon

Aritmetička sredina koncentracije sPSGL-1 u skupini s ulceroznim kolitisom bila je 349,97 sa SD 75,40, a u kontrolnoj skupini 284,39 sa SD 52,40. Postoji statistički značajna razlika  $p = 0,003$  (slika 3).



**Slika 3.** Razine seruskoga sPSG-1 u ispitanika s ulceroznim kolitisom i u kontrolnoj skupini. Kvadrati - aritmetička sredina; omeđene crte - SD

## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju mjerene su koncentracije IL-33 i IL-17 u perifernoj krvi ispitanika s ulceroznim kolitisom te u kontrolnoj skupini.

Razlog radi čega su u istraživanje uključeni samo bolesnici s ulceroznim kolitisom koji nisu prethodno primali imunomodulatornu ili imunosupresivnu terapiju temelji se na pretpostavci da takva terapija mijenja stvarni imunološki status. U prilog tome govori istraživanje Moka i suradnika koji su dokazali da pacijenti sa sistemskim lupusom koji su na prednizolonskoj terapiji imaju višu serumsku vrijedost topljivog receptora za IL33 sST2 (55). Analiza monocita/makrofaga u cirkulaciji i temporalnim arterijama osoba koje boluju od temporalog arteritisa pokazala je glukokortikoidima posredovanu supresiju citokina koji potiču aktivaciju Th-17 (IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-23) (56).

Pastorelli je pokazao da infliximab (anti-TNF) snizuje razinu cirkulirajućeg IL-33 i povisuje sST2. Liew i suradnici istaknuli su protektivnu ulogu IL 33 prema parazitozama, ali i promociju patogeneze astme i zglobnih upala, atopijskog dermatitisa (57).

U našem smo radu pokazali da nema značajne razlike u koncentracijama IL-33 u perifernoj krvi između ispitivane i kontrolne skupine. Ovakav je rezultat u skladu sa spoznajom da primarni biološki učinak ovog interleukina nije citokinska uloga, nego transkripcijski učinak, što zahtijeva daljnja istraživanja. Mogući je dokaz toj tvrdnji visoka ekspresija IL-33 u jezgrama mnogih stanica, iako njegova uloga nije u potpunosti rasvijetljena.

U laboratorijskim uvjetima, miševi tretirani IL-33 pokazuju upalne crijevne promjene. Njegova cjelovita molekula (nije odcijepljena C terminalna regija pomoću kaspaze-1) u staničnoj jezgri inhibira transkripciju gena, što zahtijeva daljnja istraživanja. Uz poznati učinak topljivoga IL-33 na T limfocite preko ST2 kao i njegovo djelovanje na aktivaciju monocita, bazofila i eozinofila, dokazano je da je IL-33 sastavni dio staničnih jezgra u mnogim tkivima, uključivo i probavnoga sustava.

Pastorelli i suradnici dokazali su povećanu lokalnu ekspresiju IL-33 u crijevnim epitelnim stanicama u aktivnom ulceroznom kolitisu. U epitelu je bila povećana

ekspresija cjelovitog IL-33 (najaktivniji biološki oblik), dok je koncentracija odcijepljenoga IL-33 bila povišena u serumu osoba s upalnom crijevnom bolešću (43).

IL-17 potiče oslobađanje kemokina, čimbenika rasta, proupalnih citokina i kostimulatornih molekula koje dovode do lokalnog nakupljanja i aktivacije neutrofila i, posljedično, pojačanja upale.

U ovom istraživanju nađene su statistički značajno više koncentracije proupalnog IL-17 u serumu ispitanika s ulceroznim kolitisom u odnosu na zdrave ispitanike iz kontrolne skupine, slično kao u istraživanju Fujina i suradnika iz 2003. godine (58).

Međutim, u serumu zdravih japanskih ispitanika u tome istraživanju nije u serumu detektiran IL-17, dok su vrijednosti hrvatskih ispitanika iz kontrolne skupine najmanje šest puta više. U upaljenoj crijevnoj sluznici povećana je količna mRNA IL-17, kao i u eksperimentalnim modelima kolitisa.

Ali uz evidentnu ulogu pojačivača upale, s čime su u skladu i naši rezultati povišene koncentracije IL-17 u skupini bolesnika sa UC u odnosu prema kontrolnoj skupini, IL-17A protektivno djeluje na crijevnu endotelnu barijeru modelirajući čvrste sveze (engl. tight junctions) preko kladina i pojačavajući ekspresiju antimikrobnih peptida (59).

Potencijalna terapijska korist blokade IL-17, koristeći topljivi IL-17 receptor-Ig fuzijski protein ili ciljano autocepivo, koinhibicijom IL-12 i IL-23 ili inhibicijom TNF $\alpha$ , nije potvrđena istraživanjima na ljudima.

Buduće rasvjetljavanje imunološke i patogenične uloge IL-17 nužno je da se odgovori na pitanje: ima li povišena koncentracija IL-17 u ulceroznom kolitisu protektivno ili štetno djelovanje.

U upaljenoj crijevnoj sluznici povećana je količna mRNA IL-17, kao i u eksperimentalnim modelima kolitisa.

Uz dokazan proupalni učinak IL-17, protutijela na IL-17 i receptor za IL-23 u eksperimentalnih životinja inhibira kolitis induciran enterotoksičnim *Bacteroides fragilis* (ETBF), hiperplaziju i stvaranje tumora (60).

Za potvrdu potencijalne terapijske koristi blokade IL-17 potrebna su buduća istraživanja.

Limitiranost ovog istraživanja ogleda se u činjenici da je uključen relativno mali broj ispitanika, što je posljedica činjenice da je većina u prošlosti primala imunosupresivnu ili imunomodulatornu terapiju čime su onemogućeni sudjelovati u istraživanju.

Zaključno, čini se da je primarno citokinsko okruženje (TGF-beta ili TGF-beta plus IL-6) u kojemu se nalaze zajednički prekursor T reg ili Th17, ipak najvažnije mjesto djelovanja neke buduće imunološke terapije.

Prema dostupnoj literaturi, do ovog istraživanja, nije mjerena koncentracija sPSGL-1 u krvi bolesnika sa UC u odnosu na koncentraciju u krvi zdravih ispitanika.

Dokazali smo značajno povišenu koncentraciju sPSGL-1 u perifernoj krvi bolesnika s ulceroznim kolitisom prema kontrolnoj skupini.

U lamini propriji zdrave crijevne stijenke nema neutrofila. Glavna značajka aktivne upalne crijevne bolesti je infiltracija intestinalnih lezija neutrofilima.

Neutrofilima su najodgovorniji za tkivna oštećenja u IBD, a na njihovoj se membrani nalaze i selektini i PSGL-1 koji veže selektine smještene na neutrofilima, trombocitima, endotelnim stanicama, dijelom i limfocitima. Monociti izražavaju PSGL, kao i endotene stanice. Molekule PSGL-1 nalaze se i slobodne u cirkulaciji, s jednakom biološkom ulogom. Posljedica ovih interakcija po neutrofile je usporavanje njihova protoka kroz žile, privlačenje stijenkama i ekstravazacija. Proizvodnja nefunkcionalne molekule PSGL-1 otkrivena je u bolesnika s rijetkom bolešću nazvanom deficijencija leukocitne adhezije tip II (engl. leukocyte adhesion deficiency type II (LAD-II)). Te osobe imaju mutaciju gena za prijenos fukoze što ima za posljedicu prolongiranje upala (posljedica nemogućnosti odlaska leukocita na mjesto upale). Učinci korisnosti selektivne inhibicije dosad su istraživani u pokusima transplatacije organa, prevenciji restenoze nakon angioplastike i postavljanja stentova (49).

Brown je dokazao da nedostatak PSGL-1 u miševa ublažuje kolitis izazvan DSSom, snižava broj CD4+ limfocita T i proizvodnju Th1 i Th17 citokina (61).

Primjenom protutijela protiv PSGL-1 u miševa reduciran je u lamini propriji ukupan broj makrofaga, dendritičnih stanica i limfocita B, te inducirana niža ekspresija MHC-II na dendritičnim stanicama i makrofazima (62).

U ovom su radu pokazane značajno povišene vrijednosti sPSGL-1 u krvi osoba koje boluju od ulceroznog kolitisa prema zdravim ispitanicima . Kratkotrajnom blokadom anti PSGL-1 protutijelima bilo bi moguće blokirati transport neutrofila i oslabiti aktivnost UC, što zahtijeva daljnja istraživanja.

## 6. ZAKLJUČAK

1. U ovom kliničkom istraživanju nema statistički značajne razlike u koncentraciji IL-33 u perifernoj krvi ispitanika s ulceroznim kolitisom prema koncentracijama u krvi kontrolne skupine zdravih dragovoljaca.
2. Značajno je povišena koncentracija IL-17 u perifernoj krvi ispitanika s ulceroznim kolitisom prema kontrolnoj skupini.
3. Pokazana je statistički značajno viša koncentracija sPSGL-1 u serumu ispitanika s ulceroznim kolitisom u odnosu na zdrave ispitanike iz kontrolne skupine.

## 7. SAŽETAK

Poremećaj imunološke homeostaze u UC povezan je s predominacijom Th2 imunološkog odgovora. Sluznički limfociti T u osoba sa UC luče više Th2 citokina IL-4, IL-5 i IL-13.

IL-33 je citokin koji potiče limfocite Th2 na proizvodnju IL-4, IL-5 i IL-13. Vjerojatno tako inducira patološke promjene u crijevnoj sluznici koje su otkrivene nakon njegove primjene (38-42). Topljivi IL-33 potiče pomoćničke limfocite na proizvodnju limfokina Th2.

Limfociti Th17, dendritične stanice i  $\gamma\delta$  T limfociti proizvode IL-17. On pobuđuje oslobađanje raznih kemokina (npr. IL-8), čimbenika rasta iz mezenhimskih stanica, proupalnih citokina (npr. IL-6) i kostimulatornih molekula iz stromalnih stanica. Oslobađanje ovih molekula dovodi do pojačanja tkivne upale.

Nejasna je uloga IL-17 u razvoju crijevne upale, jer djeluje protektivno u deksran natrij sulfatom induciranom kolitisu u miševa.

Selektini P, E i L pripadaju staničnim adhezijskim molekulama i oni su površinski stanični glikoproteini odgovorni za inicijalno povezivanje leukocita iz krvotoka s endotelnim stanicama žilne stijenke i posljedično kotrljanje uz endotel i ekstravazaciju u okolno tkivo. Uključeni su i u migraciju monocita, limfocita T i trombocita.

PSGL-1 konstitutivno izražavaju svi leukociti i posreduju u kotrljanju neutrofila na P selektinu. PSGL-1 služi kao ligand za L selektin u neutro-neutrofilnim interakcijama.

U miševa uzgojenih s nedostatkom gena koji kodira PSG-1 pokazuje se usporenje privlačenja neutrofila ka stijenci krvnih žila i umjerena neutrofilija (trostruko povećanje), slično kao i u miševa bez gena za P selektin.



## Ciljevi

1. kvantitativno odrediti i usporediti koncentraciju citokina IL-33 u perifernoj krvi bolesnika s ulceroznim kolitisom s koncentracijom IL-33 u krvi zdravih ispitanika iz kontrolne skupine;
2. kvantitativno odrediti koncentraciju citokina IL-17 u perifernoj krvi bolesnika s ulceroznim kolitisom u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika;
3. izmjeriti koncentraciju sPSGL-1 u perifernoj krvi bolesnika s ulceroznim kolitisom u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika.

## Metode

Dvoslojni (sandwich) imunoenzimski test (ELISA) korišten je za kvantitativno određivanje serumske IL-33, IL-17 i sPSGL-1.

## Rezultati

Medijan koncentracije IL-33 mjerene u krvi 18 ispitanika iz skupine s ulceroznim kolitisom bio je 140 pg/ml s interkvartilnim rasponom (Q) 72.5, a medijan koncentracije IL-33 u kontrolnoj skupini (16 ispitanika) bio je 165 s interkvartilnim rasponom 140. Razlika između dviju skupina nije bila statistički značajna (Mann-Whintney U = 112, p= 0,281).

Medijan koncentracije IL-17 u skupini s ulceroznim kolitisom bio je 100, u kontrolnoj 65 pg/ml. Razlika je statistički značajna (Mann-Whintney U= 233, p= 0.0023).

Aritmetička sredina vrijednosti sPSGL-1 u skupini s ulceroznim kolitisom bila je 349,97 sa SD± 75,40, a u kontrolnoj skupini 284,39 sa SD 52,40. Postoji statistički značajna razlika između skupina p = 0,003.

## Zaključak

Nema razlike u koncentracijama IL-33 u perifernoj krvi ispitanika s ulceroznim kolitisom prema kontrolnoj skupini. Ovakav je rezultat u skladu sa spoznajom da primarni biološki učinak ovog interleukina nije citokinska uloga, nego transkripcijski učinak, što zahtijeva daljnja istraživanja.

Značajno je povišena koncentracija IL-17 u perifernoj krvi ispitanika s ulceroznim kolitisom u odnosu prema kontrolnoj skupini.

Značajno je povišena koncentracija sPSGL-1 u perifernoj krvi ispitanika s ulceroznim kolitisom u odnosu prema kontrolnoj skupini. Privremena blokada PSGL- 1 i posljedična inhibicija ekstravazacije neutrofila mogla bi postati novi terapijski postupak u liječenju UC.

## 8. SUMMARY

**Background:** Disturbance of immune homeostasis in ulcerative colitis (UC) is related to the predominance of T-helper-2 (Th2) immune response. Interleukin (IL)-33 stimulates Th lymphocytes to produce Th2 cytokines, such as IL-4, IL-5, and IL-13, which are believed to induce pathological changes in the intestinal mucosa.

IL-17, also called IL-17A, is produced by Th17, dendritic (DCs) and  $\gamma\delta$  T cells. It induces the release of different chemokines (e.g., IL-8), growth factors from mesenchymal cells (e.g., granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), proinflammatory cytokines (e.g., IL-6), and co-stimulatory molecules (e.g., intercellular adhesion molecule-1) from stromal/mesenchymal cells. The release of these molecules leads to the recruitment and activation of neutrophils and increase in tissue inflammation. The role of IL-17 in the development of intestinal inflammation has been disputed since it did not contribute significantly to CD4+ T cell adoptive transfer colitis model and it played a protective role in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis.

P-, E- and L-selectin constitute a family of cell adhesion receptors that are involved in trafficking of neutrophils, monocytes and platelets.

The initial process of leukocyte capture from blood vessels includes P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1)- P-selectin interactions which might be of importance in leukocyte recruitment in human inflammatory bowel disease (IBD).

Absence of selectins or selectin ligands, leading to recurrent bacterial infections and persistent disease.

Our aim was to determine serum concentrations of IL-33 and IL-17, and soluble PSGL-1 in patients with UC and healthy controls.

**Methods:** Serum concentrations of IL-33 and IL-17 were measured in 18 patients (8 women and 10 men) with UC and 16 control subjects (6 women and 10 men) by using two-layer immunoenzyme procedure (ELISA).

Serum concentrations of sPSGL-1 were measured in 20 patients (11 women and 9 men) and 20 control subjects (2 women 18 men).

**Results:** Median serum concentrations of IL-33 in patients with UC and controls were 140 pg/mL (interquartile range [IQR], 72.5 pg/mL) and 165 pg/mL (IQR, 140.0 pg/mL), respectively, but the difference was not statistically significant (Mann-Whitney U = 112, p = 0.281). The median serum concentration of IL-17/IL-17A in patients with UC was significantly higher (100 pg/mL, IQR 35.75 pg/mL) than that in controls (65 pg/mL, IQR 32.25 pg/mL) (Mann-Whitney U = 55, p = 0.002).

Average serum concentration of sPSGL-1 in patients with UC was 349,97 with SD± 75,40. In control group 284, 39±52,04.

Differences were significant p = 0,003.

**Conclusion:** Serum concentration of IL-33 in patients with UC was not increased in comparison with that in controls, which is in accordance with current evidence that its primary biological effect is transcriptional rather than cytokinal. Further research is needed to explain whether increased concentration of IL-17 in UC is protective or harmful and to elucidate its immunological and pathogenic role.

Serum concentration of PSGL-1 in patients with UC was increased in comparison with that in controls.

Transient blockade of PSGL-1 and inhibition of neutrophil recruitment could be a new therapeutical approach in treatment of UC.

## 9. LITERATURA

1. Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2009;136:1182-97.
2. Tsianos EV, Katsanos K. Do we really understand what the immunological disturbances in inflammatory bowel disease mean? *World J Gastroenterol*. 2009;15:521-25.
3. Vucelić B. Upalne bolesti crijeva. u: Vucelić B i sur. urednici. *Gastroenterologija i hepatologija*. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2002.
4. Macfarlane S, Steed H, Macfarlane GT. Intestinal bacteria and inflammatory bowel disease. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2009;46:25-54.
5. Boden EK, Snapper SB. Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2008;24:733-41.
6. Gaya DR, Russel RK, Nimmo ER, Satsangi J. New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet*. 2006;367:1271-84.
7. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2009;361:2066-78.
8. Barnett MP, McNabb WC, Cookson AL, Zhu S, Davy M, Knoch B et al. Changes in colon gene expression associated with increased colon inflammation in interleukin-10 gene-deficient mice inoculated with *Enterococcus* species. *BMC Immunol* [serial online] 2010 Jul [cited 2012 Jun 25]. Available from: URL <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/11/39>.
9. Chang EB. Intestinal epithelial function and response to mucosal injury in inflammatory bowel diseases. u: Kirsner JB, editor. *Inflammatory bowel disease*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000.
10. Mayer L. Current concept of inflammatory bowel disease: Etiology and patogenesis. u: Kirsner JB, editor. *Inflammatory bowel disease*. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2000.

11. Elson CO. The Immunology of Inflammatory Bowel Disease. u: Kirsner JB, editor. Inflammatory bowel disease. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000.
12. Dekaris D, Kovač Z. Imunosne preosjetljivosti. u: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, urednici. Patofiziologija. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2002.
13. Sakaguchi S. The origin of FOXP3-expressing CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: thymus or periphery. *J Clin Invest.* 2003;112:1310-12.
14. Maggi E, Cosmi L, Liotta F, Romagnani P, Romagnani S, Annunziato F. Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev.* 2005;4:579- 86.
15. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting Edge: TGF- $\beta$  induces a regulatory phenotype in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol.* 2004;172:5149-53.
16. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4:330-5.
17. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol.* 2001;816-21.
18. Chinen J, Shearer WT. Advances in asthma, allergy and immunology Series 2004. Basic and clinical immunology. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:398-405.
19. Chinen J, Shearer WT. Basic and clinical immunology. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116:411-8.
20. Shi HZ, Qin XJ. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes in allergy and asthma. *Allergy.* 2005;60:986-95.
21. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2002;347:417-29.
22. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T i dr. IL-16 programs Th-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol.* 2007;8:967-74.
23. Lu L, Zhou X, Wang J, Zheng SG, Horwitz DA. Characterization of protective human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FOXP3 regulatory T cells generated with IL-2, TGF- $\beta$  and

retinoic acid. PLoS One [serial online] 2010 Dec [cited 2011 Jun 25]. Available from: URL[http:// journal.pone.0015150](http://journal.pone.0015150).

24. Mantel PY, Kuipers H, Boyman O, Rhyner C, Ouaked N, Rückert B et al. GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. PLoS Biol [serial online] 2007 Dec [cited 2011 Jun 25]. Available from: URL[http:// journal.pbio.0050329](http://journal.pbio.0050329).
25. Qiao M, Thornton AM, Shevach EM. CD4+ CD25+ regulatory T cells render naive CD4+ CD25- T cells anergic and suppressive. Immunology. 2007;120:447-55.
26. Schmidt-Weber CB, Akdis M, Akdis CA. Th17 cells in the big picture of immunology. J Allergy Clin Immunol. 2007;120:247-54.
27. Schambach F, Schupp M, Lazar MA, Reiner SL. Activation of retinoic acid receptor-alpha favours regulatory T cell induction at the expense of IL-17- secreting T helper cell differentiation. Eur J Immunol. 2007;37:2396-9.
28. Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KHG, Lavelle EC. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17- producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med. 2006;203:1685-91.
29. Dong C. Genetic controls of Th17 cell differentiation and plasticity. Exp Mol Med. 2011;43:1-6.
30. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. Int Immunol. 2008 ;20:1361-8.
31. Khader SA, Gopal R. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. Virulence. 2010 ;1:423-7.
32. Ziegler SF, Buckner JH. FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. Microbes Infect. 2009;11:594-8.
33. Basso AS, Cheroutre H, Mucida D. More stories on Th17 cells. Cell Res. 2009;19:399-411.

34. Afzali B, Mitchell P, Lechler RI, et al. Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 2010;159:120-30.
35. Louten J, Boniface K, de Waal Malefyt R. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123:1004-11.
36. Cheung PF, Wong CK, Lam CW. Molecular mechanisms of cytokine and chemokine release from eosinophils activated by IL-17A, IL-17F, and IL-23: implication for Th17 lymphocytes-mediated allergic inflammation. *J Immunol*. 2008;180:5625-35.
37. Podolsky DK, Fiocchi C. Cytokines, chemokines, growth factors, eicosanoids and other bioactive molecules in inflammatory bowel disease. u: Kirsner JB, urednik. *Inflammatory bowel disease*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000;191-202.
38. Gadina M, Jefferies CA. IL-33: a sheep in wolf's clothing? *Sci STKE* [serial online] 2007 Jun [cited 2011 Jun 25]. Available from: URL<http://stke.3902007pe31>.
39. Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, et al. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem*. 2007;282:26369-80.
40. Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, et al. Cutting edge: the ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *J Immunol*. 2007;179:2051-4.
41. Iikura M, Suto H, Kajiwara N, et al. IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab Invest*. 2007;87:971-78.
42. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One* [serial online] . 2008 Oct [cited 2011 Jun 25]. Available from: URL<http://journal.pone.0003331>.
43. Pastorelli L, Garg RR, Hoang SB, Spina L, Mattioli B, Scarpa M et al. Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107: 8017-22.



44. Ivanov S, Lindén A. Interleukin-17 as a drug target in human disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30:95-103.
45. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol.* 2007;8:967-74.
46. Chang SH, Dong C. IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation. *Cytokine.* 2009;46:7-11.
47. Zhang X, Angkasekwinai P, Dong C, Tang H. Structure and function of interleukin-17 family cytokines. *Protein Cell.* 2011;2:26-40.
48. Somers WS, Tang J, Shaw GD, Camphausen RT. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell.* 2000;103:467-79.
49. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med.* 2003 Jun;9:263-8.
50. Yang J, Galipeau J, Kozak CA, Furie BC, Furie B. Mouse P-selectin glycoprotein ligand-1: molecular cloning, chromosomal localization, and expression of a functional P-selectin receptor. *Blood.* 1996;87:4176-86.
51. Kumar R, Camphausen RT, Sullivan FX, Cumming DA. Core2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase enzyme activity is critical for P-selectin glycoprotein ligand-1 binding to P-selectin. *Blood.* 1996;88:3872-9.
52. Snapp KR, Ding H, Atkins K, Warnke R, Luscinskas FW, Kansas GS. A novel P-selectin glycoprotein ligand-1 monoclonal antibody recognizes an epitope within the tyrosine sulfate motif of human PSGL-1 and blocks recognition of both P- and L-selectin. *Blood.* 1998 ;91:154-64.
53. Bienvenu JG, Tanguay JF, Théorêt JF, Kumar A, Schaub RG, Merhi Y. Recombinant soluble p-selectin glycoprotein ligand-1-Ig reduces restenosis through inhibition of platelet-neutrophil adhesion after double angioplasty in swine. *Circulation.* 2001;103:1128-34.

54. Vowinkel T, Wood KC, Stokes KY, Russell J, Taylor A, Anthoni C, Senninger N, Krieglstein CF, Granger DN. Mechanisms of platelet and leukocyte recruitment in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 ;293:1054-60.
55. Mok MY, Huang FP, Ip WK, Lo Y, Wong FY, Chan EY i dr. Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology.* 2010;49:520-7.
56. Deng J, Younge BR, Olshen RA, Goronzy JJ, Weyand CM. Th17 and Th1 T-cell responses in giant cell arteritis. *Circulation.* 2010;121:906-15.
57. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:103-10.
58. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2003;52:65-70.
59. Hundorfean G, Neurath MF, Mudter J. Functional relevance of T helper 17 (Th17) cells and the IL-17 cytokine family in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18:180-6.
60. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR I dr. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med.* 2009;15:1016-22.
61. Brown JB, Cheres P, Zhang Z, Ryu H, Managlia E, Barrett TA. P-Selectin glycoprotein ligand-1 is needed for sequential recruitment of T-Helper 1 (Th1) and local generation of Th17 T cells in dextran sodium sulfate (DSS) colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18:323-32.
62. Nuñez-Andrade N, Lamana A, Sancho D, Gisbert JP, Gonzalez-Amaro R, Sanchez-Madrid F i dr. P-selectin glycoprotein ligand-1 modulates immune inflammatory responses in the enteric lamina propria. *J Pathol.* 2011, 224:212-21.

## 10. ŽIVOTOPIS

Jasna Ajduković

Adresa: Fratarski prolaz 1, Sinj

Mobitel 091 798 33 74

e-mail: [jasna.ajdukovic@gmail.com](mailto:jasna.ajdukovic@gmail.com)

Datum i mjesto rođenja: 03. 02. 1968., 21230 Sinj, Hrvatska

Po završetku osnovne i glazbene škole maturirala sam u kemijsko-tehnološkoj srednjoj školi u Sinju. Na Medicinskom studiju u Splitu diplomirala sam 1992. godine. Nakon položenog stručnog ispita radim u Sinju. Tijekom rata bila sam liječnica u HV. Magistrirala sam 2005. godine. Specijalistički ispit iz obiteljske medicine položila sam 2009. godine.