

# Metaboličke promjene u jetri tijekom imunološke reakcije humoralnog i celularnog tipa

---

**Dvornik, Štefica**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**1997**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:568819>

*Rights / Prava:* [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-19**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U RIJECI**  
**MEDICINSKI FAKULTET RIJEKA**

**Štefica Dvornik**

**METABOLIČKE PROMJENE U JETRI  
TIJEKOM IMUNOLOŠKE REAKCIJE  
HUMORALNOG I CELULARNOG TIP**

**Doktorska disertacija**

**SVEUČILIŠNA KNJIŽNICA  
RIJEKA**



**930024671**

**Rijeka, 1997.**

## I AUTOR

|   |  |
|---|--|
| Ime i prezime   | STEFICA DVORNIK  |
| Datum i mjesto rođenja  | 12. siječnja 1956 Osijek   |
| Naziv fakulteta, odnosno organizacije za postdiplomski studij i datum završene nastave II i III stupnja | Farmaceutsko-biokemijski u Zagrebu, 1980.<br>Medicinski fakultet u Zagrebu 1989. |
| Sadašnje zaposlenje   | K.B.C. Rijeka -Laboratorijska dijagnostika                                       |

## II PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA

METABOLIČKE PROMJENE U JETRI TIJE  
KOM IMUNOLOŠKE REAKCIJE HUMORALNOG  
I CELULARNOG TIPA

|   |  |
|---|--|
| Naslov rada   |  |
| Broj stranica, slika, tabela, bibliografskih podataka | 126 str., 14 tab., 38 sl.<br>258 ref.    |
| Ustanova i mjesto gdje je disertacija izrađena        | K.B.C. Rijeka                            |
| Znanstvena disciplina                                 | BIOMEDICINA                              |
| Mentori   | Prof.dr.sc. Biserka Radošević-<br>Stasić |
| Fakultet na kojem je disertacija obranjena            | Medicinski fakultet u Rijeci             |

## III OCJENA I OBRANA

|   |  |
|---|--|
| Datum prijave teme                                      | 22. listopada 1993.  |
| Datum predaje rada                                      | 12. svibnja 1997.  |
| Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen         | 14. srpnja 1997.   |
| Sastav povjerenstva koje disertaciju ocijenilo          | prof.dr.sc.Daniel Rukavina, .<br>prof.dr.Ivana Čepelak, prof.dr.<br>Čedomila Milin, prof.dr.Mire-<br>čuk i prof.dr.Biserka radoše-<br>vić-Stasić |
| Datum obrane disertacije                                | 21. srpnja 1997.   |
| Sastav povjerenstva pred kojim je disertacija obranjena | I s t i  |
| Datum promocije   |  |

Biokemijski dio rada napravljen je na Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku,  
laboratorij Sušak, Kliničkog bolničkog centra Rijeka i na

Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Rijeka

Imunološki dio rada učinjen je na Zavodu za fiziologiju i imunologiju  
Medicinskog fakulteta Rijeka.

Voditelj: prof.dr.sc. Biserka Radošević-Stašić

Rad ima 102 stranice

38 slika

14 tablica



Najiskrenije se zahvaljujem prof.dr. Biserki Radošević-Stašić koja mi je bila voditeljica pri izradi ovoga rada, te mi je pružila nesebičnu i dragocjenu podršku i pomoć.

Prof. dr. Danijelu Rukavini, predstojniku Zavoda za fiziologiju i imunologiju zahvaljujem jer mi je omogućio rad na svom zavodu, te na korisnim savjetima.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr. Čedomili Milin na razumijevanju i stručnoj pomoći pri izradi rada.

Prof.dr. Miri Ćuk zahvaljujem na pomoći i moralnoj podršci, te na brojnim korisnim savjetima.

Zahvaljujem se i svim djelatnicima i suradnicima sa Zavoda za fiziologiju i imunologiju i Zavoda za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta u Rijeci, te Zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Rijeka, uz čiju pomoć je ovaj rad izveden.

IV

OP

1. C

1.

1.

1.

1.

2. M

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

2.

## SADRŽAJ

|   | stranica |
|---|----------|
| <b>UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME</b>   | 1        |
| <b>OPĆI DIO</b>   | 5        |
| <b>1. Uloga jetre u kontroli imunološkog odgovora</b>                       | 5        |
| 1.1. <i>Fagocitno-monocitni sustav</i>                                      | 6        |
| 1.2. <i>Učinak citokina na metaboličke funkcije jetre</i>                   | 10       |
| 1.3. <i>Proteini akutne faze</i>  | 13       |
| <b>2. Međusobni odnosi između imunološkog i neuroendokrinog sustava</b>     | 16       |
| 2.1. <i>Uloga citokina u aktivaciji neuroendokrinog sustava</i>             | 16       |
| 2.2. <i>Uloga hormona i neurotransmitera u kontroli imunološkog sustava</i> | 19       |
| 2.2.1. <i>Hormon rasta</i>  | 25       |
| 2.2.2. <i>IGF</i>   | 26       |
| 2.2.3. <i>Somatostatin</i>  | 29       |
| <b>3. Bakterijski imunomodulatori - peptidoglikan monomeri (PGM)</b>        | 34       |
| <b>MATERIJAL I METODE</b>   | 40       |
| <b>4. Pokusne životinje</b>   | 40       |
| <b>5. Materijali i reagensi</b>   | 40       |
| 5.1. <i>Monoklonska protutijela</i>   | 40       |
| 5.2. <i>Peptidoglikan monomer</i>   | 41       |
| 5.3. <i>Hormoni</i>   | 41       |
| 5.4. <i>Reagensi za određivanje sadržaja nukleinskih kiselina u jetri</i>   | 41       |
| 5.4.1. <i>Izolacija nukleinskih kiselina</i>                                | 41       |
| 5.4.2. <i>Određivanje sadržaja DNA</i>                                      | 41       |
| 5.4.3. <i>Određivanje sadržaja RNA</i>                                      | 42       |
| 5.5. <i>Reagensi za određivanje sadržaja proteina u jetri</i>               | 42       |
| <b>6. Opći plan pokusa</b>  | 43       |
| <b>7. Indukcija imunološke reakcije</b>                                     | 43       |
| 7.1. <i>Imunološka reakcija humoralnog tipa</i>                             | 43       |
| 7.2. <i>Imunološka reakcija staničnog tipa</i>                              | 43       |
| <b>8. Modifikacije imunološke reakcije</b>                                  | 44       |
| 8.1. <i>Depletiranje T-limfocitnih subpopulacija in vivo</i>                | 44       |
| 8.2. <i>Izazivanje imunosupresije halotanskom anestezijom</i>               | 44       |
| 8.3. <i>Imunostimulacija primjenom peptidoglikan monomera</i>               | 44       |
| 8.4. <i>Modifikacija primjenom hormona</i>                                  | 45       |
| 8.4.1. <i>Primjena somatostatina</i>  | 45       |
| 8.4.2. <i>Primjena IGF-a</i>  | 45       |

|   | stranica |
|---|----------|
| <b>9. Metode za procjenu imunološke reakcije</b>  | 46       |
| 9.1. Testovi za ispitivanje imunološke reakcije humoralnog tipa                           | 46       |
| 9.2. Testovi za ispitivanje imunološke reakcije staničnog tipa                            | 47       |
| 9.3. Analiziranje limfocitnog fenotipa protočnom citometrijom                             | 47       |
| <b>10. Metode za određivanje sadržaja nukleinskih kiselina u jetri</b>                    | 48       |
| 10.1. Izolacija nukleinskih kiselina iz jetre   | 48       |
| 10.2. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina                                      | 49       |
| 10.2.1. Određivanje koncentracije DNA   | 49       |
| 10.2.2. Određivanje koncentracije RNA   | 49       |
| <b>11. Metode za određivanje koncentracije proteina u jetri</b>                           | 50       |
| <b>12. Metode za određivanje biokemijskih sastojaka u serumu</b>                          | 50       |
| 12.1. Priprema seruma za biokemijska određivanja  | 50       |
| 12.2. Biokemijske analize u serumu  | 51       |
| <b>13. Statistička obrada podataka</b>  | 51       |
| <b>REZULTATI</b>  | 52       |
| <b>14. Metaboličke promjene tijekom imunološke reakcije humoralnog i staničnog tipa</b>   | 52       |
| 14.1. Imunološka reakcija humoralnog tipa   | 52       |
| 14.1.1. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri                                   | 52       |
| 14.1.2. Promjene biokemijskih sastojaka u serumu miševa                                   | 52       |
| 14.2. Imunološka reakcija staničnog tipa  | 52       |
| 14.2.1. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri                                   | 53       |
| 14.2.2. Promjene biokemijskih sastojaka u serumu miševa                                   | 53       |
| <b>15. Metaboličke promjene tijekom modificirane imunološke reakcije</b>                  | 54       |
| 15.1. Promjene uzrokovane deplecijom limfocitnih subpopulacija <i>in vivo</i>             | 54       |
| 15.1.1. Učinak deplecije limfocitnih subpopulacija na imunološku reakciju humoralnog tipa | 54       |
| 15.1.2. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri                                   | 54       |
| 15.2. Promjene uzrokovane halotanskom anestezijom   | 55       |
| 15.2.1. Imunosupresivno djelovanje halotanske anestezije                                  | 55       |
| 15.2.2. Djelovanje halotanske anestezije na biokemijske pokazatelje u jetri i serumu      | 56       |
| 15.2.2.1. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri                                 | 56       |
| 15.2.2.2. Promjene biokemijskih sastojaka u serumu  | 56       |

|  | stranica  |
|--|-----------|
| <b>15.3. Metaboličke promjene nakon primjene imunostimulatora tijekom halotanske anestezije</b>              | <b>56</b> |
| 15.3.1. Učinak PGM-a i njegovih analoga na imunološku reakciju humoralnog tipa                               | 56        |
| 15.3.2. Učinak PGM-a na biokemijske pokazatelje u jetri i serumu tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa | 57        |
| 15.3.2.1. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri  | 57        |
| 15.3.2.2. Promjene u biokemijskim sastojcima u serumu  | 58        |
| <b>15.4. Promjene uzrokovane djelovanjem hormona</b>   | <b>59</b> |
| 15.4.1. Primjena somatostatina   | 59        |
| 15.4.1.1. Učinak kratkotrajne primjene somatostatina na imunološku reakciju humoralnog tipa                  | 59        |
| 15.4.1.1.1. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri  | 60        |
| 15.4.1.1.2. Promjene biokemijskih sastojaka u serumu   | 60        |
| 15.4.1.2. Učinak dugotrajne primjene somatostatina na imunološku reakciju humoralnog tipa                    | 60        |
| 15.4.1.2.1. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri  | 61        |
| 15.4.1.2.2. Promjene biokemijskih sastojaka u serumu   | 61        |
| 15.4.2. Primjena IGF-a   | 61        |
| 15.4.2.1. Učinak primjene IGF-a na imunološku reakciju staničnog tipa  | 62        |
| 15.4.2.1.1. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri  | 62        |
| 15.4.2.1.2. Promjene biokemijskih sastojaka u serumu   | 63        |
| <b>RASPRAVA</b>  | <b>64</b> |
| <b>ZAKLJUČNI PREGLED</b>   | <b>79</b> |
| <b>LITERATURA</b>  | <b>81</b> |

$\alpha$ MSH -  $\alpha$ - hormon koji stimulira melanocite  
ACTH - adrenokortikotropni hormon  
ADCC - citotoksične stanice ovisne o protutijelima (engl. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)  
aFGF - kiseli čimbenik rasta fibroblasta (engl. acidic fibroblast growth factor)  
ALT - aspartat-aminotransferaza  
AP - alkalna fosfataza  
AST - alanin-aminotransferaza  
ATP - adenozin-trifosfat  
BCGF - čimbenik rasta B limfocita (engl. B-cell growth factor)  
cAMP - 3,5-ciklički adenzin-monofosfat  
cGMP - 3,5-ciklički gvanozin-monofosfat  
CNTF - čimbenik cilijarne neutrofilije  
ConA - konkavalin A  
CR - receptor za komplement (engl. complement receptor)  
CRF - čimbenik koji oslobađa kortikotropin (engl. corticotropin releasing factor)  
CRP - C-reaktivni protein  
DNA - deoksiribonukleinska kiselina  
ECM - vanstanični matrix (engl. extracellular matrix)  
EGF - epidermalni čimbenik rasta (engl. epidermal growth factor)  
Fc- $\gamma$  receptor - receptor za Fc fragment IgG molekule  
GH - hormon rasta (engl. growth hormone)  
GHRH - čimbenik koji oslobađa hormon rasta (engl. growth hormone releasing hormone)  
GM-CSF - čimbenik koji stimulira proizvodnju granulocitno-makrofagne kolonije (engl. granulocyte-macrophage colony stimulating factor)  
GVHR - reakcija stanica davatelja protiv primatelja (engl. graft versus host reaction)  
HB-EGF - epidermalni čimbenik rasta koji veže heparin (engl. heparin binding EGF)  
HDL - lipoprotein velike gustoće (engl. high density lipoprotein)  
HGF - čimbenik rasta hepatocita (engl. hepatocyte growth factor)  
IFN - interferon  
IGF - čimbenik rasta sličan inzulinu, somatomedin (engl. insulin-like growth factor)  
IGFBP - proteini koji vežu inzulinu sličan čimbenik rasta (engl. insulin-like growth factor binding proteins)  
IL - interleukin  
KGF - čimbenik rasta keratinocita (engl. keratinocyte growth factor)  
LDL - lipoprotein male gustoće (engl. low density lipoprotein)  
LH - luteinizirajući hormon  
LIF - čimbenik inhibicije leukemije (engl. leukocyte inhibitory factor)  
LPS - lipopolisaharid  
MAC-1<sup>+</sup> - receptor na površini makrofaga  
MDP - muramil dipeptid  
MFB - miofibroblasti  
MHC-II - skupina II glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. major histocompatibility complex)  
mRNA - glasnička ribonukleinska kiselina (engl. messenger RNA)  
NK stanice - stanice ubojice (engl. natural killer)  
NO - dušični monoksid

OE - ovčji eritrociti  
OSM - onkostatina M  
PBS - puferirana fiziološka otopina  
PDGF - čimbenik rasta dobiven iz trombocita (engl. platelet derived growth factor)  
PFC - stanice koje stvaraju hemolitičke čestice (engl. plaque forming cells)  
PHA - fitohemaglutinin  
POMC - pro-opiomelanokortin  
RNA - ribonukleinska kiselina  
SAA - serumski amiloid A  
SMS - somatostatin  
TGF- $\beta$  - čimbenik transformacije rasta- $\beta$  (engl. transforming growth factor- $\beta$ )  
TNF - čimbenik nekroze tumora (engl. tumor necrosis factor)  
TRH - čimbenik koji oslobađa tireotropin (engl. thyrotropin releasing factor)  
TSH - tireotropin (engl. thyroid stimulating hormone)  
VIP - vazoaktivni intestinalni polipeptid  
VLDL - lipoprotein vrlo male gustoće (engl. very low density lipoprotein)  
ZEM - zrnata endoplazmatska mrežica



## SAŽETAK

Brojni hormoni imaju važan učinak na funkciju limfatičkog sustava. Isto tako poznato je da u tijeku imunološke reakcije aktivirani limfociti izlučuju razne hormone od kojih neki djeluju na funkciju jetre. Osim toga, u tijeku imunološke reakcije aktivirane stanice (T i B limfociti i druge) izlučuju citokine koji s jedne strane djelovanjem na neuroendokrini sustav imaju posredni učinak na funkciju jetre, a s druge strane citokini, kao što su IL-1, IL-6, čimbenik nekroze tumora i sl. imaju i izravni učinak na metaboličke funkcije jetre, npr. induciraju sintezu proteina akutne faze u jetri.

Cilj ovoga rada bio je ispitivanje metaboličkih promjena u jetri u tijeku imunološke reakcije staničnog i humoralnog tipa i u tijeku imunoloških reakcija modificiranih deplecijama pojedinih T-limfocitnih subpopulacija, djelovanjem halotanske anestezije i imunomodulatora, te primjenom hormona od kojih neki djeluju poticajno, a drugi supresivno na imunološku reakciju.

Metaboličke promjene u jetri pratili smo određivanjem sadržaja nukleinskih kiselina i proteina u jetri, te određivanjem nekih serumskih pokazatelja funkcije jetre kao što su: katalitička aktivnost transaminaza (AST i ALT), alkalne fosfataze (AP), koncentracije ukupnih proteina, albumina, ureje, glukoze i dr.

Humoralni tip imunološke reakcije inducirali smo u miševa intraperitonealnom senzibilizacijom s ovcjim eritrocitima, a metaboličke promjene određivali smo četvrtog dana nakon senzibilizacije, u vrijeme maksimalne proizvodnje protutijela. Rezultati pokazuju da nema značajnih promjena u sadržaju nukleinskih kiselina i proteina u jetri senzibiliziranih životinja u odnosu na kontrolne životinje. U serumu senzibiliziranih miševa uočene su smanjene koncentracije ureje i kalcija, dok vrijednosti ostalih biokemijskih sastojaka ne pokazuju značajna odstupanja od kontrolnih vrijednosti.

Za procjenu učinka staničnog tipa imunosti služili smo se modelom lokalne reakcije stanica davatelja protiv primatelja (GVHR). U tu svrhu injicirali smo splenocite roditeljskog soja u F<sub>1</sub> hibride i pratili metaboličke promjene petog, sedmog i desetog dana imunološke reakcije. Tijekom lokalne GVHR sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri opada, te u odnosu na intaktne životinje pokazuje dinamičke promjene. Osim toga, dok je količina DNA u jetri opadala tijekom svih ispitivanih intervala, razina RNA pokazuje maksimalno



povećanje sedmog dana reakcije kada je i intenzitet imunološke reakcije najveći. Količina proteina u jetri povećala se u kasnijoj fazi, tj. desetog dana lokalne GVHR. U serumu miševa za vrijeme lokalne GVHR uočava se pad katalitičke aktivnosti ALT petog i sedmog i desetog dana reakcije. Visoka katalitička aktivnost AP i hipoglikemija prisutne su tijekom cijele reakcije. Koncentracije ukupnih proteina i albumina u serumu smanjuju se desetog dana imunološke reakcije. Koncentracija kreatinina u serumu snižena je desetog dana, koncentracija kalcija povećana sedmog i desetog dana, a koncentracija C-reaktivnog proteina povećana je petog dana lokalne GVHR.

Budući da su ovčji eritrociti T-ovisni antigeni, u dodatnim pokusima pratili smo učinke deplecije pojedinih T-limfocitnih subpopulacija na metaboličke funkcije jetre. Depleciju smo izvršili injiciranjem specifičnih monoklonskih protutijela (anti CD4, anti CD8 i kombinacija anti CD4 + anti CD8), a za kontrolne skupine koristili smo štakorski serum i PBS. Dok učinak deplecije CD4 limfocitne subpopulacije na humoralni imunološki odgovor nije značajan, deplecija CD8 limfocita stimulira, a dvostruka deplecija značajno suprimira broj stanica koje stvaraju hemolitičke čistine (PFC). Jedina statistički značajna metabolička promjena bila je porast količine proteina u jetri životinja koje su dva dana prije indukcije imunološke reakcije bile in vivo depletirane s anti CD4 protutijelima.

U slijedećem dijelu naših pokusa koristili smo peptidoglikan monomer (PGM) za korekciju imuno i hepato supresivnog učinka koji je halotanska anestezija izazvala u miševa. Injiciranjem jedne doze PGM-a (10 mg/kg), odmah po senzibilizaciji životinja, a neposredno prije anestezije, ispravlja se smanjeni broj stanica koje stvaraju hemolitičke čistine za 66 %. Osim toga PGM povećava sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri, prethodno smanjen zbog anestezije. U odnosu prema kontrolnim životinjama u serumu anesteziranih životinja povećana je koncentracija albumina. PGM u senzibiliziranih životinja smanjuje koncentraciju fosfora, a u serumu senzibiliziranih, anesteziranih životinja povećava koncentraciju kreatinina.

Učinke somatostatina na metaboličke promjene tijekom humoralnog imunološkog odgovora ispitivali smo PFC metodom uz kratkotrajnu primjenu hormona (dvokratnim injiciranjem neposredno nakon senzibilizacije životinja), te dugotrajnom primjenom, pomoću minipumpica, koje su postupno otpuštale hormon tijekom 6 dana. Rezultati su pokazali supresivno djelovanje somatostatina na proizvodnju PFC u slezeni pri kratkotrajnoj

primjeni. Dodavanjem hormona rasta egzogenim putem bilo je moguće poništiti ove učinke somatostatina. Naši rezultati nisu pokazali promjenu u koncentraciji nukleinskih kiselina u jetri, ali je injiciranje somatostatina, isto kao i hormona rasta dovelo do povećane količine proteina u jetri u odnosu na kontrolne životinje. U serumu životinja kratkotrajno injiciranih sa somatostatinom i hormonom rasta uočavamo značajno povećanje katalitičke aktivnosti ALT, te povećanu koncentraciju kreatinina u odnosu na životinje koje su primale fiziološku otopinu. Dugotrajno davanje somatostatina putem mini pumpica (tijekom šest dana) nije rezultiralo supresijom humoralnog imunološkog odgovora, ali je količina i koncentracija DNA u jetri životinja tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa značajno smanjena. Istovremeno injiciranje somatostatina i hormona rasta povećava i količinu i koncentraciju DNA u jetri u odnosu na životinje kojima je injicirana fiziološka otopina. Dugotrajno injiciranje somatostatina i hormona rasta izaziva u serumu pokusnih životinja povećanu katalitičku aktivnost ALT i AST i povećanu koncentraciju proteina i albumina u serumu životinja koje su primile hormon u odnosu na kontrolnu skupinu životinja.

Učinak IGF-a na stanični tip imunosti i metaboličke promjene ispitivali smo u lokalnoj GVHR, a IGF je bio injiciran odmah po antigenu i 8 sati nakon toga ( $2 \times 15 \mu\text{g}$  po životinji, s.c.). Čini se da je IGF inhibirao porast ipsilateralnih limfnih čvorova i pomaknuo vršak reakcije prema desno. Nisu uočene promjene u koncentraciji nukleinskih kiselina i proteina u jetri. U serumu je povećana katalitička aktivnost ALT sedmog dana i koncentracije glukoze i kreatinina deseti dan imunološke reakcije staničnog tipa nakon primjene IGF-a u odnosu prema kontroli. Rezultati analize broja stanica limfatičkih organa za vrijeme indukcije imunološke reakcije staničnog tipa pod djelovanjem IGF-a upućuju na inhibitorni učinak IGF-a na slezenu (sedmi dan) i koštanu srž (deseti dan).

U zaključku možemo reći da se za vrijeme odvijanja imunološke reakcije dešavaju promjene ne samo u imunološkom sustavu, već zbog narušavanja homeostaze nastaju brojne promjene i u funkciji mnogih drugih organa, među kojima vrlo važnu ulogu ima i jetra.

## SUMMARY

Disturbance of the physiological homeostasis provoked by infection, tissue injury and neoplastic growth leads to the release of several cytokines, with well described effects on immune functions. Some of them, such as IL-1, IL-6 and TNF are simultaneously potent inducers of multiple hormones of hypothalamo-pituitary origin and inducers of synthesis of acute phase proteins in the liver. The involvement of the liver in metabolic reactions during an immune response is obvious, and therefore we attempted to analyze metabolic changes in liver during cellular and humoral immunological reactions, and in immunological reactions modified by depletion of T-lymphocyte subpopulation, hormones and immunomodulators.

From the plan of experiment we can see that we analyzed proteins and nucleic acids in the liver and some serum components like: transaminase, alkaline phosphatase (AP), total proteins, urea, glucose and so on.

To induce the humoral type of immunity mice were sensitized with SRBC four days previous to determinations of metabolic changes in the liver. There were no significant changes in proteins and nucleic acids in the liver between the intact mice and after the sensitizations with SRBC. Also there were no changes in biochemical components of serum, with exception of the concentrations of urea and calcium which were found to be lower in serum of sensitized mice.

The effect of cellular type of immunity was analyzed during local graft versus host reaction (GVHR), which was induced by administration of parental splenocytes to F<sub>1</sub> hybrids. Hepatic changes were analyzed five, seven and ten days after the sensitization with splenocytes. During the local GVHR we can observe the decrease of DNA, RNA and protein content in the liver in comparison to intact control, but some time dependent changes related to the dynamic of local GVHR may be also seen. Thus, it seems that the content of proteins increased on 10<sup>th</sup> day of the immunological reaction, and that RNA content has maximal values on 7<sup>th</sup> day of the reaction. At the same time, during local GVHR, we found numerous significant changes in biochemical components of mice sera. The activity of transaminase (ALT) is lower on 5<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> day, and the concentrations of total proteins and albumin are lower on the 10<sup>th</sup> day than in serum of intact mice. The high activity of AP, and significant hypoglycemia can be seen all the time during the local

GVHR. The concentration of creatinin is lower on 10<sup>th</sup> day and the concentration of calcium is higher on 7<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> day than in intact mice. The concentration of C-reactive protein is higher on 5<sup>th</sup> day of the immunological reaction.

SRBC are T-dependent antigens, so additionally, in order to determine the role of distinct classes of T-lymphocytes in metabolic changes, we analyzed the effects of in vivo treatment with monoclonal anti CD4, anti CD8 antibodies and their combinations, and control group was injected by rat serum and PBS. Increased content of the proteins in liver of the mice injected with monoclonal anti CD4 antibodies previous to sensitization with SRBC was the only metabolic change, although there were no changes in immunological answer in these mice in comparisons with control animals. In vivo treatment with anti CD8 antibodies increase, and combination of anti CD4 + anti CD8 antibodies decrease an immunoligical answer in mice sensitized with SRBC in comparison to control, but there were no changes in nucleic acid and protein content in the liver of these animals.

In the next part of our experiments peptidoglycan monomer (PGM) and its derivates were used to correct the immuno and hepato suppressive effects of halothane anesthesia induced in mice. Pretreatment of mice sensitized with SRBC with only one intraperitoneal injection of PGM (10 mg/kg), given immediately before anesthesia, corrected the inhibited plaque forming cells (PFC) generation in spleen by 66 %. Besides this, PGM augmented the content of DNA, RNA and proteins in the liver, previously decreased by anesthesia. We found increased concentration of albumin in the serum of the mice after the halothane anesthesia in comparison to intact animals. Pretreatment of mice sensitized with SRBC with PGM resulted in lower concentration of phosphorus in sera of mice, and increased concentration of creatinine was found in sera of sensitized, anesthetized mice after the injection of PGM. There were numerous changes in biochemical parameters in sera of mice after the treatment with derivates of PGM.

The effects of somatostatin on the metabolic changes during humoral immune response were tested after short-term hormone pretreatment (two applications immediately post sensibilization), as well as after long-term application with minipumps that had released the hormone through six-days period. The results showed suppressive effect of somatostatine on hemolytic plaque production in spleen after short-term treatment, and the addition of exogenous growth hormone abrogated the effects of short-term somatostatin



treatment. There were no changes in the concentration of the nucleic acid in liver, but injection of somatostatin, as well as growth hormone during the humoral immunological reaction increased the concentrations of proteins in the liver of the mice. In both experimental groups there were also increased activity of ALT and concentration of creatinine in serum of the mice in comparison to control groups. Long-treatment of hormones had no effects on immunological reaction, but somatostatin did suppress the concentrations of nucleic acid and proteins in the liver and combination of both hormones increased the concentration of DNA in comparison to control groups. Increased activity of transaminases (AST and ALT), and concentrations of proteins and albumin have been shown in serum of animals treated with somatostatin, as well as growth hormone.

The effect of IGF on cellular type of immunity and metabolic changes were investigated by local GVHR, and IGF was injected immediately after the antigen and 8 hours later ( $2 \times 15 \mu\text{g}$  per mouse, s.c.). It seems that IGF inhibits the augmentation of ipsilateral PLN and moves a peak of the reaction on the right. There were no changes in the concentrations of nucleic acid and proteins in the liver, and in the serum there was increased activity of transaminase (ALT) 7<sup>th</sup> day and concentrations of glucose and creatinine 10<sup>th</sup> day of the cellular type of immunological reaction after the admission of IGF in experimental animals in comparison to control. The analysis of the cellularity of lymphatic organs during the induction of local GVHR points to an inhibitory (probably toxic, or antigenic) action of IGF on spleen (7<sup>th</sup> day), and bone marrow (10<sup>th</sup> day).

As a conclusion we can say that during the immunological reactions there are not only the changes in immunological system, but disturbance of the physiological homeostasis leads to the changes in the function of many organs, and the liver is one of them.

## UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME

Jetra ima ključnu ulogu u intermedijarnom metabolizmu, ali zahvaljujući nekim svojim funkcijama, jedna je od izuzetno važnih komponenata složenog i sveobuhvatnog mehanizma obrane organizma. Poremećaji homeostaze izazvani infekcijom, ozljedom ili tumorskim rastom dovode do otpuštanja citokina i ostalih medijatora upale, a njihova je uloga u imunološkom sustavu poznata i opisana (11). U procesima nespecifične imunosti važnu ulogu imaju neparenhimske stanice jetre koje su sastavni dio fagocitno-monocitnog sustava, a posebno su značajne Kupfferove stanice. U jetri se vrše procesi ekstramedularne hematopoeze, diferencijacija nekih stanica i razgradnja ostarjelih ili oštećenih krvnih stanica. Metaboličke funkcije jetre također su nužne za obranu organizma. Sinteza proteina plazme jedna je od najvažnijih, jer se u hepatocitima za vrijeme imunološke reakcije pod utjecajem citokina i ostalih medijatora upale sintetiziraju proteini akutne faze, koji mogu modificirati upalni odgovor organizma. Istovremeno citokini mogu utjecati i na druge metaboličke funkcije, te se u jetri za vrijeme imunološke reakcije dešavaju brojne metaboličke promjene, koje međutim nisu dovoljno poznate.

Cilj ovog rada jest ispitivanje metaboličkih promjena u jetri tijekom imunološke reakcije staničnog i humoralnog tipa, te modificiranih imunoloških reakcija.

Metaboličke promjene u jetri pratili smo određivanjem proteina i nukleinskih kiselina s jedne strane, te određivanjem nekih biokemijskih pokazatelja u serumu, vezanih za funkciju jetre, kao što su: alanin-aminotransferaza (AST), aspartat-aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza (AP), ukupni proteini, albumini, ureja, glukoza i dr.

Poznato je da se stanični i humoralni tip imunološke reakcije aktiviraju i odvijaju zasebnim procesima, svaki po svojim zakonitostima. Oni međutim ipak dijele zajedničke citokine i stanice, te se u mnogočemu njihovi putovi isprepliću. U imunološkoj reakciji humoralnog tipa citokini su uključeni u sve faze diferenciranja i proliferacije B limfocita. Interleukin-4 (IL-4) aktivira mirujuće B stanice, te stimulira proliferaciju aktiviranih stanica i inducira ekspresiju IgE receptora na mastocitima. Interleukin-5 (IL-5) inducira ekspresiju IgE receptora na B stanicama i zajedno s IL-4 povećava proizvodnju IgA i IgE. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ima antagonistički učinak na IL-5 i zajedno s interleukinom-2 (IL-2) povećava proizvodnju IgG. Interleukin-6 (IL-6) stimulira sintezu svih klasa imunoglobulina.

U imunološkoj reakciji staničnog tipa aktivirani makrofazi fagocitiraju, prerađuju i prezentiraju antigen obližnjim T limfocitima pri čemu se oslobađaju interleukin-1 (IL-1) i

IL-6. U miševa je dokazano postojanje dva tipa T-pomoćničkih limfocita:  $T_H1$  i  $T_H2$ . Aktivirane  $T_H2$  stanice proizvode IL-4 i IL-5 citokine koji su uključeni u mijelopoiezu i alergijski odgovor.  $T_H1$  stanice proizvode citokine IL-2, čimbenik nekroze tumora- $\gamma$  (engl. tumor necrosis factor - TNF) i TNF- $\beta$  čija je glavna uloga da u imunološkoj reakciji staničnog tipa stimuliraju citotoksične T limfocite i aktiviraju makrofage. IL-2 ujedno djeluje i kao autokrini čimbenik rasta za  $T_H1$  stanice. Aktivirani makrofazi oslobađaju TNF- $\beta$  koji sudjeluje u citotoksičnim mehanizmima i IL-8 koji aktivira neutrofile (254,169). Citokini iz oba tipa aktiviranih T stanica, kao i oni iz antigen-prezentirajućih stanica sudjeluju u proliferaciji i diferencijaciji B limfocita.

Veći broj navedenih citokina djeluje izravnim ili neizravnim putem na jetru, gdje se tijekom imunološke reakcije sintetiziraju proteini akutne faze. Smatra se da su za indukciju te sinteze najvažniji IL-1, IL-6 i TNF (216). Iako ove citokine mogu proizvesti različite stanice, njihov glavni izvor su makrofazi aktivirani u imunološkom odgovoru (4).

Predložena ispitivanja imala su stoga za cilj ispitati promjene koje se dešavaju u jetri tijekom standardne i modificirane imunološke reakcije.

Humoralni tip imunološke reakcije inducirali smo u miševa intraperitonealnim injiciranjem ovčjih eritrocita (OE), a metaboličke promjene mjerili smo četvrtog dana nakon senzibilizacije, u vrijeme maksimalne proizvodnje protutijela. Za procjenu učinka staničnog tipa imunosti koristili smo model lokalne reakcije stanica davatelja protiv primatelja (engl. graft versus host reaction - GVHR). Splenocite roditeljskog soja injicirali smo u  $F_1$  hibride, a dinamiku imunološke reakcije, kao i metaboličke promjene pratili smo petog, sedmog i desetog dana po senzibilizaciji splenocitima.

Koristeći se modelom deplecija pojedinih T-limfocitnih subpopulacija modificirali smo imunološku reakciju humoralnog tipa, kako bismo ispitali učinke pojedinih staničnih tipova na intenzitet imunološke reakcije, a ujedno i na promjene u metaboličkoj funkciji jetre.

Osim toga pokušali smo utvrditi promjene inducirane primjenom imunomodulatora. Imunomodulatori su spojevi koji imaju sposobnost mijenjanja imunogeničnih svojstava antigenih preparata ili vakcina. Potenciraju imunološki odgovor tako da mijenjaju smještaj antigena, povećavaju broj antigena skupine II glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC-II) na antigen prezentirajućim stanicama čime se poboljšava prezentacija antigena, te



aktiviraju pojedine subpopulacije limfocita (110). U našem radu ispitivali smo učinak peptidoglikan monomera (PGM) i njegovih novih analoga (Pliva, Zagreb), budući da bi klinička primjena ovih imunomodulatora mogla biti od velike važnosti u terapiji. Osim učinka na intenzitet imunološke reakcije pratili smo i promjene koje se dešavaju u jetri. PGM je biološki aktivna supstanca čiji mehanizam djelovanja još nije sasvim razjašnjen, iako se kao mogući mehanizmi spominju poliklonska aktivacija B limfocita i aktivacija T limfocita ili makrofaga. PGM pojačava formiranje stanica koje proizvode protutijela, stimulira i stanični imunološki odgovor, a ispitivanja su pokazala da vjerovatno ne djeluje mitogeno. Uočeno je da PGM pokazuje različite učinke na imunološki status normalnih imunokompetentnih životinja i imunokompromitiranih domaćina, kojima je imunološka reaktivnost potisnuta. Primjena PGM-a neposredno nakon davanja antigena reducira imunosupresiju nastalu uslijed halotanske anestezije i snažno potiče humoralnu reaktivnost u imunosuprimiranim stanjima izazvanim s halotanskom anestezijom i operativnim zahvatom. Imunosupresivno djelovanje halotanske anestezije (207) može biti posljedica izravnih toksičnih učinaka anestetika ili neizravnih mehanizama vezanih uz narušavanje neuroendokrino-imunološke homeostaze.

Poznato je naime, da postoji dvosmjerna komunikacija između neuroendokrino i imunološkog sustava (31), a da hormoni zajedno sa neurotransmiterima, polipeptidima i citokinima, dijeleći gotovo iste receptore, reguliraju tijek i intenzitet imunološke reakcije i osiguravaju ponovno uspostavljanje homeostaze narušene nakon ulaska antigena. Neki od hormona također se primjenjuju u terapijske svrhe. Osim toga, hormoni kao i ostale signalne molekule mogu modulirati i genetički određene funkcije brojnih drugih organa, pa tako djeluju i na metaboličke promjene u jetri. U našim daljnjim istraživanjima pratili smo metaboličke promjene nakon primjene somatostatina (SMS) koji djeluje izrazito supresivno (211), te hormona rasta (GH) i somatomedina (IGF) koji djeluju poticajno na imunološku reakciju.

Pokazano je da stanice imunološkog sustava, poput ostalih stanica organizma, imaju na svojoj površini receptore za hormone, kao i za druge spojeve neuroendokrino sustava. Djelujući preko receptora, hormoni reguliraju proliferaciju limfatičkih stanica, kao i njihovu završnu diferencijaciju u efektorske stanice, te izlučivanje različitih citokina. Na razini

stanice hormon rasta pospješuje sintezu proteina, ulazak aminokiselina u stanice, lipolizu, a koči ulazak glukoze u stanice.

Somatostatin je inhibitor otpuštanja hormona rasta, glukagona i inzulina, a inhibira i lučenje tireotropnog hormona i prolaktina. On sudjeluje u regulacijskoj petlji između neuroendokrinog i imunološkog sustava tako što izravno ili posredno suprimira imunološku reakciju. Izravno, somatostatin putem brojnih receptora na membrani različitih tipova stanica limfatičkog sustava mijenja metaboličke puteve u stanici. Djeluje antiproliferativno, jer inhibira adenilat ciklazu i smanjuje unutarstaničnu količinu cAMP, a osim toga izravno antiproliferativno djelovanje postiže i putem tirozin kinaza-ovisnog aktivacijskog puta ili putem G proteina. Posredno, somatostatin djeluje inhibirajući izlučivanje hormona rasta.

Svoj učinak na hormon rasta somatostatin vrši mehanizmima različitim od IGF-a, jer je pokazano da IGF suprimira transkripciju mRNA za hormon rasta, a somatostatin ne. IGF također ispoljava brojne metaboličke učinke. On može mimikrijom prekriti učinak hormona rasta, iako se oni ipak ne mogu u potpunosti zamijeniti s IGF-om. Djelujući putem sličnih ili identičnih receptora kao i hormon rasta, IGF inhibira staničnu razgradnju proteina, smanjuje sintezu ureje i pospješuje sintezu proteina u organizmu, inhibira glukoneogenezu obrnuto od djelovanja glukagona, te nasuprot hormonu rasta štedi, tj. smanjuje izlučivanje inzulina.

Iz opisanog je vidljivo da tijekom normalne, te modificirane imunološke reakcije može doći do značajnih metaboličkih promjena. Na osnovu usporedbe rezultata dobivenih primjenom različitih eksperimentalnih protokola, te literaturnih podataka, nastojali smo dobivene promjene uklopiti u poznate mehanizme.

OPĆI DIO

Imunološka reakcija ima središnju ulogu u fiziološkim mehanizmima obrane koji služe održanju identiteta i integriteta organizma. Glavni je i najjači dio opće reaktivnosti organizma i nužna je za preživljavanje, te bez nje neminovno nastupa smrt zbog infekcije.

Ljudski organizam je otvoreni sklop gotovo bilijun stanica, koje su hijerarhijski organizirane u podsustave, a međustanična komunikacija najvažnija je osnova za normalno funkcioniranje mnogostaničnog organizma.

Dobro je poznato da postoji dvosmjerna komunikacija između imunološkog i neuroendokrinog sustava (31), a zajedničke molekule koje preko gotovo identičnih receptora prenose signale i informacije između ova dva sustava su hormoni, neurotransmiteri, polipeptidi i citokini. Ove signalne molekule mogu modulirati i genetički određene funkcije brojnih drugih organa, pa se može reći da su oba sustava odgovorna općenito za komunikaciju između stanica, odnosno za održavanje homeostaze organizma (208).

## **1. Uloga jetre u kontroli imunološkog odgovora**

Jetra ima ključnu ulogu u intermedijarnom metabolizmu, ali zahvaljujući nekim svojim funkcijama, ona je i jedna od izuzetno važnih komponenata složenog i sveobuhvatnog mehanizma obrane organizma.

U procesima nespecifične imunosti važnu ulogu imaju neparenhimske stanice jetre koje su sastavni dio fagocitno-monocitnog sustava, a posebno su značajne Kupfferove stanice jetre.

U jetri se vrše procesi ekstramedularne hematopoeze, diferencijacija nekih stanica i razgradnja ostarjelih ili oštećenih krvnih stanica.

Metaboličke funkcije jetre također su nužne za obranu organizma. Sinteza proteina plazme jedna je od najvažnijih, a citokini mogu svojim djelovanjem utjecati kako na nju, tako i na ostale metaboličke funkcije jetre. Isto tako i mnogi proteini koje jetra sintetizira sudjeluju u upalnom odgovoru organizma i modificiraju ga.

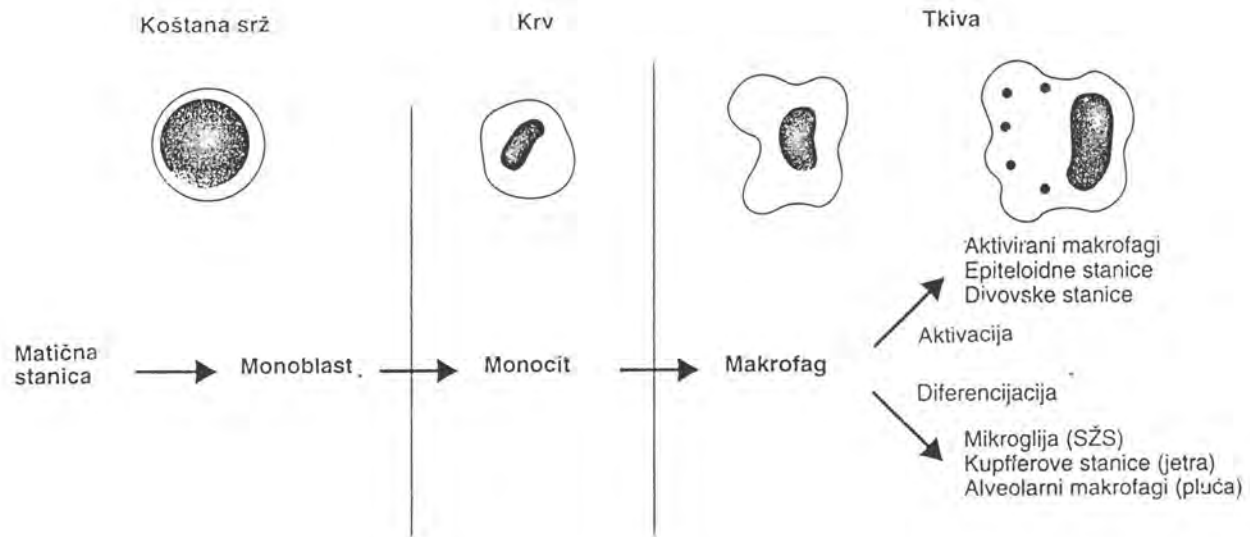
## 1.1. Fagocitno-monocitni sustav

Sve stanice fagocitno-monocitnog sustava nastaju iz hematopoetske stem stanice u koštanoj srži. U cirkulaciji se pojavljuju kao monociti, a zatim iz krvi odlaze u vezivno tkivo, jetru, slezenu, pluća, limfne čvorove, koštanu srž, serozne šupljine i kost gdje formiraju populaciju slobodnih i fiksnih makrofaga. Na slici 1 prikazani su način stvaranja i kinetika stanica fagocitno-monocitnog sustava (145).

Različite i specijalizirane funkcije stanica fagocitno-mononuklearnog sustava uvjetovane su njihovim topografskim smještajem, ali izgleda da svi posjeduju zajedničku osobinu: fagocitiranje stranih čestica i oštećenih ili ostarjelih stanica, te sudjelovanje u imunološkim reakcijama nespecifične imunosti.

Stanice fagocitno-monocitnog sustava adheriraju na površinu stanice, fagocitiraju strani materijal i bakterije, procesiraju antigen i prezentiraju ga, sudjeluju u IV tipu preosjetljivosti, izlučuju komponente komplementa, te IFN- $\alpha$  i IL-1. Razlikuju se dva tipa makrofaga: migracijski - koji se kreću od tkiva do tkiva i fiksni makrofazi - koji se nazivaju histiociiti (30). Tkivni makrofazi najvažnija su komponenta sustava pomoću kojega se iz organizma uklanjaju patogeni mikroorganizmi. Fagocitnu aktivnost reguliraju opsonini na patogenom materijalu i endogeni citokini. Citokine koji djeluju na makrofage proizvode i  $T_{H1}$  i  $T_{H2}$  klonovi limfocita. IFN- $\gamma$  pospješuje aktivaciju makrofaga za ubijanje intrastaničnih parazita i potiče sintezu Ia antigena i Fc- $\gamma$  receptora, a čimbenik koji stimulira proizvodnju granulocitno-makrofagne kolonije (engl. granulocyte-macrophage colony stimulating factor - GM-CSF) pospješuje proizvodnju i migraciju makrofaga na mjesto imunološke reakcije. Poznato je da i IL-4 aktivira makrofage na ekspresiju Ia i ubijanje u stanicama, ali ipak mnogo manje no IFN- $\gamma$  (177). Ključni stanični biljeg na površini makrofaga jest MAC-1<sup>+</sup>, odnosno CR1 i CR3 kao receptori komplementa, a osim njih na površini se nalaze i drugi receptori, npr. receptori za IFN- $\gamma$ , te receptori za Fc fragment IgG i IgE.

Primjena na pr. toksičnih doza acetanimofena, ugljičnog tetraklorida, fenobarbitala ili endotoksina u pokusnih će životinja izazvati nakupljanje makrofaga u jetri. Mononuklearni fagociti, hepatičke endotelne stanice i *Ito* stanice aktiviraju se pri tome, te oslobađaju proupalne i citotoksične medijatore kao što su vodikov peroksid, dušični



Slika 1. Način stvaranja i kinetika stanica fagocitno-monocitnog sustava (145)

(SŽS - središnji živčani sustav)



monoksid (NO), bioaktivne lipide, IL-1, čimbenik aktivacije trombocita i TNF- $\alpha$ . Svaki od ovih medijatora ima sposobnost da izazove oštećenje tkiva jetre izravno ili pospješujući upalni odgovor (151), odnosno aktivirani makrofazi luče široki niz biološki aktivnih produkata koji su važni posrednici tkivnog razaranja i fibroze karakteristične za upalu. Popis produkata koje otpuštaju makrofazi prikazan je u tablici 1 i na slici 2 (145).

Kupfferove stanice u jetri tipični su fiksni makrofazi. Smještene su na luminalnoj površini endotelnih stanica sinusoida jetre, a neposredno ih oplakuje krvna plazma koja se cijedi kroz poroznu endotelnu stijenku (slika 3). Kupfferove stanice predstavljaju najveću koncentraciju mononuklearnih fagocita u organizmu, ali nisu samo obični fagociti. One proizvode i izlučuju mnoštvo tvari kojima reguliraju funkciju drugih stanica. Djeluju i na stanice imunološkog sustava, a mogu izravno citotoksično djelovati na tumorske stanice i parazite. Porijeklo i citokinetika, a posebno povezanost Kupfferovih stanica s monocitno-makrofagnim sustavom ipak nisu sasvim razjašnjeni. Poznato je da ove stanice imaju sposobnost proliferacije i da nisu konačni oblici. Pokazalo se da pod određenim okolnostima Kupfferove stanice mogu odgovoriti na podražaj mitotičkom aktivnošću. Osim toga, stanice koštane srži mogu pod određenim uvjetima migrirati u jetru i diferencirati se u makrofage (34, 245). Uočeno je da u normalnoj jetri postoje dvije vrste Kupfferovih stanica, koje se razlikuju po veličini, što upućuje na mogućnost da imaju različite funkcije. Metodama dvojnog imunofluorescentnog vezanja s monoklonskim protutijelima ispitivani su pojedini dijelovi jetre. Iz izoliranih neparenhimskih stanica jetre izdvojene su stanice po veličini, te je u njihovim kulturama ispitivana sposobnost fagocitoze i proliferacija stanica. U obje populacije Kupfferovih stanica bila je podjednaka fagocitna aktivnost izazvana lipopolisaharidom (LPS), te sinteza prointerleukina-1- $\alpha$  i prointerleukina-1- $\beta$ . Veće stanice sintetizirale su C1-inhibitor i apolipoprotein E, dok su manje sintetizirale samo tragove ovih spojeva (12).

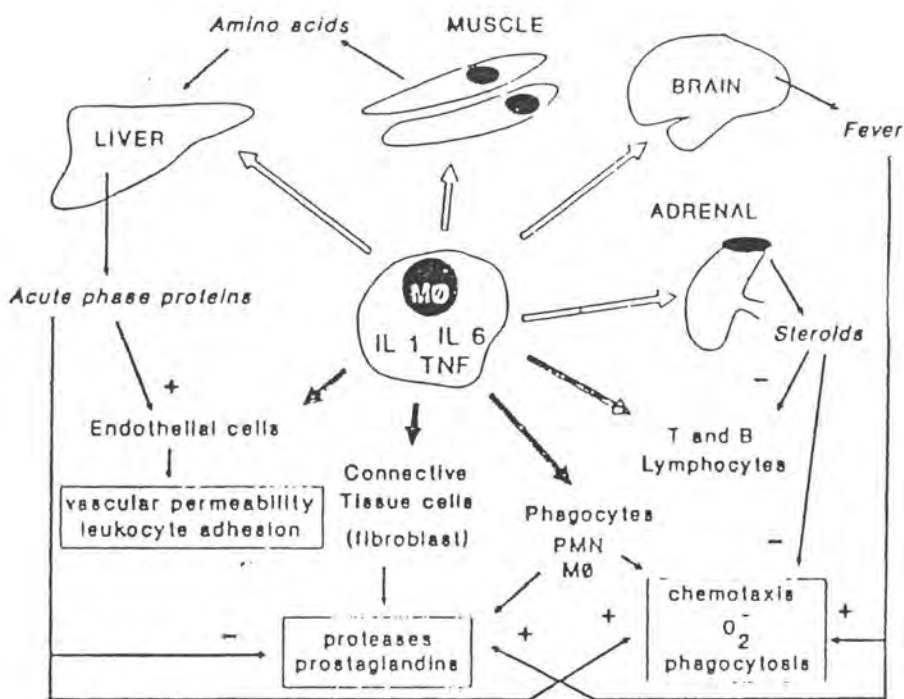
*Ito* stanice su perisinusoidalne zvjezdolike stanice koje sadrže masne kapljice, a nalaze se uz endotelne sinusoidalne stanice u Disseovim prostorima (slika 3). Poznato je da se u njima nalazi skladište vitamina A (retinoid storing cells). Ove stanice su prekursori miofibroblasta, odnosno aktiviraju se u upalnim područjima, gube svoje zalihe retinil-estera, proliferiraju i transdiferenciraju se u stanice koje proizvode osnovne sastojake vanstaničnog matriksa (engl. extracellular matrix - ECM). Tako aktivirane *Ito* stanice jetre nazivamo

Tablica 1. Produkti koje otpuštaju makrofazi (145)

(IL-1 - interleukin-1; TNF - čimbenik nekroze tumora; IL-8 - interleukin-8; PDGF - čimbenik rasta dobiven iz trombocita; EGF - epidermalni čimbenik rasta; FGF - čimbenik rasta fibroblasta)

|  |
|--|
| 1. Enzimi                                    |
| Neutralne proteaze                           |
| Elastaze                                     |
| Kolagenaze                                   |
| Plazminogeni aktivator                       |
| Kisele hidrolaze                             |
| Fosfataze                                    |
| Lipaze                                       |
| 2. Proteini plazme                           |
| Komponente komplementa (C1 do C5, properdin) |
| Faktori koagulacije (V, VII, tkivni faktor)  |
| 3. Reaktivni metaboliti kisika               |
| 4. Metaboliti arahidonske kiseline           |
| 5. Citokini (IL-1, TNF, IL-8)                |
| 6. Faktori rasta (PDGF, EGF, FGF)            |





Slika 5. Lokalni i sistemski (reakcija akutne faze) učinci citokina u upali (263)

Tablica 3. Funkcija nekih proteina akutne faze (preuzeto sa Interneta)

| PROTEIN                          | FUNKCIJA  |
|----------------------------------|---|
| $\alpha$ -1 kiseli glikoprotein  | interakcija s kolagenom; pospješuje rast fibroblasta; veže steroide   |
| $\alpha$ -1-antikimotripsinogen  | inhibitor proteaza  |
| $\alpha$ -1-antitripsin          | inhibitor proteaza; rezolucija amfizema   |
| $\alpha$ -2-antiplazmin          | modulator kaskade koagulacije   |
| Antitrombin III                  | modulator kaskade koagulacije   |
| C1 inhibitor                     | negativna kontrola kaskade komplementa  |
| C2                               | komponenta komplementa  |
| C3                               | komponenta komplementa  |
| C4                               | komponenta komplementa  |
| protein koji veže C4             | komponenta komplementa  |
| C5                               | komponenta komplementa  |
| C9                               | komponenta komplementa  |
| C-reaktivni protein              | vezanje na fosforilkolin u membrani, aktivacija komplementa i opsonizacija, interakcija s T i B limfocitima |
| Ceruloplazmin                    | protein koji veže bakar   |
| Faktor VIII                      | zgrušavanje i popravak fibrinskog matriksa  |
| Faktor B                         | komponenta komplementa  |
| Feritin                          | protein koji veže željezo   |
| Fibrinogen                       | zgrušavanje i popravak fibrinskog matriksa  |
| Fibronectin                      | stvaranje fibrinskog ugruška  |
| Haptoglobin                      | transport hemoglobina   |
| Hem oksigenaza                   | razgradnja hema   |
| Hemopexin                        | veže hem, transportni protein   |
| Heparin kofaktor II              | inhibitor proteaza  |
| Kallikrein                       | permeabilnost i dilatacija krvnih žila  |
| Protein koji veže LPS            | aktivacija makrofaga  |
| manganese superoxide dismutase   | protein koji veže bakar i cink, stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva                                      |
| Protein koji veže manozu         | serum lektin  |
| Plasminogen                      | proteolitička aktivacija komplementa, zgrušavanje, fibrinoliza  |
| Inhibitor plasminogen aktivatora | inhibitor proteaza  |
| Prothrombin                      | zgrušavanje i popravak fibrinskog matriksa  |
| Serum amiloid A                  | razgradnja kolesterola i HDL-a  |
| Serum amiloid P komponenta       | stvaranje IgG imunog kompleksa  |
| von Willebrand factor            | protein koagulacije   |

posebno reguliraju transkripciju reaktanata akutne faze u ljudi (11). Tu spadaju IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , čimbenik inhibicije leukemije (LIF), interleukin 11 (IL-11), onkostatina M (OSM), čimbenik cilijarne neutrofilije (CNTF) i retinoična kiselina. IL-1 i TNF- $\alpha$  potiču, preko CNS-a, sintezu glukokortikoida iz nadbubrežnih žlijezda, što pojačava indukciju sinteze reaktanata akutne faze u jetri. Istovremeno, negativnom povratnom spregom glukokortikoidi smanjuju sintezu IL-1 u makrofazima čime se smanjuje sinteza citokina i smiruje odgovor akutne faze (5). In vitro ispitivanjima i usporednim određivanjem koncentracije IL-6 u serumu s koncentracijama drugih proteina akutne faze, uočeno je da je IL-6 glavni regulator većine gena za sintezu proteina akutne faze (184). Porijeklo, receptori i djelovanje IL-6 prikazani su na tablici 4 (263). Poznato je da IL-6 kojega proizvode monociti ima najmanje pet različitih molekularnih oblika, što je posljedica posttranslacijskih promjena (glikolizacije ili fosforilacije), te mu molekularna masa varira od 21,5 do 28 kD (22). Oblik u kojem se javlja u serumu jest molekula velike molekularne mase, što je vjerojatno rezultat povezanosti s proteinskom molekulom koja ima transportnu ulogu (117). Pokazano je da na ekspresiju proteina akutne faze utječe i kompleks topivi IL-6 receptor-IL-6 (161).

Treba međutim naglasiti da je regulacija sinteze proteina akutne faze kompleksna i zahtjeva nekoliko posrednika koje ubrajamo u četiri glavne skupine: dvije se sastoje od citokina koji djeluju kao primarni regulatori i dvije skupine koje se sastoje od kofaktora (70). IL-1 grupa citokina (IL-1  $\alpha$  i  $\beta$  i TNF- $\alpha$ ) potiče proizvodnju tipa 1 proteina akutne faze, a to su:  $\alpha_1$ -kiselni glikoprotein, SAA, CRP i komponentu komplementa C3. IL-6 grupa citokina (IL-6, IL-11, LIF, OSM i CNTF) potiče sintezu tipa 2 proteina akutne faze (fibrinogen,  $\alpha_1$ -antitripsin,  $\alpha_1$ -antihimotripsin, haptoglobin, hemopeksin i ceruloplazmin). U većini slučajeva IL-1 ili TNF- $\alpha$  nemaju nikakvog utjecaja na proizvodnju tipa 2 proteina akutne faze, ali IL-6 grupa citokina može potaknuti povećanu proizvodnju proteina tipa 1 (133). Međutim, pokazalo se da ova razlika djelomično ovisi o vrsti i tipu kulture hepatocita u in vitro ispitivanjima. IL-1, IL-6 ili TNF- $\alpha$  mogu svaki za sebe utjecati na proizvodnju CRP-a, kombinacija IL-1 i IL-6 potiče proizvodnju CRP-a u kulturama ljudskih hepatocita linije HepG2 i Hep3B2, dok sam IL-6 potiče proizvodnju CRP-a u primarnim kulturama ljudskih hepatocita (160). Povećanu koncentraciju "pozitivnih proteina akutne faze" prati smanjivanje koncentracije "negativnih". Vjerojatno se to događa zbog povećane razgradnje

| STANICE KOJE LUČE IL-6 |   | RECEPTORI ZA IL-6 SU NA: | FUNKCIJE IL-6                                      |
|------------------------|---|--------------------------|--|
| FIBROBLASTI            | ↘ | T - LIMFOCITI            | Stimulacija i diferencijacija B-ly<br>- antitijela |
| ENDOTELNE STANICE      | ↗ | B-LIMFOCITI              |  |
| MONOCITI               | ↘ | MONOCITI                 | Povećava ekspanziju aktiviranih<br>T-ly            |
| MAKROFAZI              | ↗ | FIBROBLASTI              |  |
| MASTOCITI              | ↗ | MEGAKARIOCITI            | Povećava proizvodnju<br>hematopoietskih<br>stanica |
| T - LIMFOCITI          | ↘ | HEPATOCITI               |  |
| B - LIMFOCITI          | ↗ | KERATINOCITI             | Povećava proizvodnju proteina<br>akutne faze       |
| KERATINOCITI           | ↘ | MESANGIJALNE STANICE     |  |

Tablica 4. Izvor, receptori i djelovanje IL-6 (263)

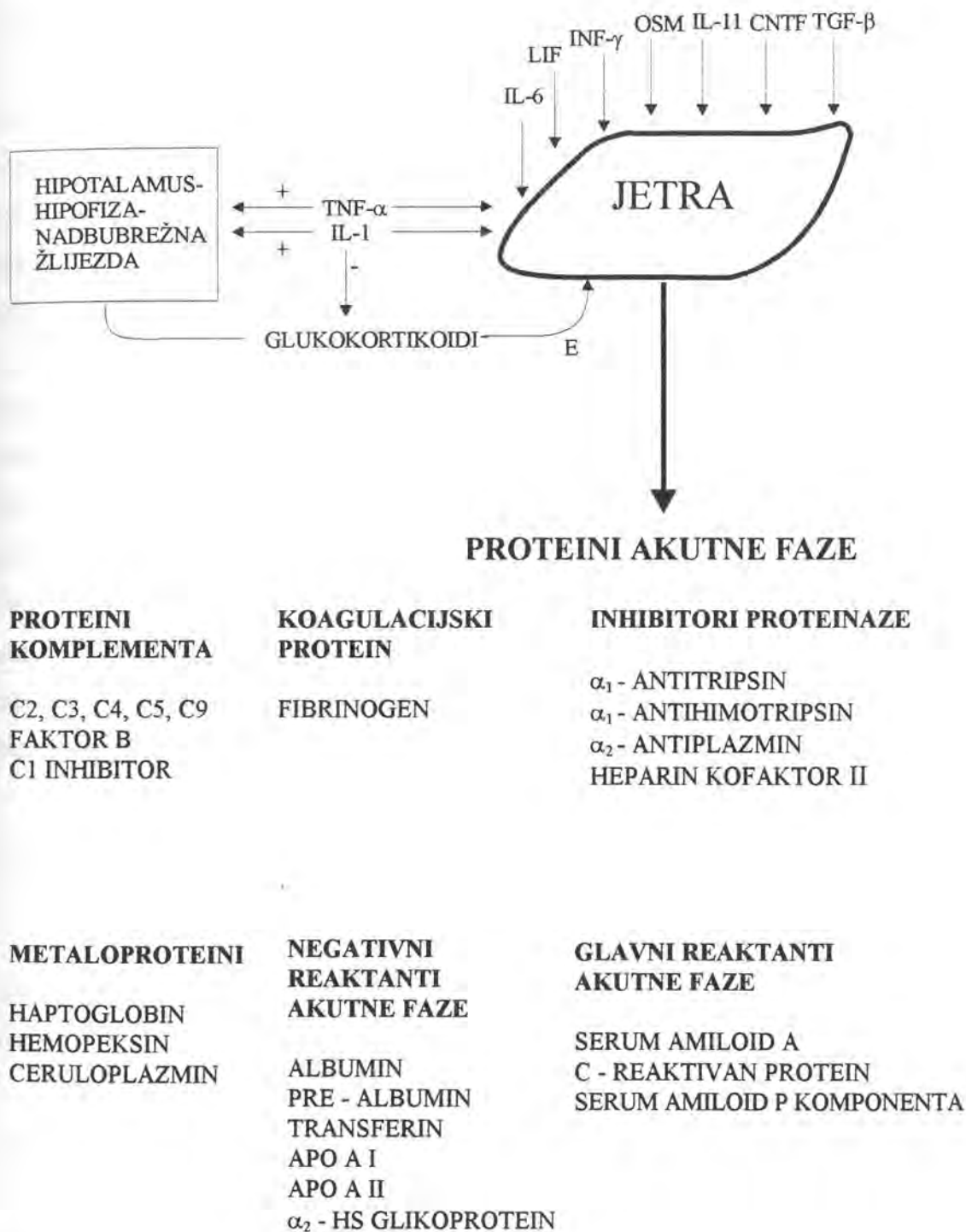
proteina, iako novija istraživanja navode da IL-1, TNF- $\alpha$  i IL-6 imaju sposobnost kočenja transkripcije gena za sintezu albumina (138). Proteini akutne faze i upalni posrednici koji reguliraju njihovo stvaranje prikazani su na slici 6 (241). Promjene u koncentracijama pojedinačnih reaktanata akutne faze u plazmi variraju, a vjerovatno odražavaju razlike u količini svakog proteina koji je potreban da bi učinkovito sudjelovao u reakciji na akutnu fazu (179).

Osim što reguliraju intenzitet imunološkog odgovora i induciraju sintezu proteina akutne faze u jetri, citokini ujedno snažno induciraju otpuštanje nekolicine hormona iz hipofize i hipotalamusa: ACTH, GH, TSH, LH (89).

U skupinu glavnih reaktanata akutne faze spadaju: SAA i CRP kod ljudi ili njegov homolog kod miševa, serum amiloid P komponenta (241). SAA čine mali apolipoproteini koji se za vrijeme reakcije akutne faze brzo spajaju s HDL-om, postaju dominantan apolipoprotein i prisutni su u većoj količini u HDL-u od apo A-1. Oni mijenjaju molekulu HDL-a i djeluju kao signal koji ju preusmjerava prema makrofazima. SAA pospješuje vezanje HDL-a na makrofage, a smanjuje njegovo vezanje za hepatocyte. Time utječu na metabolizam kolesterola, jer makrofazi tada mogu progutati kolesterol i ostatke lipida na mjestima nekroze, a višak kolesterola se poslije koristi prilikom obnove tkiva ili se izlučuje (248).

Tiller i Francis su 1930. godine (251) izvjestili o otkriću C-reaktivnog proteina. Oni su proučavali serološke reakcije kod pneumonije s različitim ekstraktima pneumokoka i primjetili da se netipična somatska polisaharidna frakcija, koju su imenovali frakcija C, precipitira u plazmi akutno bolesnih pacijenata. MacLeod i Avery (162) pročistili su 1941. molekulu CRP-a, te razvili zečje protutijelo na CRP. Avery je opisao CRP kao protein koji treba ione kalcija za reakciju sa C-polisaharidom. Već je relativno dugo poznato da se CRP sintetizira u hepatocitima (148), ali se zna da se sinteza može vršiti i u drugim stanicama, npr. u nekim limfocitima, Kupfferovim stanicama, alveolarnim makrofazima, te monocitima (147).

U serumu zdravih osoba koncentracija CRP-a je do 10 mg/L, a povećava se kod upalnih bolesti gdje se mogu naći vrijednosti i do tisuću puta veće (113). CRP je glikoprotein sastavljen od pet identičnih polipeptidnih monomera koji su nekovalentno povezani u konfiguraciju oblika diska s cikličnom pentameričnom simetrijom, a struktura



Slika 6. Proteini akutne faze i upalni posrednici koji reguliraju njihovo stvaranje (241)  
(TNF - čimbenik nekroze tumora; IL - interleukin; LIF - čimbenik inhibicije  
leukemije EGF - epidermalni čimbenik rasta; IFN - interferon; OSM - onkostatin  
M; CNTF - čimbenik cilijarne neutrofilije; TGF- čimbenik transformacije rasta)



mu nalikuje molekuli serum amiloid P komponente. Relativna molekulska masa mu je 107 500 (87). Kada CRP stupi u vezu s antigenom, bilo putem njegovih kalcij-ovisnih ili polikationskih veznih mjesta, postaje snažan aktivator klasičnog puta komplementa započinjući sa C1q. Iako se CRP i imunoglobulin strukturno razlikuju, aktivacija komplementa CRP-om odvija se jednako efikasno kao i s imunoglobulinom, vodi do aktivacije C3b komponente koja se veže na česticu koju treba fagocitirati (opsonizacija), i dalje do aktivacije terminalnih komponenata C5b-C9 koje izazovu lizu stanica. CRP se, kao i protutijela, može vezati za antigen, opsonizirati česticu koju treba fagocitirati, oštetiti stanice i započeti upalnu reakciju. Druge aktivnosti koje se pripisuju CRP-u uključuju selektivno vezivanje za T-limfocite i promjenu nekih njihovih funkcija, usklađivanje aktivnosti trombocita, pojačavanje kemotaksije i fagocitoze neutrofila i makrofaga, pojačavanje tumoricidne aktivnosti makrofaga (43). Čini se da je glavna uloga CRP-a da u plazmi prepozna potencijalne toksične endogene supstance ispuštene iz ozljeđenog tkiva, veže se za njih, detoksicira ih i olakša njihovo čišćenje. Zbog djelovanja na endogene i egzogene supstance, komplement i leukocite, CRP ima važnu ulogu u obrambenim mehanizmima čovjeka.

## **2. Međusobni odnosi između imunološkog i neuroendokrinog sustava**

Neuroendokrini i imunološki sustav ponašaju se kao osjetilni organi koji reagiraju na zbivanja u okolišu organizma ili u samom organizmu, a mogu biti aktivirani nizom različitih unutarnjih ili vanjskih čimbenika.

Neuroimunoendokrinologija naziv je za interdisciplinarna istraživanja kojega su prvi put upotrijebili Johnson i sur. 1982. god. (121), iako su prva zapažanja o postojanju interakcije između imunog i neuroendokrinog sustava objavili još 1926. god. Metalnikova i Chorine (172), te Pavlov 1928. god. (193). Obimna istraživanja u posljednjem desetljeću potvrdila su postojanje posve integrirane regulacijske petlje koja postoji između neuroendokrinog i imunog sustava. Ne samo da neuropeptidi pokazuju različita imunoregulacijska djelovanja, već i produkti imunološkog sustava imaju hormonske funkcije, te imuni sustav može mijenjati i regulirati neuroendokrine funkcije.

Hormoni, neurotransmiteri, polipeptidi i citokini zajedničke su molekule koje preko gotovo identičnih receptora prenose signale i informacije između dva sustava, i na taj način održavaju dvosmjernu komunikaciju između njih. Ove signalne molekule mogu nadalje modulirati i genetički određene funkcije brojnih drugih organa, te se može reći da su oba sustava odgovorna općenito za komunikaciju između stanica i za održavanje homeostaze organizma (208).

Najvažniji komunikacijski putovi suradnje imunog i neuroendokrinog sustava su: humoralni put, difuzni neuroendokrini sustav i autonomni nervni sustav.

### ***2.1. Uloga citokina u aktivaciji neuroendokrinog sustava***

Poznato je da različiti peptidi, prvobitno opisani kao proizvodi imunološkog sustava, dakle spojevi nastali u leukocitima aktiviranima u imunološkom odgovoru, mogu djelovati kao hormoni ili inducirati lučenje hormona iz neuroendokrinog sustava.

Interferoni su produkt makrofaga i limfocita. Prvi su citokini za koje se uočilo da imaju i hormonske funkcije. Poznato je da *in vitro* induciraju steroidogenezu u kultiviranim adrenalnim stanicama, budući da oponašaju djelovanje ACTH stimulirajući lučenje glukokortikoida (29). Slični učinci primjećeni su i *in vivo* u kliničkim ispitivanjima, gdje je IFN- $\alpha$  povećao koncentraciju kortizola u krvi pacijenata (225). IFN inducira sintezu melanina slično djelovanju hormona koji stimulira melanocyte- $\alpha$  ( $\alpha$ MSH), povećava ugradnju joda u stanice štitnjače poput TSH, pobuđuje mozak poput endorfina i djeluje antagonistički inzulinu poput glukagona. Svi ovi učinci posljedica su aktivacije interferonskih receptora ili aktivacije drugih hormonskih receptora. IFN- $\alpha$  veže se na primjer za opijatne receptore u miša i izaziva neuropsihijatrijske manifestacije tj. analgestični i katatonični odgovor *in vivo* poput endorfina. Ovaj učinak može se blokirati naloksanom, kompetitivnim antagonistom opijata, a primjećeno je i ublažavanje naloksanom izazvanog morfinskog apstinencijskog sindroma nakon primjene IFN- $\alpha$  u štakora (56).

IL-1 porijeklom iz monocita jest endogeni leukocitni pirogen koji izaziva vrućicu, nagli porast tjelesne temperature i groznicu nakon intracerebroventrikularne aplikacije (63). Isto tako uzrokuje sporovalno spavanje (142). Povećava koncentraciju ACTH (jer potiče njegovo oslobađanje) i kortikosterona u plazmi djelujući izravno na stanice adenohipofize



(20) ili tako da potiče lučenje čimbenika koji oslobađa kortikotropin (CRF-a) iz hipotalamusa (23). IL-1 i IL-2 induciraju oslobađanje hormona rasta iz adenohipofize (24) i povećavaju sintezu mRNA potrebne za sintezu pro-opiomelanokortina (POMC) u stanicama adenohipofize (38). IL-1 također stimulira sintezu somatostatina u hipotalamičkim stanicama, što dovodi do smanjene sekrecije hormona rasta i tireotropnog hormona (231). Važna je i uloga lokalne proizvodnje IFN iz astrocita.

Timosin  $\alpha_1$  djeluje na nervni sistem i povećava koncentraciju ACTH, a timosin  $\beta_1$  i IL-1 djeluju na hipotalamus. IL-2 djeluje na hipofizu povećavajući koncentraciju ACTH i kortizola.

Limfokini djeluju na stanični rast i diferencijaciju nervnih stanica, bilo izravnim učincima ili učincima posredovanim drugim citokinima, podrijetlom iz CNS-a, zahvaljujući tome što mnoge različite stanice CNS-a ekspimiraju receptore za limfokine i druge medijatore limfatičkog sustava. IL-1 i IL-2 pojačavaju izravnu aktivaciju i diferencijaciju oligodendrocita. IL-2 inducira sazrijevanje oligodendrocita, što se očituje povećanom produkcijom mijelina. Čimbenik stimulacije glija stanica i TNF iz limfocita T i B izazivaju izravnu stimulaciju rasta i proliferacije astrocita (171, 144). Aktivirani mastociti u nervnom tkivu dovode do povećane podražljivosti senzoričkih vlakana i modificiraju sinaptičku transmisiju u simpatičkim i parasimpatičkim ganglijima (254). Čimbenik aktivacije trombocita aktivira kultivirane nervne stanične linije PC12 i NG108-15, što se očituje u porastu intrastaničnog  $Ca^{++}$ , porasta stvaranja ATP-a u PC12 staničnoj liniji i neuronalnoj diferencijaciji NG108.15 stanične linije (90).

Osim dokaza da različiti limfokini mogu modulirati aktivnost neuroendokrinog sustava postoje i dokazi koji pokazuju da različite stanice iz neuroendokrinog sustava imaju sposobnost stvaranja određenih citokina. Pregled imunoloških medijatora koje izlučuju stanice neuroendokrinog sustava prikazan je u tablici 5 (89).

Iz opisanog se vidi da nakon aktivacije imunološkog sustava slijedi aktivacija neuroendokrinog sustava i lučenje hormona koji onda povratno moduliraju imunološku reakciju i ponovno uspostavljaju homeostazu.

Tablica 5. Pregled imunoloških medijatora koje izlučuju stanice neuroendokrinog sistema  
(89)

| Medijator     | Astroцити          | Glioblastociti     | Metoda identifikacije                     |
|---------------|--------------------|--------------------|---|
| IL-1          | +                  | +                  | Imunokemijski, funkcionalni učinci        |
| IL-2          | -                  | -                  | Imunokemijski, funkcionalni učinci        |
| IL-3          | +                  | +                  | Funkcionalni učinci, gel-filtracija       |
| IL-6          | +                  | +                  | Funkcionalni učinci                       |
| TNF- $\alpha$ | +                  | NA                 | Funkcionalni učinci                       |
| TNF-s         | IFN $\alpha/\beta$ | IFN $\alpha/\beta$ | Funkcionalni učinci, imunokemijski        |
| GM-CSF        | +                  | NA                 | Funkcionalni učinci, imuno-neutralizacija |
| TGF- $\beta$  | -                  | +                  | Funkcionalni učinci, struktura            |

+ prisutan, - nije prisutan, NA nije analiziran

(IL-interleukin; TNF-čimbenik nekroze tumora; IFN - interferon; GM-CSF - čimbenik koji stimulira proizvodnju granulocitno-makrofagne kolonije; TGF - čimbenik transformacije rasta)

## 2.2. Uloga hormona i neurotransmitera u kontroli imunološkog sustava

Peptidni hormoni kao i drugi produkti difuznog neuro-endokrinog sustava djeluju na ciljne stanice posredstvom membranskih receptora. Veliki broj ovih molekula ima svoje receptore i na stanicama limfatičkog sustava, što omogućuje regulacijsku ulogu hormona i neurotransmitera u imunološkoj reakciji. Receptori za ACTH otkriveni su na mišjim mononuklearnim stanicama i humanim limfocitima, a na limfatičkim stanicama pronađeni su i receptori za endogene opijate metionin-enkefalin,  $\beta$ -endorfin, neurotensin, supstanciju P i hormon rasta (89).

Hormonska, hijerarhijski postavljena osnova neuroendokrinog sustava jest osovina hipotalamus - hipofiza - ciljni organ (žlijezda). Za hipofizu se često kaže da je dirigent u endokrinom "orkestru". Sekretiju hormona adenohipofize reguliraju neurosekretorni neuroni hipotalamusa, putem oslobađajućih ili inhibicijskih čimbenika. Aksoni ove populacije neurona tvore tuberoinfundibularni tračak koji završava na kapilarama eminencije medijane, odnosno na hipotalamo-hipofiznom portalnom krvotoku, putem kojega se spomenuti čimbenici dopremaju u prednji režanj hipofize. Sam hipotalamus stoji u vezi sa drugim regijama mozga, tako da i one mogu imati utjecaja na neuroendokrinu funkciju hipotalamusa. Aferentna vlakna koja prima hipotalamus podijeljena su na nekoliko puteva: 1.kortikohipotalamusni putevi 2.aferentne veze između amigdala i hipotalamusa 3.aferentni putevi iz područja septuma 4.aferentni putevi iz talamusa 5.optički aferentni putevi 6.mezencefalički aferentni putevi (242).

Signali iz različitih regija mozga putem stimulacijskih (acetil-kolin, serotonin putem kolinergijskog interneurona) i inhibicijskih neurotransmitera, kontroliraju lučenje CRF-a, zajedno sa negativnom povratnom spregom, koja uključuje učinke glukokortikoida i ACTH (122). U bazofilnim stanicama adenohipofize se pod uplivom CRF-a proizvodi ACTH, koji na razini kore nadbubrežne žlijezde dovodi do lučenja glukokortikoida.

Veliku važnost u modulaciji imunog odgovora ima upravo ova osovina kontrole lučenja kore nadbubrežne žlijezde, jer značajnu ulogu u modulaciji imunog odgovora zauzimaju glukokortikoidni hormoni, odnosno kortizol (hidrokortizon) koji čini 95% svih glukokortikoida.

Kortizol je u krvi vezan na proteine globin ili albumin, a svega 2% se nalazi u nevezanom, aktivnom obliku. Budući je lipofilan, kada se nađe u vanstaničnoj tekućini relativno se lako veže na ciljna tkiva putem receptora (za oko 1-2 sata). U citoplazmi stanice ciljnog tkiva hormon se veže za specifične receptorske proteine čineći kompleks hormon-receptor, koji se potom aktivira, translocira u jezgru, te se veže s akceptorskim mjestom u kromatinu, što dovodi do povećane transkripcije mRNA i akceleracije sinteze specifičnih proteina. Brojni su metabolički učinci kortizola, posebno na metabolizam ugljikohidrata i proteina (2), ali su izuzetno važna i njegova ostala djelovanja, prvenstveno u stresu, zatim njegovo protuupalno djelovanje, utjecaj na stanični rast i diferencijaciju tkiva. Važno je i djelovanje kortizola na remodeliranje tkiva tijekom razvoja i to putem mehanizma uključenog u regulaciju ekspresije gena. Povećane količine kortizola blokiraju sve stadije upale (21). Kortizol stabilizira membranu lizozoma koja teže puca, i oslobađa se manje hidrolitičkih enzima, te je i manje razorenih unutarstaničnih proteina. Nadalje, inhibira stvaranje bradikinina koji je vazodilatator, smanjuje propustnost kapilarnih membrana, umanjuje učinke histamina (smanjuje vrućicu i vazodilataciju), migraciju leukocita u upalno područje i fagocitozu, što rezultira smanjenim oslobađanjem inflamatornih tvari, te konačno kortizol povećava učinke noradrenalina i adrenalina (97). Tim opisanim djelovanjem kortizol zapravo suprimira imunološki sustav: smanjuje broj eozinofila i limfocita, u upalno područje dolazi manje protutijela i stvara se manje senzibiliziranih leukocita; smanjuje se imunološki odgovor do te mjere da može doći do atrofije limfatičkog tkiva. Supresivni učinak na imunološki sustav povećane koncentracije glukokortikoida pokazuju in vivo i in vitro i to na većinu imunoloških funkcija (51). U eksperimentalnih životinja dugotrajno davanje glukokortikoida izaziva involuciju timusa i depleciju nezrelih kortikalnih timocita, a u ljudi oboljelih od Morbus Addison-a, bolesti koja je karakterizirana hipofunkcijom nadbubrežne žlijezde, te je smanjeno stvaranje glukokortikoida, uočava se povećani timus. Davanje terapijskih doza glukokortikoida u ljudi izaziva reverzibilnu limfocitopeniju i monocitopeniju u perifernoj krvi. To nije posljedica lize ili stanične smrti, već stanične redistribucije, tj dolazi do selektivne deplecije necitotoksičnih stanica iz cirkulacije. Intravenozno davanje hidrokortizona izaziva depleciju T limfocita sa Fc receptorima za IgM i IgE, a in vitro glukokortikoidi suprimiraju T limfocite sa Fc receptorima za IgG, koji su jače izraženi na aktiviranim limfocitima negoli na "djevičanskim", tj. neaktiviranim T

limfocitima (6). Glukokortikoidi se terapijski upotrebljavaju pri transplantaciji organa, sa ciljem da spriječe odbacivanje transplantata, u GVH bolestima, te pri akutnim limfocitnim leukemijama i upalama, da bi se smanjili nepoželjni učinci upale.

Glukokortikoidi izrazito inhibiraju blastičnu transformaciju T limfocita izazvanu konkavalinom A (ConA) i fitohemaglutininom (PHA), a stimuliraju onu induciranu s PWM (Pokeweed Mitogen).

Hidrokortizon pojačava ekspresiju DR antigena na monocitima, ali inhibira antigen prezentaciju monocita.

NK stanice i citotoksične stanice ovisne o protutijelima (engl. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC) su rezistentne na kinetičke i funkcionalne učinke hidrokortizona in vivo pri farmakološkim koncentracijama.

In vitro, glukokortikoidi povećavaju proizvodnju imunoglobulina. U miševa je taj učinak posredovan pomoćničkim stanicama koje su neophodne za sazrijevanje B limfocita, ili kroz indukciju glukokortikoid-ovisnih citokina. Nakon PWM stimulacije perifernih limfocita, glukokortikoidi in vitro u ljudi induciraju proizvodnju stanica koje stvaraju hemolitičke čistine (engl. plaque forming cells - PFC) tj. stanica koje izlučuju imunoglobuline. Inhibicijski učinak glukokortikoida na B limfocite sastoji se u tome što mijenjaju proizvodnju imunoglobulina i izazivaju poremećaj u vezanju protutijela i komplementa na površini stanica.

Glukokortikoidni hormoni kao i citotoksični T limfociti i NK stanice ubijaju nezrele timocite i izvjesne druge ciljane stanice aktivirajući "suicidni proces" ili staničnu smrt. Osjetljivost na glukokortikoidnu indukciju apoptoze (limfocitolizu) ovisi o stadiju zrelosti i proliferacijskom kapacitetu, jer su imaturalni, nezreli timociti posebno osjetljivi na litičko djelovanje glukokortikoida (50). Glukokortikoidi perturbiraju metabolizam limfocita na brojnim točkama: reduciraju transmembranski transport glukoze, aminokiselina i nukleozida, reduciraju biosintezu proteina, i nukleinskih kiselina, snižavaju katalitičku aktivnost RNA polimeraze i proizvodnju ATP-a, te stimuliraju katabolizam proteina (53). Limfocitoliza je karakterizirana ekspresijom "lysis gena" i aktiviranjem endogene endonukleaze, a prepoznaje se po fragmentaciji DNA, pojačanom ulasku kalcijevih iona u timocite iz vanstanične tekućine i konačno, do exitusa stanice dolazi kada nukleaza cijepa genom DNA na internukleosomalnom mjestu u jezgri (52).



Dugo vremena mislilo se je da je najvažnija veza neuroendokrinog i imunološkog sustava opisani glukokortikoidni hormon, no sada je poznato da osim kortizola i peptidni hormoni mogu izravno djelovati na imunološki sustav.

Posebno je značajna uloga ACTH, za kojeg se zna da osim preko glukokortikoida, može djelovati i izravno i to tako da regulira funkciju većine stanica u imunološkom sustavu (T limfocite, B limfocite, makrofage), budući da limfociti posjeduju membranske receptore za ACTH (121). ACTH suprimira odgovor na T-ovisne antigene (ovčje eritrocite), ali i na T-neovisne antigene kao što je dinitrofenol. Supresivno međutim djeluje samo strukturni dio (1-39), a ne i dio (1-24). Za maksimalnu inhibiciju sinteze protutijela ACTH (1-39) mora biti prisutan u vrijeme dodavanja antigena i čini se da ACTH inhibira odgovor protutijela na sličan način kao IFN, utjecajem na B-staničnu proliferaciju. ACTH naime uz čimbenik rasta porijeklom iz B limfocita (engl. B-cell growth factor -BCGF) ili IL-2 pospješuje rast i diferencijaciju B limfocita, a inhibira proizvodnju protutijela. Čini se ipak da su T limfociti osjetljiviji na utjecaj ACTH nego B limfociti. ACTH suprimira in vitro proizvodnju limfokina i IFN- $\gamma$  iz T limfocita (121), a suprimira i djelovanje već stvorenog IFN- $\gamma$ , te na taj način blokira aktivaciju makrofaga preko IFN- $\gamma$  (132). Osim toga ACTH djeluje i preko glukokortikoida (kortizola), koji inhibira mnoge od T-staničnih funkcija (188).

Pod utjecajem CRF-a iz bazofilnih stanica adenohipofize luči se i  $\beta$ -endorfin koji zajedno sa metionin-enkefalinom, oslobođenim iz nadbubrežne žlijezde, igra značajnu ulogu u modulaciji imunološkog odgovora. Metionin-enkefalin povećava postotak T limfocita koji stvaraju aktivne rozete sa ovčjim eritrocitima, iako dugotrajno doprinosi njihovoj supresiji, a  $\beta$ -endorfin deprimira odgovor T limfocita na ConA.  $\beta$ -endorfin u pikomolarnim koncentracijama suprimira produkciju  $O_2$  radikala i vodikovog peroksida u humanim monocitima inkubiranim sa forbol miristat acetatom, dok hormon rasta pojačava oksidativni metabolički odgovor makrofaga u in vitro eksperimentima (103).

$\alpha$ -endorfin blokira produkciju i sekreciju T-pomoćničkog antigen-specifičnog čimbenika za proizvodnju protutijela, blokira sekreciju protutijela, te inhibira pretvorbu B limfocita u plazma-stanice. Budući da naloxan, antagonist opijata, suprimira aktivnost  $\alpha$ -endorfina, znači da svoje djelovanje ovaj opioidni peptid vrši preko "klasičnog" receptora za opijate.

Stvaranje vodikovog peroksida u makrofazima kao i njihovu funkciju prezentacije antigena, moguće je inhibirati preinkubacijom s kalcitoninom (185).

Neki neuropeptidi mogu djelovati na makrofage posredno, preko limfocita T. Tako npr. inhibicijom sekrecije prolaktina bromokriptinom moguće je u miša spriječiti indukciju makrofagne citotoksičnosti posredovane limfocitima T, kao i suprimirati limfocitnu proliferaciju i produkciju IFN- $\gamma$  (24).

U zaključku, opioidni peptidi pospješuju stvaranje citotoksičnih T limfocita i ekspresiju citotoksičnosti regulirane NK stanicama, suprimiraju produkciju T limfocitnog kemotaksičnog čimbenika i stimuliraju kemotaksiju monocita i neutrofila.

TSH je jedan od prvih neuroendokrinih hormona koji *in vitro* pospješuje proizvodnju protutijela. To je hormon hipofize, ali ga stvaraju i limfociti kao odgovor na čimbenik koji oslobađa tireotropin (engl. tireotropin releasing factor - TRF). TSH neizravno pojačava humoralni imunološki odgovor *in vitro*, djelujući na pomoćničke limfocite T, tijekom njihovih međustaničnih kontakata s limfocitima B, što rezultira pojačanjem sinteze i lučenja protutijela (143).

Arginin-vasopresin i oksitocin, hormoni neurohipofize, također pokazuju imunoregulacijske učinke. Reguliraju proizvodnju IFN- $\gamma$  u T-pomoćničkim, T-supresorskim limfocitima i u stanicama koje proizvode IFN- $\gamma$ . U toj funkciji ovi hormoni mogu djelomično i zamjeniti učinak IL-2.

Supstanca P jest peptid perifernog živčanog tkiva koja ima važnu ulogu u ekspresiji i modulaciji preosjetljivosti ranog tipa. Prouzrokuje ne-citotoksičnu degranulaciju mastocita i bazofila, odnosno brzo oslobađanje histamina iz seroznih mastocita i to nezavisno o molekuli IgE na membrani i putevima transmembranskog signaliranja sa molekule IgE u unutrašnjost stanice (77). Sličan učinak oslobađanja histamina iz peritonealnih mastocita posjeduje i živčani čimbenik rasta (252). Supstancija P djeluje i na mehanizme nespecifične imunosti, osobito na polimorfonuklearne leukocite. Ona za 50-100% pojačava kemotaktični učinak C5a komponente komplemента na neutrofile (196). S druge strane  $\alpha$ -MSH inhibira kemotaktični učinak IL-1, TNF i C5a komponente komplemента za neutrofile (91). U humanim monocitima periferne krvi supstancija P i supstancija K induciraju stvaranje IL-1, TNF- $\alpha$  i IL-6 (155).

Nakupljanje određene podvrste limfocita u tkivima i organima sa posebnim specifičnostima i potrebama u obrani od stranih agenasa, zahtijeva migraciju, lokalnu diferencijaciju, te ekspresiju različitih adhezijskih molekula na membrani limfocita. Neuroendokrini peptidi imaju vrlo važnu ulogu u diferencijaciji, tkivnoj preraspodijeli kao i različitim imunološkim funkcijama limfocita vezanim za mehanizme lokalne imunosti. Tako vazoaktivni intestinalni polipeptid (VIP) iz nervnih vlakana, pronađenih u Payerovim pločama i mezenteričnim limfnim čvorovima, utječe na preraspodjelu limfocita u ova tkiva. Visokoafinitetni receptori za VIP pronađeni su na mišjim limfocitima T, osobito na CD4<sup>+</sup> stanicama, a čija ekspresija se može smanjiti izlaganjem ovih stanica VIP-u. Smanjenje ekspresije receptora za VIP na limfocitima mezenteričnih limfnih čvorova, ometa ponovnu raspodjelu ovih stanica u limfatičko tkivo pridruženo gastrointestinalnom traktu u sinergičnih primaoca (187).

Estrogeni kratkotrajnom primjenom izazivaju deleciju ranijih razvojnih stadija limfocita T, a nakon dugotrajne primjene i zrelije oblike regulacijskih CD4<sup>+</sup> limfocita T u miša (233). Proizvodnja imunoglobulina na autologne eritrocite u CD5<sup>+</sup> limfocitima B, pojačana je učinkom estrogena.

Pored navedenih regulacijskih mehanizama veliku ulogu u kontroli imunološkog odgovora igra i autonomni nervni sustav (ANS). To je dio živčanog sustava koji nadzire o volji i svijesti nezavisne funkcije. Sastoji se od dva, međusobno antagonistička dijela, simpatikusa, lociranog u torakolumbalnom dijelu leđne moždine i parasimpatikusa, smještenog u kraniosakralnom dijelu. Ovi ishodišni centri ANS-a stoje pod utjecajem nadređenih moždanih centara iz moždanog debla, limbičkog sustava, moždane kore i hipotalamusa. Na okončinama simpatikusa luči se neurotransmiter noradrenalin, a na okončinama parasimpatikusa acetil-holin. I simpatikus i parasimpatikus dobro inerviraju limfatičko tkivo, osobito timus, slezenu i koštanu srž, što ANS-u pruža široke mogućnosti modulacije imunološkog sustava.

Epitelne stanice timusa posjeduju i kolinergijske i adrenergijske receptore preko kojih ANS najvjerojatnije kontrolira mikrookolišne uvjete potrebne za sazrijevanje timocita (98). Poznato je da limfociti nose kolinergijske kao i  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergijske receptore. Stimulacija preko kolinergijskih i  $\alpha$ -adrenergijskih receptora pojačava limfocitnu proliferaciju, a  $\beta$ -adrenergijska stimulacija je inhibira. Citotoksična reaktivnost i sekrecijske



funkcije limfocita T su kolinergijskom stimulacijom pojačane, a  $\beta$ -adrenergijskom inhibirane. Stimulacija  $\beta$ -adrenergijskih receptora, preko aktivacije adenilat-ciklaze, inducira sustav cAMP, dok stimulacija kolinergijskih receptora aktivira gvanidilat ciklazu, enzim koji katalizira nastanak 3,5-cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP).

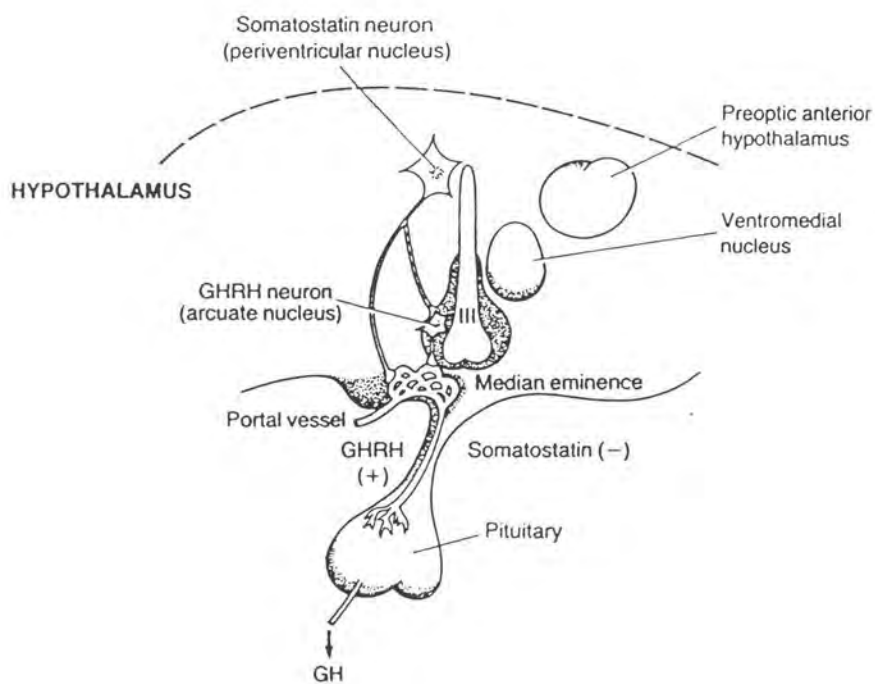
S obzirom da u radu pratimo učinke hormona rasta, IGF-a i somatostatina, ove hormone posebno ćemo prikazati.

### *2.2.1. Hormon rasta*

Izlučivanje hormona rasta pod kontrolom je složenog neuroendokrinog kontrolnog sustava koji uključuje interakciju nekoliko komponenata - CNS, hipotalamus, prednji režanj hipofize, ciljne žljezde i periferno tkivo. Noviji rezultati ispitivanja potvrđuju i detaljnije ispituju međusobne odnose najznačajnijih hormona hipotalamusa zaduženih za tu kontrolu. Na slici 7 je shematski prikazan mehanizam otpuštanja hormona rasta iz hipofize. Rezultati istraživanja (247) upućuju na to da somatostatin ima ključnu i odlučujuću kontrolnu ulogu u oslobađanju čimbenika koji oslobađa hormon rasta (engl. growth hormone releasing hormone - GHRH) iz arcutnih nukleusa i da je on odgovoran za pulsatilno izlučivanje GHRH-a (222). Osim toga, dobro je poznato da izlučivanje hormona rasta stimuliraju stres, gladovanje, hipoglikemija i unos nekih aminokiselina ili droga, posebno L-dopa.

Ispitivanja hormona rasta na molekulskoj razini uključuju otkrivanje i strukturu gena (genska obitelj hormona rasta uključuje pet vrlo sličnih gena na udaljenosti od 55 kb na dugom kromosomu 17), proizvodnju hormona koji ne pripadaju istoj porodici, te delecije gena za hormon rasta i korionski somatomamotropin (190).

Poznato je da hormon rasta ima imunomodulatorno djelovanje, tj poput ostalih spojeva neuroendokrinog sustava sudjeluje u dvosmjernoj regulacijskoj petlji sa imunim sustavom, a stanice imunološkog sustava na svojoj površini imaju receptore za hormon rasta. Hormon rasta aktivira makrofage na otpuštanje supraoksidnih aniona in vivo i in vitro, povećava proliferaciju limfoblastoidnih T limfocita u ljudi i pospješuje njihovu terminalnu diferencijaciju u efektorske stanice, te povećava odgovor na T-ovisni antigen (30). Hormon rasta povećava lektinom izazvanu proliferaciju i sintezu IL-2 in vivo, pospješuje aktivnost citotoksičnih T limfocita in vitro i sintezu protutijela, te odbacivanje kalema. Poznato je da



Slika 7. Shematski prikaz mehanizma otpuštanja hormona rasta iz hipofize (247)

je imunološka reakcija praćena i naglim neuro-endokrinim promjenama. Tako npr. injiciranje alogenih stanica limfatićkih ćvorova već nakon 2 sata dovodi do izrazitog porasta koncentracije LH u serumu odraslih miševa, a injiciranje ksenogenićnih eritrocita dovodi do promjena u koncentraciji hormona rasta, inzulina i tiroksina. Paralelno dolazi i do porasta koncentracije glukokortikoida, a ona je direktno proporcionalna intenzitetu imunološke reakcije. Koncentracije hormona rasta u serumu najveće su drugog dana imunološke reakcije, a ćetvrtog dana se normaliziraju.

Hormon rasta povećava velićinu timusa, u mlađih štakora osim toga pospješuje sintezu DNA, a u starijih obnavljanje tkiva, te povećava nivo timulina u ljudi i u pasa. Deficijencija hormona rasta izaziva atrofiju timusa, te bolest kržljanja u miševa i pasa. Ujedno se na imunoregulacijskoj razini uoćava smanjenje sinteze protutijela i agamaglobulinemija, odgođeno odbacivanje alotransplantata, smanjeni broj perifernih T i B limfocita, te smanjena NK-stanićna aktivnost u ljudi. Plazmatske koncentracije timulina se smanjuju u slućaju deficita hormona rasta. (206).

Poznato je da hormon rasta pospješuje eritropoezu i diferencijaciju neutrofila, te time utjeće i na hematopoezu.

Na razini stanice, hormon rasta djeluje na intermedijarni metabolizam pospješujući sintezu proteina, a zajedno sa inzulinom stimulira stanice da prime aminokiseline. Nasuprot inzulinu koći ulazak glukoze u stanice, te stimulira lipolizu. Nije toćno poznato kolika je njegova uloga u održavanju stalne koncentracije glukoze u krvi, ali se zna da hipoglikemija stimulira izlućivanje hormona rasta, a hiperglikemija ga suprimira.

Ućinak hormona rasta na stanice organizma jednim dijelom vrši se putem somatomedina.

### 2.2.2. IGF

Somatomedini ili ćimbenici rasta slićni inzulinu (engl. insulin-like growth factor - IGF) dva su polipeptida (IGF I i IGF II) ćija struktura pokazuje veliku slićnost s proinzulinskom. Uglavnom se sintetiziraju u jetri, ali i u mnogim drugim tkivima. U cirkulaciji se nalaze vezani za specifićne proteine (IGFBP), a funkcija im je da reguliraju rast i metabolizam, te diobu i diferencijaciju stanica (48).

Poznato je da IGF-I može mimikrijom prekriti učinak hormona rasta, ali se učinak hormona rasta ipak ne može u potpunosti zamijeniti sa IGF-I. Hormon rasta kontrolira proizvodnju IGF-I u jetri, a njegov učinak na sintezu u drugim tkivima mnogo je manji ili čak niti ne dolazi do izražaja. Za sintezu IGF-a odgovorni su i ostali čimbenici, poput dijete, a u nekim patološkim poremećajima i koncentracija drugih hormona (inzulin, estrogeni) (99), a ispitivanja su pokazala da to može biti i tireotropni hormon (115).

Postoje dva tipa receptora na ciljnim stanicama putem kojih somatomedini vrše svoju funkciju u organizmu. Tip 1 receptor može vezati IGF I, IGF II, a u visokim koncentracijama i inzulin. Sastoji se od dvije  $\alpha$  podjedinice (molekulska masa 135 k) i dvije  $\beta$  podjedinice (molekulska masa 95 k) koje su međusobno vezane disulfidnim mostovima. Zbog strukturnih i enzimskih sličnosti sa inzulinskim često putem njega inzulin ostvaruje svoje djelovanje, a poznato je da se IGF I može vezati na receptore za inzulin. Tip 2 receptor ima veći afinitet za vezanje IGF II, nego za IGF I, a inzulin ne veže, pokazuje sličnost s manosa-6-fosfatnim receptorom ovisnim o kationima, a točna funkcija mu nije poznata (48).

Somatomedini djeluju endokrino, parakrino i autokrino, upotpunjujući metaboličke učinke inzulina. Sličnost u učincima inzulina i somatomedina posljedica je kros-reakcija do kojih dolazi zbog strukturne sličnosti hormona, ali i njihovih receptora. Primarnu strukturu somatomedina odredili su Rinderknecht i Humbel (218). IGF I bazični protein koji je građen od 70 aminokiselina, medijator je rasta u postnatalnom životu, a IGF II neutralni je peptid građen od 67 aminokiselina, koji ima važnu ulogu u fetalnom razvoju. Određivanje redosljeda aminokiselina pokazalo je sličnost sa  $\alpha$ - i  $\beta$ -lancima proinzulina, a i pretpostavljena tercijarna struktura izuzetno je slična inzulinskoj, što je zapravo dokaz da ovi hormoni čine polipeptidnu obitelj koja je evoluirala iz zajedničkog ancestralnog gena.

Redosljed nukleotida cDNA pokazao je da se IGF I sintetizira i luči iz fibroblasta kao prohormon od 22 ili 25 aminokiselina sa karboksilnom skupinom na kraju. IGF II se također sintetizira kao prohormon sa jednim peptidnim lancem od 89 aminokiselina. Nasuprot inzulinu, ne postoji endokrina žlijezda ili stanice koje proizvode IGF I i IGF II, a ne postoje niti stanice koje sadrže zalihe somatomedina. Čini se da je intravaskularni prostor mjesto njihove pohrane, te je koncentracija u serumu mnogo veća nego lokalno. Smatra se da je većina serumskih IGF-a porijeklom iz jetre. Biološka uloga ovih somatomedina nije

sasvim poznata i predmet je brojnih istraživanja, ali se zna da je njihova ukupna koncentracija u krvi oko 700-800  $\mu\text{g/L}$  (100 nmol/L), što je oko 1000 puta više no koncentracija inzulina.

Oslobađanje IGF-a iz stanica ili organa u kojima je nastao uvijek je praćeno istovremenim otpuštanjem transportnog proteina molekulske mase oko 35 k. U biološkim tekućinama, pa i u krvi, IGF-I i IGF-II uvijek su reverzibilno vezani na visoko specifične transportne proteine (IGFBP), koji su sastavna komponenta IGF-a, te definiraju i koordiniraju učinke na ciljnim stanicama. Izolirano je i opisano šest različitih IGFBP za koje se zna da imaju vrlo specifičnu, iako još posve nerazjašnjenu ulogu. Ekspresija ovih molekula ovisi o tkivu u kojem su nastali, a kontroliraju je razvojni, hormonalni i nutritivni čimbenici, a osim toga se ove proteinske molekule mogu i posttranslacijski modificirati što onda utječe kako na samu strukturu i svojstva IGFBP-a, tako i na funkciju IGF-a (54). Ovi transportni proteini značajni su za poluvrijeme života IGF molekule, za dolazak do ciljne stanice i interakciju sa receptorima. Najznačajniji je IGFBP3 koji veže 80-95% IGF-a u krvi, tvoreći kompleks od oko 140 kDa, koji ne prolazi kroz kapilarni endotel, te sprečava inzulin-slične učinke IGF-a. Ova cirkulirajuća rezerva IGF-a može se u slučaju potrebe mobilizirati ograničenom proteolizom koju kataliziraju serin proteaze. Proizvodnju IGFBP3 stimulira hormon rasta. IGFBP1 je protein od 40 do 50 kDa, njegova koncentracija raste u slučaju deficita hormona rasta, sintetizira se u hepatocitima, a koncentracije u plazmi variraju ovisno o uzimanju obroka (198), što upućuje na činjenicu da regulira vezanje sa receptorima putem kojih IGF utječe na unos glukoze i aminokiselina u stanice. U cerebrospinalnoj tekućini najzastupljeniji je IGFBP molekulske mase oko 34 kDa (iako se nalazi i u serumu), a pokazuje veliki afinitet za vezanje IGF-II, dok svi ostali jednako vežu oba IGF-a.

Koncentracije IGF I u krvi rastu od rođenja do puberteta, a tada se smanjuju i ostaju stabilne. Koncentracije rastu u akromegaliji, a snižene su kod deficita hormona rasta, pothranjenosti, hipotiroidizma i bubrežnih bolesti. Budući da IGF II nema učinka na rast, njegovu sintezu ne kontrolira hormon rasta, te u akromegaliji njegove koncentracije u krvi ostaju nepromijenjene. Koncentracija IGF-a smanjena je u serumu bolesnika sa kroničnim oštećenjem funkcije jetre, a bazalno i potaknuto izlučivanje hormona rasta patološki je povećano u tih bolesnika (48).



U kliničkim ispitivanjima pokazano je da hormon rasta i IGF I imaju značajni terapijski učinak u liječenju raznih kataboličkih poremećaja, jer su povećali sintezu proteina i spriječili gubitak tjelesne mase (120). Anabolički učinak hormona rasta i IGF-a Grofte i sur. (94) pratili su pojedinačnom ili istovremenom primjenom hormona u štakora. Poslje saturacije alaninom izračunavali su sintezu ureje, određivali mRNA u jetri, katalitičku koncentraciju enzima ureja ciklusa i koncentraciju dušika u tkivu mišića, srca i bubrega. Zaključili su da i hormon rasta i IGF svaki posebno, ali mnogo intenzivnije u istovremenoj primjeni, smanjuju sintezu ureje, čime se pospješuje sinteza proteina u organima. Smatraju da je takav učinak posljedica smanjene translacije enzima ureja ciklusa, jer je koncentracija mRNA za enzime ureja ciklusa bila snižena nakon primjene hormona (94). U usporedbi sa inzulinom IGF ima zanemarivi učinak na hepatocyte i adipocyte. Ipak, prisustvo IGF-I receptora na mišićnim stanicama upućuje na to da IGF fiziološki utječe na unos glukoze i sintezu glikogena. Osim toga pokazano je da injiciranje IGF-I zdravim osobama kao i bolesnicima sa tipom I Diabetes mellitusa izaziva smanjenje koncentracije triglicerida i VLDL-a, kao i kolesterola i LDL-a, ali ne utječe na HDL, te da povećava osjetljivost na inzulin, što se sve može pripisati inhibirajućem učinku IGF-a na inzulin ili hormon rasta (27). Sve je više dokaza koji pokazuju da IGF-I ima važnu ulogu u CNS-u, gdje djeluje neuroprotektivno, te da bi mogao imati i značajni terapijski učinak u čitavom nizu oboljenja koja pogađaju nervni sustav (60).

### 2.2.3. Somatostatin

Somatostatin je inhibitor otpuštanja hormona rasta, otkriven u ekstraktu hipotalamusa štakora i ovce (144). Brazeau i sur. su ga 1973. god. izolirali u čistom obliku i utvrdili njegovu animokiselinsku strukturu (35).

Dosadašnja istraživanja o rasprostranjenosti somatostatina u organizmu imunocitokemijskim i radioimunološkim tehnikama, pokazala su da se somatostatin u većim količinama nalazi u mozgu. Dokazano je da se sintetizira u neuroendokrinim stanicama eminenciji medijani, periventrikularnom području hipotalamusa i u završecima živčanih niti stražnje hipofize (121). Nalazi se u stražnjim rogovima kralježične moždine, perivertebralnim ganglijima i živčanim završecima vlakana mijenteričkog i submukoznog

pleksusa gdje ima ulogu živčanog prijenosnika (141). Izvan živčanog sustava somatostatin je pronađen u pankreasu, crijevu, antrumu želuca, nadbubrežnoj i štitnoj žlijezdi, uterusu i placenti (25, 28, 67, 158).

Genetskim rekombinantnim tehnikama prekursor somatostatina pre-prosomatostatin, izoliran je u različitim tkivima (260). Slično kao i drugi peptidni prohormoni, pre-prosomatostatin se sintetizira u endoplazmatskom retikulumu neurona i epitelnih stanica, otkuda se transportira u Golgijev aparat, gdje se prevodi u prohormon prosomatostatin (235). Unutar sekrecijskih granula prosomatostatin se prerađuje u oblik somatostatin-14 i somatostatin-28. Preradom u granulama može nastati više različitih oblika somatostatina, različite molekulske mase, koji su funkcijski specifični za pojedina tkiva ili stanice (226). Sekrecijske granule stoga predstavljaju mjesto na kojem se preradom određuje funkcijski specifičan oblik somatostatina koji nastaje u pojedinim tkivima.

Utvrđeno je da se u organizmu somatostatin javlja u dva bioaktivna oblika, kao ciklički tetradekapeptid (S-14) i oktreetid (S-28), koji se osim po broju aminokiselina u polipeptidnom lancu i afinitetu vezanja za određene receptore razlikuju i po učinku. Oktreetid ima duži poluvijek života i pokazuje veliki afinitet za vezanje na SS1 receptore. S-14 koji ima cikličku strukturu jer su aminokiseline cisteina na trećem i četrnaestom mjestu u molekuli povezane s dva disulfidna mosta, prepoznaje SS1 i SS2 subpopulacije receptora (140) i ima mnogo veći afinitet za receptore hipotalamusa i kore nadbubrežne žlijezde. Upravo zato je S-14 snažni inhibitor otpuštanja glukagona (163), dok S-28 inhibira lučenje hormona rasta i inzulina te time utječe na apsorpciju u tankom crijevu (57). Smatra se osim toga da i raspored subpopulacija receptora može imati važan utjecaj na učinak somatostatina (116).

Posljednjih godina sintetizirano je više somatostatinskih analoga s različitim farmakokinetičkim i farmakobiološkim osobinama, a oni su omogućili i ispitivanja o različitim podtipovima receptora za somatostatin.

Djelovanje somatostatina je parakrino u gastrointestinalnom sustavu, neurokrino i neuroendokrino u mozgu, a u kralježničnoj moždini i autonomnom živčanom sustavu djeluje poput neurotransmitera.

Neka od somatostatinergičnih vlakana iz hipotalamusa projiciraju se kaudalno u područje moždanog debla i leđne moždine, gdje dolaze u kontakt sa senzoričkim vlaknima

leđne moždine, te s vlaknima somatostatinskih neurona sive supstancije leđne moždine. Somatostatin (osim u limbičkom sustavu) sudjeluje u modulaciji senzoričkih signala s periferije (141). Somatostatin iz vlakana neurona senzoričkih ganglija koja završavaju u stražnjem rogu leđne moždine dolazi u kontakt s lokalnim endorfinskim sustavom gdje sudjeluje u percepciji boli (155). Nedvojbenu ulogu u regulaciji senzoričke aktivnosti potvrđuju i nalazi somatostatina u slušnom živcu, retini i optičkom živcu kao i u drugim senzoričkim vlaknima koja se projiciraju s periferije na CNS, a koja prenose osjet boli, dodira i topline. Dio neurona autonomnog živčanog sustava, simpatikusa i parasimpatikusa također sadrže somatostatin (231). U različitim dijelovima moždane kore velikog i malog mozga somatostatin smanjuje spontanu i provociranu podražljivost neurona. Slične inhibicijske učinke na električnu aktivnost neurona somatostatin ispoljava i na piramidnim stanicama hipokampusa (56). Mehanizam djelovanja kojim somatostatin ispoljava navedene neurotransmitterske učinke širom CNS-a dobro je istražen. Somatostatinergične granule u nervnim završecima otpuštaju somatostatin nakon depolarizirajućeg električnog ili kemijskog impulsa. Izlučeni somatostatin se veže na receptore, te biva razgrađen djelovanjem odgovarajućih enzima (217, 114). Slično kao i u drugim neurotransmitterskim sustavima za otpuštanje somatostatina potrebno je prisustvo kalcija. Otpuštanje somatostatina izazivaju i tvari poput veratriodina koje otvaraju kanale za natrij (221).

Poznato je da djelujući kao hormon u CNS-u somatostatin osim bazičnog i potaknutog lučenja hormona rasta, inhibira i tireotropni hormon i prolaktin (255, 261, 7).

U stanicama pankreasa somatostatin se nalazi u nervnim završecima, te u D-stanicama Langerhansovih otočića (86), te se misli da je važan regulator njihove funkcije jer se somatostatinergične D-stanice nalaze u intimnom kontaktu sa inzulinskim B-stanicama, te glukagonskim A-stanicama, a ujedno je potvrđeno i postojanje somatostatinskih receptora na A, B i D-stanicama otočića (191). Lučenje somatostatina iz ovih stanica potiču glukagon, nedostatak inzulina, glukoza, acetil-kolin,  $\alpha_2$ -agonisti, neke aminokiseline, te gastrointestinalni peptidi. Izlučeni somatostatin djelujući parakrino na stanice gušterače koči otpuštanje inzulina, glukagona i pankreatičnih polipeptida, a autokrinim djelovanjem inhibira i izlučivanje somatostatina.

Čini se da svojim djelovanjem somatostatin spriječava nagli hipoglikemični učinak inzulina, ali on ipak posredno izaziva hipoglikemiju, jer se zbog potiskivanja lučenja



glukagona smanjuje glikogenoliza u jetri, pa nastaje manje nove glukoze. Osim toga somatostatin koči gušteračno lučenje bikarbonata, vode i enzima djelujući neposredno na stanice acinusa i kanalića i posredno inhibirajući lučenje sekretina.

Somatostatin sudjeluje i u regulaciji različitih fizioloških procesa u gastrointestinalnom traktu, gdje se nalazi u epitelnim, tzv. D-stanicama (200, 150), a posebno u antrumu želuca, te u kriptama crijeva. Inhibira egzogenu sekreciju u želucu, tankom crijevu i gušterači, djeluje na motilitet želuca, tankog crijeva i žučnog mjehura, smanjuje intestinalnu reapsorpciju vodu i gotovo svih nutritivnih spojeva, inhibira proliferaciju stanica mukoze želuca, te sudjeluje u negativnoj povratnoj sprezi lučenja gastrina i gastrinom potaknute sekrecije klorovodične kiseline (250). Schusdziarra i sur. (232) opisali su jednostavnom rečenicom značaj svih tih djelovanja somatostatina: "Somatostatin u gastrointestinalnom traktu najvjerojatnije regulira brzinu i dinamiku kojom različite nutritivne supstance ulaze u cirkulaciju."

Budući je dokazano prisustvo somatostatina u primarnim i sekundarnim limfatičkim organima (80), u novije vrijeme intenzivno se istražuje njegova uloga u regulacijskoj petlji koja postoji između neuroendokrinog i imunološkog sustava. Pokazano je naime da s jedne strane citokini i peptidi nastali tijekom upalne ili specifične imunološke reakcije mogu modulirati lučenje somatostatina, npr. IL-1 (231) i IFN (92) mogu stimulirati otpuštanje somatostatina iz primarne kulture štakorskih diencefaličkih stanica, eminencije medijane i hipotalamusa (92), a sa druge strane somatostatin pokazuje imunomodulacijske učinke na izravan i neizravan način.

Pronalazak somatostatinergičnih nervnih vlakana (75), te neuroendokrinih stanica (80) u limfatičkim tkivima, kao i receptora za somatostatin na različitim tipovima stanica limfatičkog sustava (89), govori u prilog izravne strukturne i funkcijske povezanosti somatostatina i limfatičkog sustava.

Humani mononuklearni leukociti imaju oko 300-500 somatostatinskih receptora po stanici (26), a receptori za somatostatin pronađeni na površini B i T limfocita slični su onima na neuroendokrinim stanicama. Podaci dobiveni protočnom citometrijom s dvojnim bojenjem limfocita, pokazuju da supresijski limfociti u većoj mjeri vežu somatostatin nego pomoćnički, ali je ipak najviše receptora pronađeno na B limfocitima (239). Zanimljivo je da

limfociti Peyerovih ploča imaju više receptora za somatostatin, no limfociti periferne krvi i slezene (239).

Dosadašnji podaci pokazuju da somatostatin kao i drugi neuropeptidi (VIP, supstancija P) mogu regulirati različite tipove imunološke reakcije, a osobito reakcije rane preosjetljivosti, akutnu i kroničnu upalu i sl. (89). Somatostatin izaziva naglo oslobađanje histamina iz mastocita vezivnog tkiva u štakora, ali u nanomolarnim dozama suprimira IgE posredovano oslobađanje histamina i leukotriena D4 iz humanih bazofila (195). Na limfocitne funkcije somatostatin pokazuje uglavnom imunosupresijske učinke. Inhibira proliferaciju Molt-4 limfoblasta (194), lektinima potaknutu proliferaciju limfocita T (239) i endotoksinima izazvanu leukocitozu (199), a djelujući na limfocite B, sintezu IgA i IgM, ali ne i sintezu IgG u Payerovim pločama u tankom crijevu (239). Somatostatin inhibira i protutumorsko citotoksično djelovanje makrofaga (3), a u in vitro pokusima inhibira i lučenje IFN- $\gamma$  (174).

Tijekom 1983.god. znanstvenici Zavoda za fiziologiju i imunologiju među prvima su izvijestili o imunosupresivnom djelovanju somatostatina in vivo na limfatičke funkcije i morfostazu (205, 203, 210). Ispitivanja in vivo i in vitro pokazala su da somatostatin inhibira stvaranje hemolitičkih čistina u reakciji humoralne imunosti, te da djeluje i na staničnu imunost suprimirajući reaktivnost polusrodnih limfocita u GVHR (204). Somatostatin je in vitro nakon stimulacije limfocita lektinom PHA djelovao izrazito antiproliferacijski (202).

Zbog široke rasprostranjenosti somatostatina u nervnom i probavnom sustavu i različitih gore opisanih fizioloških funkcija, ispitivale su se mogućnosti korištenja nativnog somatostatina kao terapijskog sredstva u čitavom nizu oboljenja. Otkrićem Sandostatina (oktreotid, Sandoz LTD) sintetičkog analoga prirodnog hormona, izbjegli su se problemi kratkog poluvijeka života hormona, te su se povećale mogućnosti njegove kliničke primjene. Sandostatin je pokazao obećavajuće rezultate u liječenju tumora koji luče hormon rasta ili tireotropin i sl. (karcinoidi, inzulinomi, gastrinomi), ali i čitavog niza ostalih bolesti (101).

### 3. Bakterijski imunomodulatori - peptidoglikan monomeri (PGM)

Imunomodulatori su spojevi koji imaju sposobnost mijenjanja imunogeničnih svojstava antigenih preparata ili vakcina. To su spojevi različitog porijekla koji utječu na imunološku reakciju različitim mehanizmima, tako da potiču lučenje nekih medijatora ili utječu na funkciju pojedinih subpopulacija imunih stanica.

Osim značajnog doprinosa u znanstvenim ispitivanjima tijekom imunoloških zbivanja, imunomodulatori su od posebnog značaja i za kliničku i laboratorijsku primjenu, jer se neki od njih koriste u humanim vakcinama. Upravo zbog te primjene u kliničkoj praksi, ispitivanje značajki imunomodulatora zahtijeva iscrpan i detaljan pristup, jer male promjene u kemijskoj strukturi izazivaju velike promjene u aktivnosti. Nepravilno doziranje može poništiti imunostimulacijsko djelovanje spoja, pa ga čak učiniti i imunosupresivnim.

Imunomodulatori potenciraju imunološki odgovor mijenjajući smještaj antigena, poboljšavajući prezentaciju antigena (povećavaju broj antigena MHC II na antigen prezentirajućim stanicama), te aktivacijom pojedinih subpopulacija T-limfocita (14).

Mikroorganizmi, posebno bakterije izvor su brojnih imunomodulirajućih tvari. U zadnjem desetljeću posebno se istražuju dva imunomodulatora bakterijskog porijekla: LPS i mikobakterija. LPS se pokazao kao jedan od najaktivnijih stimulatora, ali njegova visoka toksičnost ne dozvoljava kliničku upotrebu. Brojni autori zato pokušavaju sintetizirati niskotoksične analoge LPS koji još zadržavaju imunostimulacijske osobine (16). Istraživanja su dosegla vrhunac kada su Lederer i sur. (1) istovremeno kada i grupa autora pod vodstvom Kotanija (134, 136) pronašli da je muramil dipeptid (MDP) najmanja, biološki aktivna podjedinica lipopolisaharidnog zida Gram negativnih bakterija koja može zamijeniti mikobakteriju. Od tada je sintetizirano nekoliko stotina derivata MPD-a, čiji je kemijski naziv N-Acetylmuramil-L-alanil-D-izoglutamin, a koji su pokazali mnoge zanimljive imunološke aktivnosti (134, 152, 153, 37).

Usljedile su brojne studije imunofarmakoloških aktivnosti bakterijskog staničnog zida ili peptidoglikanskih (PG) dijelova. Pokušalo se rasvijetliti koja je fiziološka i patološka uloga staničnog zida u interakcijama domaćina i parazitarnih bakterija. Studije su pokazale da peptidoglikani (koji su normalno prisutni u živim bakterijama ali i u njihovim ostacima) imaju izuzetno širok spektar bioloških aktivnosti i da je za većinu tih aktivnosti odgovoran

MDP (135). Peptidoglikan i MPD nisu normalni sastojci tkiva sisavaca, ali su u svim kralješnjacima prisutni u ogromnim količinama, pa čak i u životinja koje nisu izložene djelovanju bakterija (germ-free životinje), jer njihova hrana sadrži mrtve bakterije. Postoji hipoteza da organizam može upotrebljavati MPD kao biološke medijatore, analoge endogenih produkata, koje onda ne mora sam sintetizirati (47), a koji zbog svoje sličnosti s endogenim produktima za svoje djelovanje koriste već postojeće receptore na ciljnom tkivu. Neke imunološke aktivnosti MPD-a mogu se vjerovatno i objasniti upravo biološkom sličnošću, tj. mimikrijom s endogenim produktima (poput mimikrije prisutne između morfina i endorfina).

Biološki aktivnu supstancu PGM izolirali su i kemijski dobili Keglević i sur. (125, 126). To je sintetski analog MPD-a s imunomodulatornim svojstvima proizveden u tvornici lijekova "Pliva" Zagreb. Sva ispitivanja aktivnosti ovog spoja zaštićena su patentom (Jug. pat. 35040).

PGM je dobiven lizozimskom digestijom neukrštenih peptidoglikanskih lanaca izoliranih iz tekuće kulture *Brevibacterium divaricatum* NRRL-23, koja je prethodno bila tretirana s penicilinom kako bi se odstranili endotoksični spojevi (230). Sadržaj endotoksina u supernatantu manji je od 0,015 ng/kg, tako da u imunostimulacijskim dozama nisu zabilježeni toksični i pirogeni učinci. Kemijska struktura PGM-a je GlcNAc-Mur-NAc-L-Ala-D-iso-Gln-mezo-DAP-D-Ala-D-Ala. Djelovanje PGM ostvaruje putem manje molekule, kemijski definirane kao MDP. U odnosu na MDP, PGM sadrži dodatno još jedan šećer (N-acetilglukozamin) i tri aminokiseline (dvije molekule D-alanina i mezo-diaminopimeličnu kiselinu), a kako je topiv u vodi, pogodan je za upotrebu. Za razliku od njega, MPD se mora davati kao suspenzija u ulju ili inkorporiran u liposomima (179).

Osim PGM-a, u Plivi su sintetizirali i analoge u kojima je PGM vezan na pojedine metale (Cu, Zn, Ni, Cd). Njihova sinteza je također zaštićena patentom (Jug. pat. prijava P-1982/86; Eur. Pat. Appl. EP 268271), kao i sinteza N-acil derivata (Jug. pat. prijava P 626/89; Eur. pat. Appl. EP 390093).

Mehanizam djelovanja PGM-a nije još potpuno razjašnjem (110). Kao mogući mehanizmi spominju se poliklonska aktivacija B limfocita i aktivacija T limfocita ili makrofaga (157).



Biološke aktivnosti PGM-a i MDP-a koje su otkrivene u brojnim in vivo i in vitro istraživanjima pregledno su prikazane u tablici 6 (134).

PGM pojačava stvaranje PFC na heterologne antigene (OE) u slezeni normalnih imunokompetentnih miševa kojima se PGM daje intravenski (111). PFC odgovor je značajno stimuliran u širokom rasponu doza (25-160 µg po životinji), a prisutan je u miševa imuniziranih s optimalnim kao i suboptimalnim dozama antigena (OE). Veličina imunostimulacije ovisi jedino o vremenu primjene. PGM je učinkovit i kad se daje prije i poslje antigena, a maksimalna stimulacija uočena je kada se injicira jedan ili dva dana nakon antigena (111). Tu se uočava razlika ovog produkta razgradnje bakterijskog staničnog zida od čitave bakterije koja pokazuje najveći imunomodulatorni učinak ako se daje prije antigena, što sugerira da PGM i čitave bakterije imaju različit mehanizam imunomodulatornog djelovanja. Bakterija treba prvo biti fagocitirana, a za to treba vremena, dok aktivni dijelovi bakterijskog staničnog zida s nižom molekulskom masom vjerovatno djeluju izravno na stanice imunološkog sustava (111). Stimulacija humoralnog odgovora tek treći dan nakon imunizacije i primjene PGM-a govori da pojačani odgovor nije rezultat umnožavanja stanica, odnosno pokazuje da PGM ne djeluje kao mitogen. Porast broja PFC nakon primjene PGM-a rezultat je ili povećane aktivnosti stanica koje proizvode protutijela ili pritjecanja vanspleničnih PFC u slezenu (111).

In vitro, u četverodnevnoj kulturi splenocita PGM nije stimulirao stvaranje PFC, tako da poticanje humoralnog odgovora uključuje vjerovatno više od običnog kontakta imunokompetentnih stanica s PGM (111, 170). Drugi autori opisuju povećano stvaranje PFC na OE u sličnim in vitro pokusima (238). Razlog za to treba tražiti u malim biokemijskim razlikama u sastavu peptidoglikana (15).

Imunomodulatorno djelovanje PGM-a nije ovisno o dozi kada se jednom dostigne aktivni raspon doza, tako da se to opisuje kao fenomen "sve ili ništa" (111). Izgleda da samo ograničeni broj stanica može biti aktiviran s PGM-om, a taj ograničeni stimulacijski potencijal PGM-a dokazuje i nalaz da je imunostimulacija ista u miševa imuniziranih sa optimalnom ili s jako niskom dozom antigena (111). Takve rezultate su dobili i drugi autori (46).

Imunomodulatorni učinak uključuje i topive antigene kao npr. ovalalbumin (46), ali i puno kompleksnije kao što su OE (111). Slična stimulacija humoralnog odgovora uočena je

Tablica 6. Biološke aktivnosti peptidoglikana i muramil peptida (134)

(IN VIVO TESTOVI)

|  |   |
|--|---|
| Modulacija specifičnog imunološkog odgovora          | Potenciranje ili supresija humoralnog imunološkog odgovora<br>Indukcija stanicamaposredovanog imunog odgovora   |
| Poticanje prirodnih obrambenih mehanizama            | Povećanje proliferacije progenitorskih stanica koštane srži<br>Tranzitna leukopenija i prateća leukocitoza<br>Indukcija aktivacije makrofaga<br>Povećanje NK aktivnosti<br>Porast otpornosti na bakterijske infekcije i razvoj tumora   |
| Indukcija alergičnih autoimunih i srodnih poremećaja | Eksperimentalni alergijski encefalomijelitis<br>Uveorinitis i ostale upale uz odgovarajući antigen<br>Akutni i kronični poliartritis bez egzogenog antigena<br>Indukcija rekurentnih multinodularnih kožnih lezija<br>Indukcija sekundarne amiloidoze pomoću amiloidnog pojačavajućeg čimbenika |
| Neurofarmakološke aktivnosti                         | Pirogeni učinak<br>Somnogeni učinak<br>Učinci kao serotoninergički parcijalni agonisti  |
| Ostalo   | Izazivanje hemoragijske nekroze na mjestu injiciranja<br>Stvaranje epitelioidnih granuloma<br>Učinci udruženi sa LPS-om (indukcija anafilktičkog šoka, porast letaliteta, protutumorski učinak, indukcija interferona pomoću LPS, povećanje vaskularnog permeabiliteta)                         |

(IN VITRO TESTOVI)

|   |   |
|---|---|
| Stimulacija stanica monocitno-makrofagnog sustava                 | Stimulacija kemotaksije i diferencijacije, porast adherencije i širenja po površini, Supresija DNA sinteze, porast primitka glukozamina<br>stimulacija oslobađanja lizozimskih enzima i produkcije monokina, povećanje oslobađanja superoksida, indukcija citotoksičnosti i citostatske aktivnosti na tumorske stanice, modulacija fagocitoze |
| Stimulacija B stanica   | Stimulacija mitogeneze, aktivacija ili inhibicija mitogenom inducirane aktivacije i antigen-specifičnog stvaranja antitijela, motivacija aktivnosti ovisnih o T pomoćničkim stanicama   |
| Stimulacija T stanica   | Stimulacija diferencijacije, povećanje pomoćničke funkcije, indukcija citotoksičnih efektorskih stanica   |
| Stimulacija ostalih stanica                                       | Aktivacija NK aktivnosti, povećanje fagocitoze neutrofila, porast unosa histidina i oslobađanja histamina   |
| Učinci na trombocite i fibroblaste<br>Osteoklaste                 | Liza i oslobađanje serotonina, povećanje proliferacije, stimulacija faktora sličnog IL-1, povećana koštana resorpcija   |
| Aktivacija komplementarne kaskade alternativnim i klasičnim putem |   |



i kod primjene ostalih PG analoga ili sintetskog MPD-a (152). Ipak ovisno o tipu antigena (a ne samo o vremenu primjene PGM-a u odnosu na antigen) mijenja se i intenzitet in vivo primarnog humoralnog odgovora. U miševa imuniziranih s virusom, proizvodnja protutijela je bila stimulirana jedino ako se PGM primjenio nakon antigena, a nakon imunizacije miševa sa *Salmonellom typhimurium* nije se opazio stimulacijski učinak PGM-a. Hipotezu da je to zbog toga što bakterijski produkt (PGM) ne bi mogao stimulirati imunološku reaktivnost na bakterijske antigene (108), nisu potvrdili drugi autori. Oni su pokazali da miševi tretirani sa sintetskim peptidoglikanom-MDP imaju povećanu otpornost na infekciju s *Klebsiella pneumoniae* (45). Smatra se da PGM ne pokazuje učinak kod infekcije *Salmonellom typhimurium* zbog toga što je to ubikvitarna bakterija, pa se ne bi radilo o primarnom, već o sekundarnom odgovoru, u kojem PGM ne bi mogao povećavati ionako maksimalni odgovor na infekciju (108).

PGM je stimulirao produkciju protutijela na antigene "New Castle disease virusa" (108), kao i na virus gripe (14), što je osobito zanimljivo za kliničku praksu.

Osim stimulacije humoralnog imunološkog odgovora, ako se primjeni intravenski, u točno određeno vrijeme PGM djeluje i na staničnu imunost (108). Dodatna ispitivanja su pokazala da je i u staničnom imunitetu, kao i u humoralnom aktivni dio molekule PGM-a zapravo pentapeptid, koji nastaje raspadom PGM-a nakon intravenskog davanja. Disaharid, drugi dio molekule PGM-a ostaje pri tome inaktivan (112).

Ispitivanja mitogene aktivnosti PGM-a u kratkotrajnim kulturama stanica mišjeg limfnog čvora s različitim dozama PGM potvrdila su hipotezu da PGM nije mitogen, odnosno da slabu mitogenu aktivnost pokazuje samo u određenoj dozi (1 µg), dok u ostalim dozama čak i suprimira stimulacijski učinak PHA i ConA (110).

Koristeći indirektan test s rozetama Hršak i sur. (107) pokušali su otkriti primarne ciljne stanice za peptidoglikane, te su pokazali da se PGM prvenstveno veže za makrofage, a jako malo ili se uopće ne veže za T limfocite.

Učinak PGM-a na B limfocite i T pomoćničke stanice izuzetno je važan u ispitivanjima učinka PGM-a na reakciju kasne preosjetljivosti izazvane sa 6-aminopeniciliničnom kiselinom (253).

Stimulirajući učinak PGM-a na aktivnost lokalnih plućnih makrofaga pokazan je u radu tijekom kojega su autori ispitivali sposobnost PGM-a da in vivo smanji lokalni rast i

inhibira stvaranje induciranih i spontanih metastaza kod B-16 melanoma miševa C57BI/H (109). Iako ne produžava značajno vrijeme preživljavanja, davanje 1 mg PGM-a treći i sedmi dan nakon tumorske inokulacije inhibira rast metastaza u plućima do 50% kontrolne vrijednosti. In vitro PGM ne mijenja brzinu rasta B-16 melanomskih staničnih kultura, pa se pretpostavlja da PGM ne inaktivira i ne ubija tumorske stanice direktno. Uočeno je da u ovom ispitivanju PGM stimulira plućne, a ne makrofage jetre i slezene, vjerovatno zato što su pluća kao prvo kapilarno korito izložena najvećem dijelu nepromijenjenog PGM-a. Moguće je nadalje da su osim makrofaga i NK stanice ciljne stanice za PGM, odnosno da se mehanizam djelovanja PGM-a odvija aktivacijom NK stanica.

Učinak PGM-a na rast tumora i širenje metastaza općenito predmet je mnogobrojnih istraživanja, zbog toga što otvara velike mogućnosti kliničke primjene PGM-a (109,81). Pri tome se naravno otkrivaju i različiti mehanizmi djelovanja PGM-a.

U novije vrijeme istražuje se i mogućnost primjene PGM-a u sintezi vakcina. Za sada je dokazano da je PGM djelotvoran kao komponenta antituberkulozne vakcine. Pretpostavlja se da bi se mehanizam djelovanja vjerovatno odvijao stimulacijom oslobađanja TNF i IFN- $\gamma$  iz aktiviranih makrofaga u pleuralnoj šupljini kod TBC pleuritisa (18).

Uočeno je da PGM pokazuje različite učinke na imunološki status normalnih imunokompetentnih i imunokompromitiranih domaćina, kojima je imunološka reaktivnost potisnuta bilo usljed tumorskog rasta ili nekih drugih razloga.

Primjena PGM-a neposredno nakon davanja antigena reducira imunosupresiju nastalu usljed halotanske anestezije, a snažno potiče humoralnu reaktivnost u imunosuprimiranim stanjima izazvanim s halotanskom anestezijom i operativnim zahvatom. Visoke doze PGM-a su međutim izazvale imunosupresivni učinak čak i u anesteziranih i neanesteziranih miševa. Halotanom induciranu imunosupresiju humoralnog odgovora PGM samo djelomično popravlja, a metalni kompleks PGM-a sa Zn ili s Na-soli linolenske kiseline stimulira humoralni odgovor iznad nesuprimirane kontrolne razine (214). U svim pokusima primjećeno je povećanje nukleinskih kiselina i proteina u jetri nakon primjene ovih supstancija što govori o njihovom zaštitnom djelovanju.

Hepatoprotektivan učinak uočen je i u djelovanju MPD-a i to u nekoliko različitih in vivo (viabilnost hepatocita) i in vitro (mjerenje aktivnosti staničnih enzima) pokusa. Ovaj učinak ovisan je o dozi i strukturi MPD analoga, a potenciran je injiciranjem MDP in vivo

(71). Histokemijski i biokemijski nalazi govore da je zaštitno djelovanje povezano s aktivnošću MDP-a na staničnoj membrani hepatocita. MDP utječe na proteinsku sintezu hepatocita posredovanu Kupfferovim stanicama, ali ne utječe na proteinsku sintezu samih hepatocita (262). Hepatoprotektivan učinak MPD-a i jednog derivata - murametida uočen je i u mišjem virusnom hepatitisu (166).

Novi, nedavno sintetizirani analog PGM-a i Zn je već u dosadašnjim pokusima pokazao bolja imunostimulacijska svojstva od samog PGM-a, a važnost samog Zn za razvoj i održavanje imunološkog sustava kao i za homeostazu organizma, u posljednje vrijeme sve se više ističe i dokazuje u nizu istraživanja (211).

4.1

4.2

4.3

4.4

4.5

4.6

4.7

4.8

4.9

4.10

4.11

4.12

4.13

4.14

4.15

4.16

4.17

## MATERIJAL I METODE

4.18

4.19

4.20

#### 4. Pokusne životinje

U eksperimentalnom radu koristili smo soj BALB/c (H-2<sup>d</sup>) miševa uzgojenih u vlastitoj uzgojnoj koloniji u vivariju Medicinskog fakulteta u Rijeci. U pokus smo uzimali mužjake u dobi od 2,5 do 3 mjeseca, sa sličnim tjelesnim masama. Koristili smo i soj CBA miševa, te hibride F1 generacije BALB/c x CBA, također iz vlastite uzgojne kolonije. Životinje su držane u standardnim laboratorijskim uvjetima temperature i vlage, uz dnevnu izmjenu svjetla i tame u prirodnom ritmu. Hranjene su standardnim keksima za laboratorijske životinje (Biotehnički fakultet, Domžale) i običnom vodom "ad libitum". Sve zahvate na životinjama obavljali smo uz opću inhalacijsku etersku narkozu (Aether ad narcosin, Lek).

Tijekom ispitivanja u kontrolnim i ispitivanim skupinama imali smo pet životinja, osim u nekim pokusima, kada je broj životinja posebno naznačen.

#### 5. Materijali i reagensi

##### 5.1. Monoklonska protutijela

Monoklonska protutijela (MoAb) koja smo koristili u in vivo pokusima u svrhu delecije pojedinih limfocitnih subpopulacija priređena su iz ascitesa štakora (LOU x DA) F1 uzgojenih na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci i to tako da su izolirana iz nadtaloga uzgoja hibridomskih linija. Korištene su dvije vrste monoklonskih protutijela:

- a) YTS 191.1. štakorsko anti-mišje protutijelo IgG 2b izotipa na mišju CD4 molekulu
- b) YTS 169.4. štakorsko IgG 2b protutijelo na mišju CD8 molekulu

Nakon precipitacije monoklonskih protutijela iz ascitesa ili supernatanta kulture tkiva amonijevim sulfatom i njihove dijalize, pripravili smo "stock" otopine monoklonskih protutijela u kojima smo odredili koncentraciju štakorskih IgG metodom radijalne imunodifuzije koristeći štakorske i mišje IgG standarde (Serotec, Oxford, England).

## **5.2. Peptidoglikan monomer**

Kao imunomodulacijska sredstva koristili smo u radu peptidoglikan monomer (PGM) i njegove komplekse s bivalentnim kationima - PGMZn, PGMCo, PGMNi, PGMCd, PGMCu, PGMHg ("Pliva" - Zagreb).

## **5.3. Hormoni**

Somatostatin koji smo koristili u svim pokusima bio je somatostatinski analog SMS 201-995 (Sandostatin, Sandoz AG, Basel, Switzerland).

Kao hormon rasta koristili smo ljudski somatotropin - Crescormon 2156 (Kabi Vitrum, Stocholm, Švedska).

IGF korišten u pokusima donacija je firme KABI (Švedska).

## **5.4. Reagensi za određivanje sadržaja nukleinskih kiselina u jetri**

### **5.4.1. Izolacija nukleinskih kiselina**

Izolaciju nukleinskih kiselina proveli smo metodom po Marmour-u (165).

1. Otopina za homogenizaciju tkiva jetre sastojala se od otopine NaCl (0,15 mol/l); otopine Na-citrat (0,015 mol/l) i otopine Na-dodecil sulfata (4%) u omjeru 1:1:1
2. Otopina NaCl (5 mol/l)
3. Otopina kloroform:izoamilni alkohol u omjeru 24:1
4. Otopina HClO<sub>4</sub> u koncentracijama 0,5 mol/l i 0,25 mol/l

### **5.4.2. Određivanje sadržaja DNA**

Za određivanje sadržaja DNA koristili smo metodu sa difenilaminom (40)

1. Otopina HClO<sub>4</sub> (0,5 mol/l)



2. Otopina difenilnog reagensa: 1g difenilamina otopili smo u 100 ml ledene octene kiseline te oprezno dodali 2,5 ml konc.  $H_2SO_4$ . Reagens smo pripremili neposredno prije upotrebe.
3. DNA iz timusa koristili smo za pripremu standarda za izradu standardne krivulje za kolorimetrijsko određivanje DNA

#### 5.4.3. *Određivanje sadržaja RNA*

Određivanje sadržaja RNA izvršili smo metodom s orcinolom (169)

1. Trikloroctena kiselina 5%-tna
2. Otopina orcinol reagensa: 100 mg  $FeCl_3 \times 6H_2O$  otopili smo u 100 ml konc. HCl i dodali 3,5 ml 6%-tne etanolne otopine orcinola
3. RNA iz kvasca koristili smo za pripremu standarda za izradu standardne krivulje za kolorimetrijsko određivanje RNA

#### 5.5. *Reagensi za određivanje sadržaja proteina u jetri*

Određivanje koncentracije proteina izvršili smo u homogenatu tkiva jetre metodom po Lowry-u (156), koju smo modificirali po Hatree-u (102), koristeći pri tome:

1. Otopina A: 2 g kalij-natrij tartarata i 100g  $Na_2CO_3$  otopili smo u 500 ml otopine NaOH (1 mol/l) i nadopunili sa redestiliranom vodom do 1000 ml.
2. Otopina B: 2 g kalij-natrij tartarata i 1 g  $CuSO_4 \times 5 H_2O$  otopili smo u 90 ml redestilirane vode i dodali 10 ml otopine NaOH (1 mol/l)
3. Otopina C: otopina Folin-Ciocalteuovog reagensa (Kemika, Zagreb) razrijedili smo sa redestiliranom vodom do pH 10. Otopinu smo pripremali neposredno prije analize.
4. Goveđi serum albumin (engl. bovine serum albumin, BSA), pulv. Pentex - BV 0262 (Fluca AG, Buchs) koristili smo za pripremu standarda za izradu standardne krivulje za kolorimetrijsko određivanje proteina.

## 6. Opći plan pokusa

Cilj istraživanja opisanih u ovom radu bio je ispitati metaboličke promjene u jetri tijekom imunološke reakcije, a te promjene smo pratili na dvije razine; određivanjem nukleinskih kiselina i proteina u jetri i mjerenjem biokemijskih sastojaka u serumu. U planu pokusa predvidjeli smo i ispitivanje metaboličkih promjena tijekom modificirane imunološke reakcije, sa ciljem da utvrdimo načine i mehanizme kojima je jetra uključena u ova zbivanja.

Modifikaciju imunoloških reakcija izveli smo:

- a) deplecijom pojedinih limfocitnih subpopulacija *in vivo*
- b) djelovanjem halotanske anestezije, te primjenom PGM-a kao imunomodulatora
- c) primjenom hormona

Detaljni planovi pokusa prikazani su na slikama od 8 do 13.

## 7. Indukcija imunološke reakcije

### 7.1. *Imunološka reakcija humoralnog tipa*

Indukciju imunološke reakcije humoralnog tipa izvršili smo intraperitonealnim injiciranjem 0,2 ml 10%-tne suspenzije OE u fiziološkoj otopini (Veterinarski zavod Rijeka), dok su kontrolne skupine primale istu količinu fiziološke otopine.

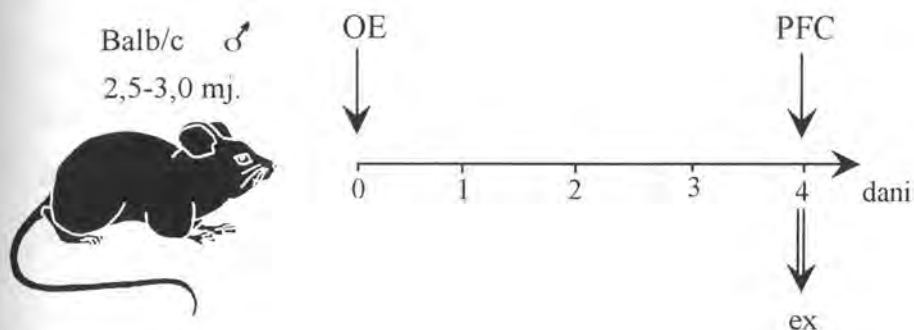
### 7.2. *Imunološka reakcija staničnog tipa*

Imunološka reakcija staničnog tipa bila je lokalna GVHR. Donatori splenocita bili su miševi čistog soja CBA. Životinje smo žrtvovali cervikalnom dislokacijom, te izvađene slezene propasirali kroz najlonske mrežice u puferiranoj fiziološkoj otopini (PBS). U dobijenoj suspenziji eritrocite smo razorili tris-amonij-kloridom, splenocite isprali tri puta u PBS-u, te nakon brojanja u hemocitometrijskoj komorici, podesili im broj na pet milijuna u 50  $\mu$ l PBS-a. Ovako pripremljenu suspenziju (50  $\mu$ l) injicirali smo u jastučić stražnje šapice primaoca F1 hibrida (ženke CBA x A/J).

## PLAN POKUSA 1

### 1. IMUNOLOŠKA REAKCIJA

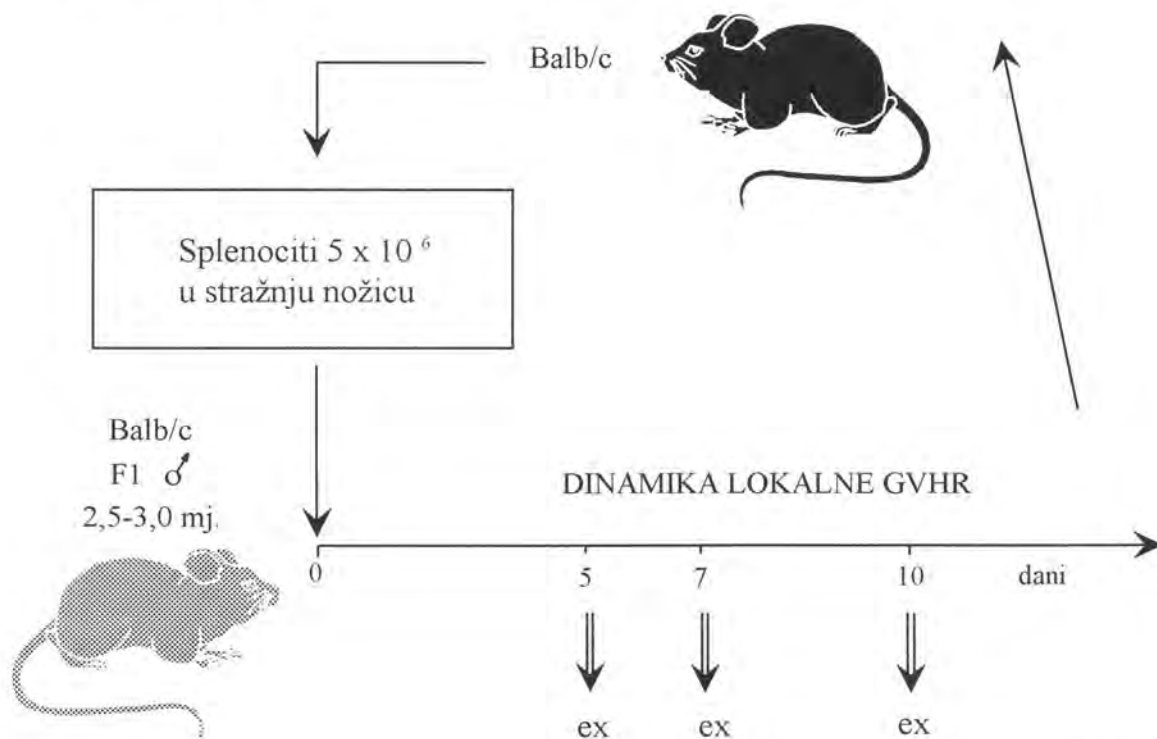
#### a) HUMORALNOG TIPa



1. Određivanje nukleinskih kiselina i proteina u jetri

2. Određivanje biokemijskih sastojaka u serumu: ukupni proteini, albumini, ureja, glukoza, kreatinin, Ca, P, AST, ALT, AP

#### a) STANIČNOG TIPa



Slika 8

## **8. Modifikacije imunološke reakcije**

### **8.1. Depletiranje T-limfocitnih subpopulacija in vivo**

Selektivnu depleciju pojedinih limfocitnih populacija izveli smo primjenom odgovarajućeg protutijela 48 i 24 sata prije indukcije humoralnog imunološkog odgovora. Doza protutijela od 100  $\mu$ l (1 mg protutijela) za in vivo primjenu bila je injicirana intraperitonealno ili intravenski. Učinkovitost deplecije provjerili smo metodom direktne ili indirektno imunofluorescencije na protočnom citometru (Becton-Dickenson, USA)

### **8.2. Izazivanje imunosupresije halotanskom anestezijom**

Za uvođenje i održavanje halotanske anestezije u miševa koristili smo metabolički kavez (Ugo Basile - Milano), volumena 1 L u kojem su bile smještene životinje. Uz pomoć respiratora za male životinje u kavez je upuhivan zrak (protok 350 ml/min) s primjesom halotana, da bi konačna koncentracija anestetika iznosila 0,5 -1 %. Ekspirirani CO<sub>2</sub> se kemijski vezivao natronskim vapnom koje se nalazilo u metaboličkom kavezu.

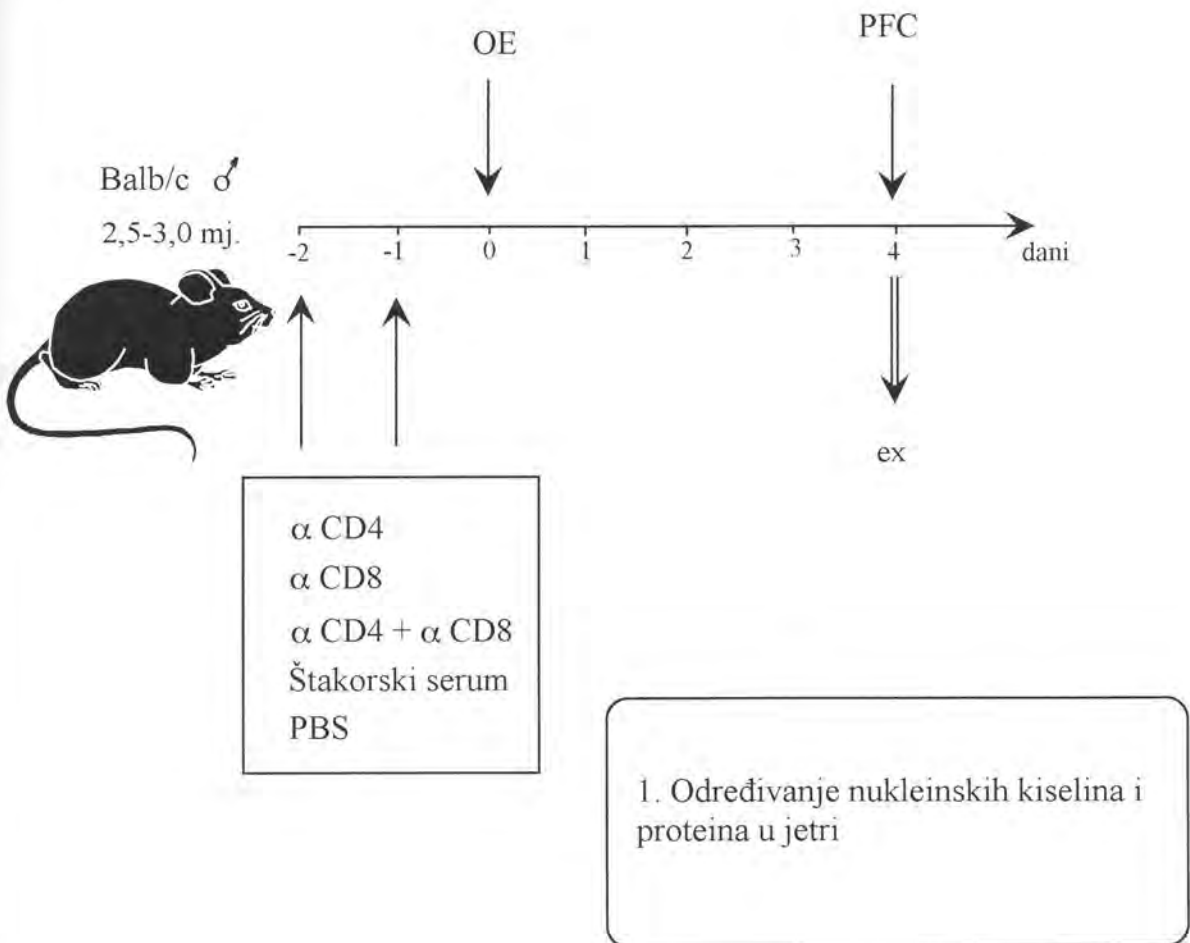
Narkozu smo neprekidno održavali 1 sat. U kontrolnim skupinama životinje su bile podvrgnute istom postupku, ali su udisale zrak bez halotana.

### **8.3. Imunostimulacija primjenom peptidoglikan monomera**

PGM i njegove komplekse s bivalentnim kationima - PGMZn, PGMC<sub>o</sub>, PGMNi, PGMCd, PGMCu, PGMHg koristili smo kao imunomodulacijska sredstva. Djelovanje PGM-a testirali smo u tri različite doze (100, 50 ili 10 mg/kg tjelesne mase), a injicirali smo ga otopljenog u 0,5 ml PBS-a intravenski ili intraperitonealno. Kontrolne skupine dobivale su isti volumen PBS-a, također intraperitonealno. U testovima za ispitivanje humoralne imunosti životinje bi jednokratno po senzibilizaciji dobile PGM ili njegove analoge i nakon toga bi jedan sat bile podvrgnute halotanskoj anesteziji.

## PLAN POKUSA 2

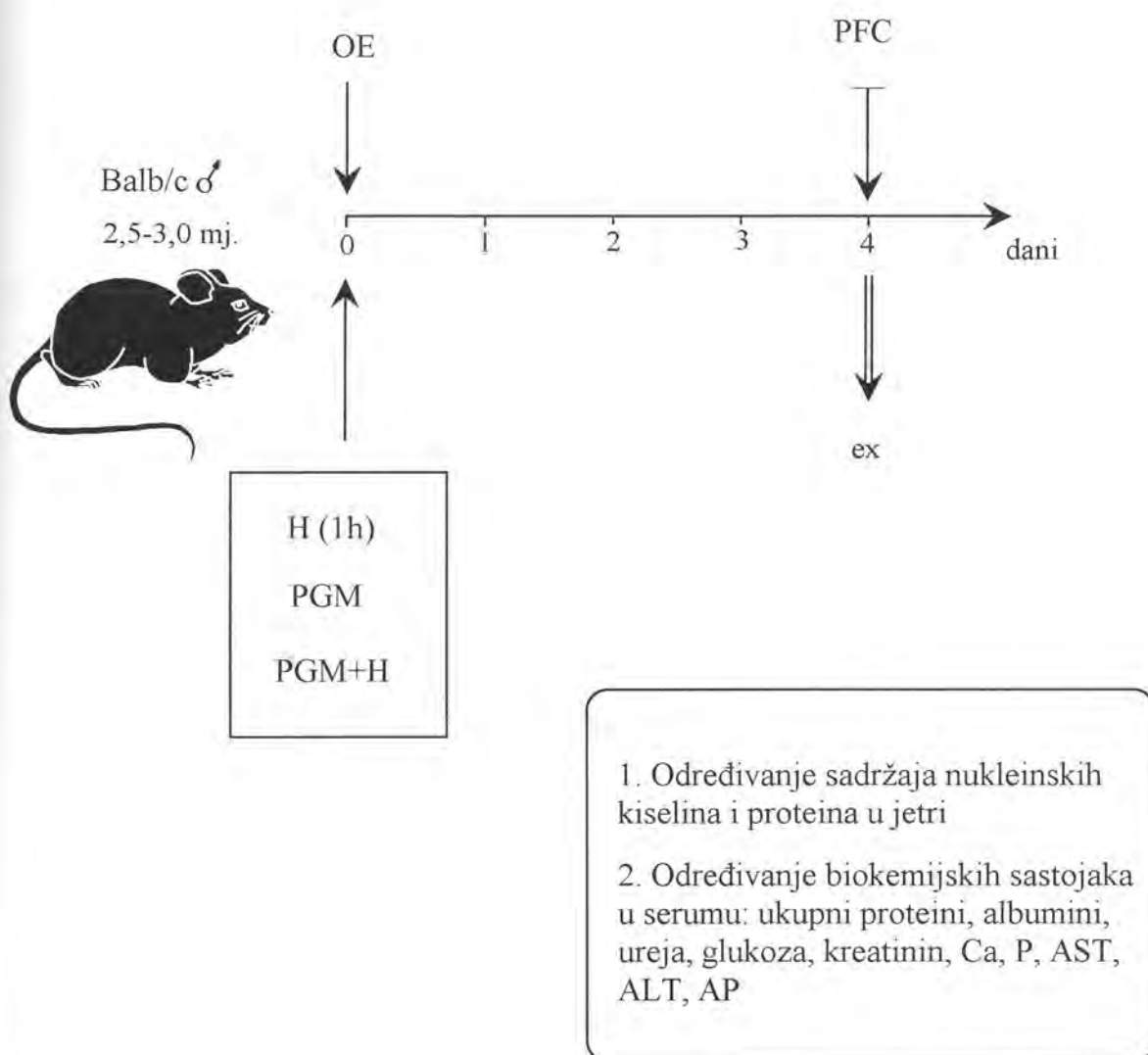
### 2.1. MODIFIKACIJA IMUNOLOŠKE REAKCIJE HUMORALNOG TIP in vivo DEPLECIJAMA T-LIMFOCITNIH SUBPOPULACIJA



Slika 9

## PLAN POKUSA 3

### 2.2. MODIFIKACIJA IMUNOLOŠKE REAKCIJE HUMORALNOG TIPA PRIMJENOM PGM-a i HALOTANSKE ANESTEZIJE (H)



Slika 10



## *8.4. Modifikacija primjenom hormona*

### *8.4.1. Primjena somatostatina*

Da bi ispitili *in vivo* učinke somatostatina na imunološku reakciju humoralnog tipa, primjenjivali smo dva različita protokola aplikacije hormona. Kratkotrajne učinke ispitivali smo dvokratnom, subakutnom injekcijom hormona u dozi od 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tjelesne mase miševa. Prvu dozu injicirali smo neposredno nakon senzibilizacije životinja ovčjim eritrocitima, dok je druga doza injicirana istog dana 12 sati kasnije. Dugotrajni učinak SMS-a pratili smo tako da smo životinjama operativnim putem, potkožno, implantirali minipumpice (Alzet osmotic mini pumps, model 1702), koje su postupno otpuštale SMS tijekom 6 dana.

Budući da je SMS inhibitor sekrecije hormona rasta, manjak ovog hormona u kratkotrajnim i dugotrajnim pokusima pokušali smo nadoknaditi primjenom egzogenog hormona rasta. U posebnoj eksperimentalnoj skupini životinja injicirali smo ga istovremeno sa SMS-om u dozi od 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tjelesne mase miša (GH + SMS). Dodatna skupina miševa (GH) bila je tretirana samim hormonom rasta.

Kontrolnoj skupini životinja pri ispitivanju kratkotrajnih učinaka SMS-a injicirali smo fiziološku otopinu u istom volumenu kao i otopinu SMS-a, a u dugotrajnim pokusima minipumpice smo punili fiziološkom otopinom (NaCl). Budući da smo minipumpice implantirali životinjama operativnim putem jedna od kontrolnih skupina životinja bila je podvrgnuta operaciji bez postavljanja minipumpice (lažna operacija - SHAM).

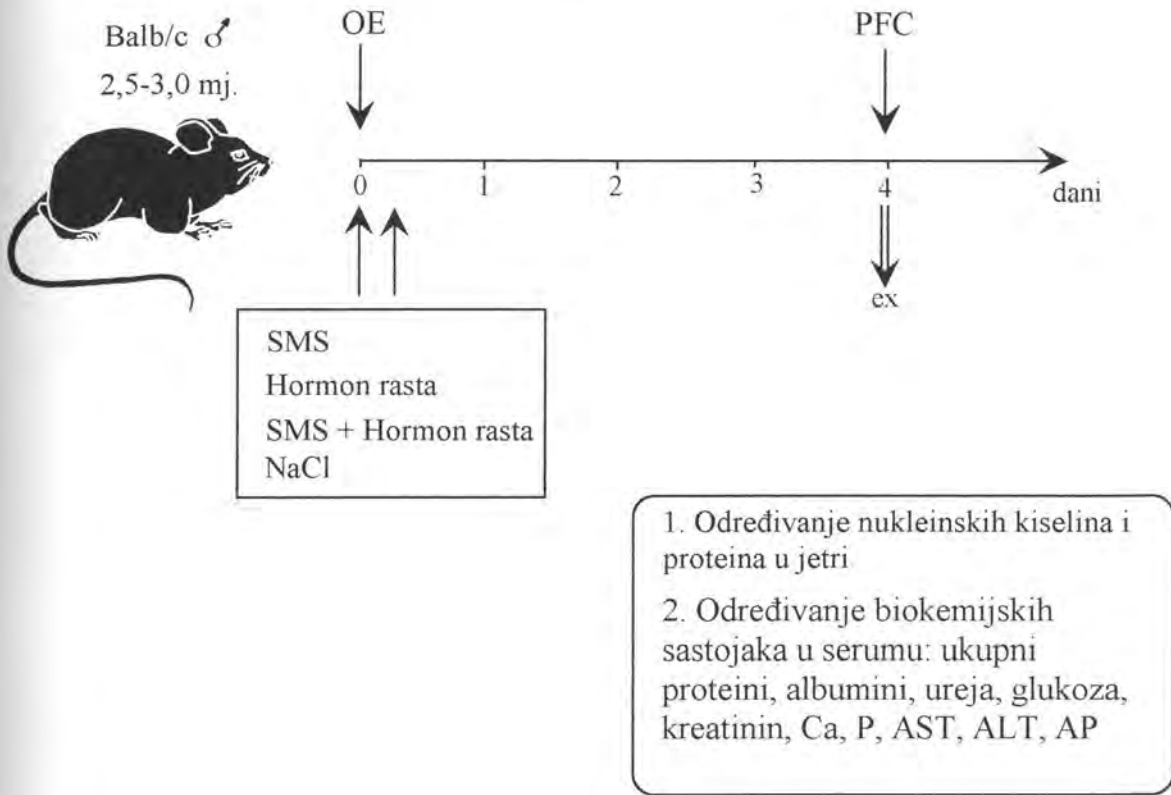
### *8.4.2. Primjena IGF-a*

Modifikaciju imunološke reakcije staničnog tipa hormonima pratili smo primjenom IGF-a u lokalnoj GVHR. U tu svrhu smo odmah po inokulaciji BALB/c splenocita u lijevu nožicu F<sub>1</sub> hibrida (CBA/BALB/c) injicirali životinjama i IGF, te zatim ponovili davanje IGF-a nakon 8 sati. Ukupnu dozu (2x15  $\mu\text{g}$  po životinji) podijelili smo u dvije jednake količine i injicirali potkožno, istovremeno i u lijevu senzibiliziranu i desnu nesenzibiliziranu nožicu.

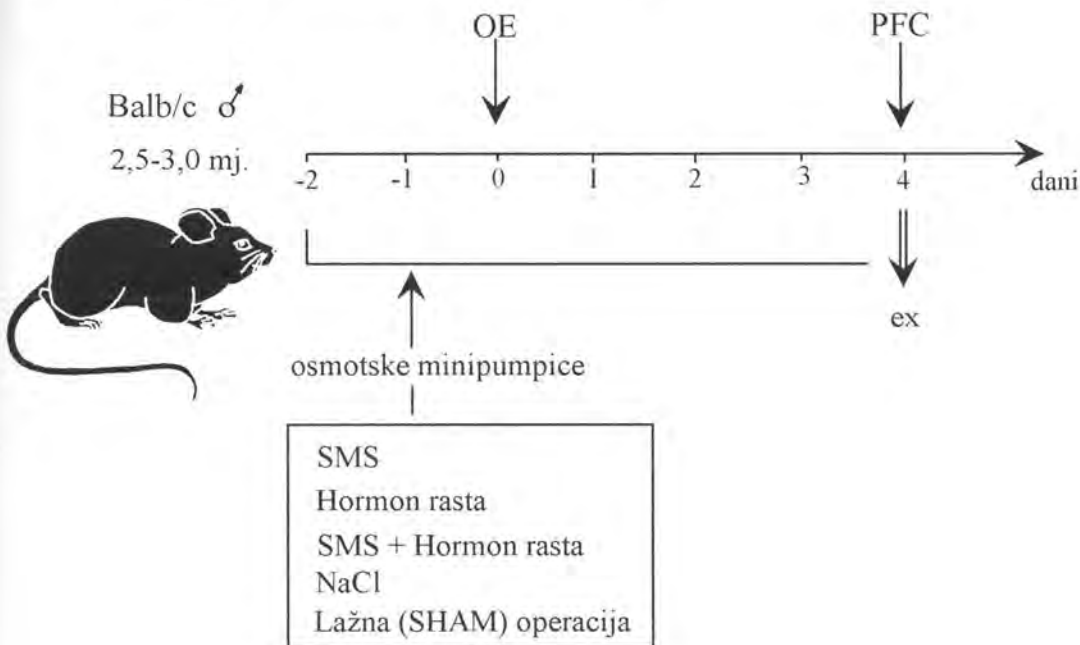
## PLAN POKUSA 4

### 2.3. MODIFIKACIJA IMUNOLOŠKE REAKCIJE HUMORALNOG TIPA PRIMJENOM SOMATOSTATINA

#### a) KRATKOTRAJNA PRIMJENA SOMATOSTATINA



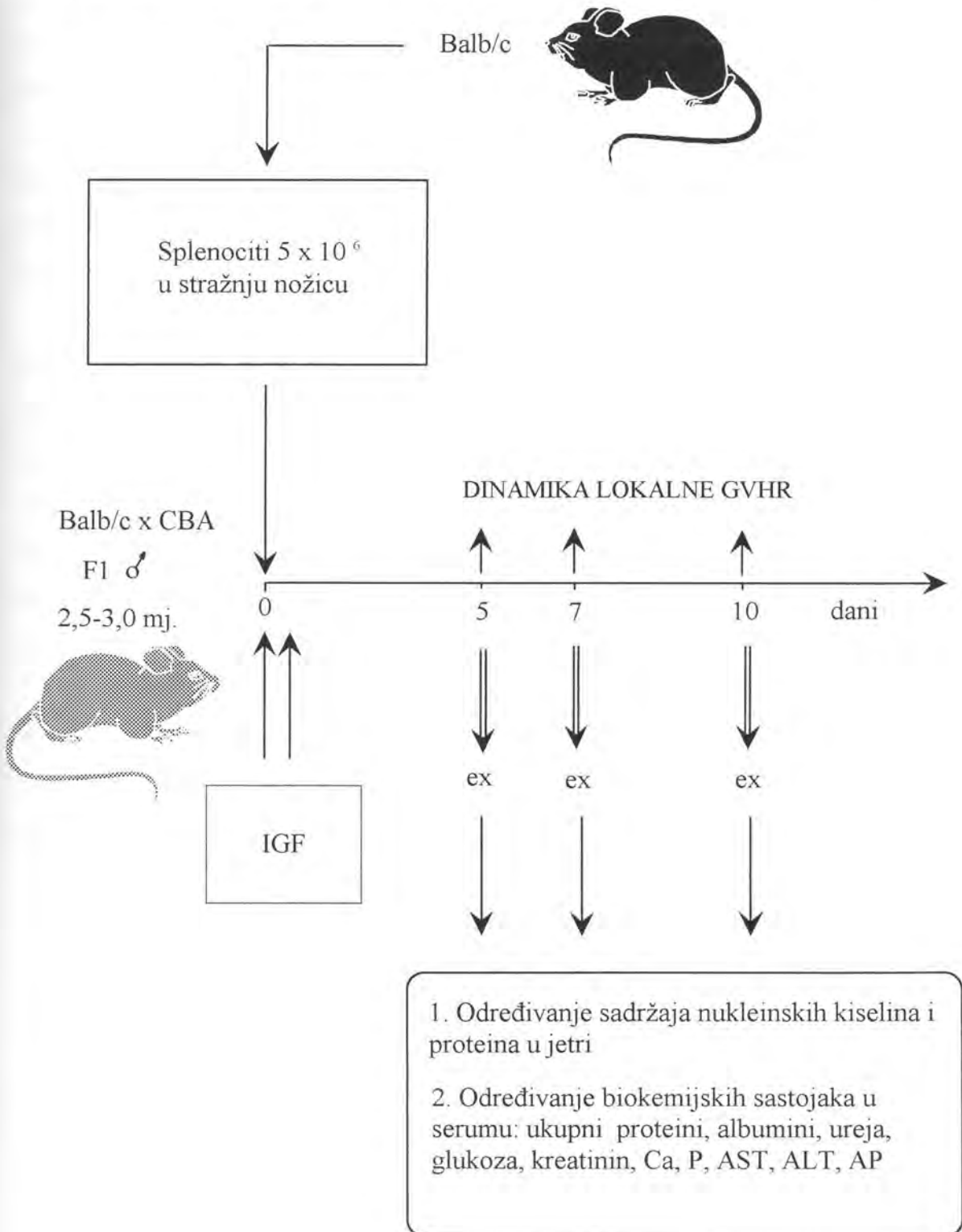
#### a) DUGOTRAJNA PRIMJENA SOMATOSTATINA



Slika 11

## PLAN POKUSA 5

### 2.4. MODIFIKACIJA IMUNOLOŠKE REAKCIJE STANIČNOG TIPRA PRIMJENOM IGF-a



Slika 12

## 9. Metode za procjenu imunološke reakcije

### 9.1. Testovi za ispitivanje imunološke reakcije humoralnog tipa

Intenzitet imunološke reakcije humoralnog tipa mjerili smo određivanjem broja PFC. Četvrtog dana nakon imunizacije ovčjim eritrocitima životinje smo žrtvovali cervikalnom dislokacijom i pasirali izvagane dijelove ekstirpiranih slezena kroz mrežicu u hranjivom mediju RPMI 1640. Suspenziju splenocita smo centrifugirali 10 minuta na 1200 okretaja u minuti. Odlili smo supernatant i nakon razaranja eritrocita TRIS-om puferiranim amonijevim kloridom, stanice smo dva puta isprali hladnim medijem i odredili koncentraciju splenocita brojeći u hemocitometrijskoj komorici stanice s jezgrom.

Sto  $\mu\text{l}$  suspenzije splenocita (cca.  $5 \times 10^5$  splenocita) pomiješali smo sa 25  $\mu\text{l}$  prethodno testiranog zečjeg seruma koji sadrži komplement, 25  $\mu\text{l}$  50%-tne suspenzije OE i 50  $\mu\text{l}$  medija RPMI 1640. Dobivenu suspenziju smo mikropipetom prenijeli u šupljinu nadslojenog stakalca dimenzija 2,5 x 3,0 cm, dubine 150  $\mu\text{m}$ , a volumena 112,5  $\text{mm}^3$ . Stakalca smo međusobno spojili dvoslojnom ljepljivom trakom, a sa strane zatalili uranjanjem stakalca u rastopljeni parafin. Tako pripremljena stakalca inkubirali smo 60 minuta na 37°C u vodenoj kupelji. Za svaki uzorak određivali smo broj hemolitičkih čistina u duplikatu.

Tijekom inkubacije, senzibilizirani limfociti B se u ponovnom kontaktu s OE diferenciraju do plazma stanica. One proizvode IgM, koji se veže za membranske antigene ovčjih eritrocita i omogućuje sustavu komplementa lizu stanice. Broj hemolitičkih čistina nastalih lizom ovčjih eritrocita očitavali smo sa stakalca pod mikroskopom. Veći broj hemolitičkih čistina značio je veći broj senzibiliziranih limfocita B koji su sposobni za lučenje protutijela, a time i jači intenzitet humoralnog imunološkog odgovora.

Rezultate smo prikazivali kao prosječan broj hemolitičkih čistina iz dva polja svakog uzorka preračunat na ukupni broj stanica slezene i na milijun splenocita.

## 9.2. Testovi za ispitivanje imunološke reakcije staničnog tipa

Dinamiku lokalne GVHR odredili smo mjerenjem poplitealnih čvorova hibrida, i to prateći razliku u težini limfnih čvorova poplitealne regije desne, injicirane i lijeve neinjicirane šapice.

Petog, sedmog i desetog dana po injiciranju polusrodnih splenocita, životinje smo žrtvovali i izvadili poplitealne čvorove obiju šapica i slezenu.

Limfne čvorove vagali smo na analitičkoj vagi preciznosti  $10^{-4}$  g.

Slezene smo propasirali kroz najlonsku mrežicu u PBS-u, te smo odredili broj stanica brojenjem u hemocitometrijskoj komorici. Imunofenotipizacijom, metodom direktne imunofluorescencije, odredili smo postotak CD4, CD8 i Ig pozitivnih stanica u slezeni, a rezultat smo prikazali kao ukupni broj stanica ovog fenotipa u slezeni.

## 9.3. Analiziranje limfocitnog fenotipa protočnom citometrijom

FACSCAN je protočni citometar pomoću kojega smo izvršili analizu limfocitnog fenotipa, i to za određivanje učinkovitosti deplecije i za mjerenje odnosa limfocitnih populacija u određenim eksperimentalnim protoklima.

Aparat omogućava praćenje pet različitih staničnih pokazatelja: veličinu stanice, gustoću (granuliranost) stanice, valnu dužinu i intenzitet tri različita emisijska spektra fluorescentnih boja. U svakoj probi analizirali smo po  $1 \times 10^4$  stanica.

Za obilježavanje staničnih biljega koristili smo dvije vrste imunofluorescentnih tehnika:

a) Direktna metoda bojanja: Ova metoda podrazumijeva korištenje monoklonskih protutijela koja su izravno vezana s fluorescentnom bojom. Milijun stanica smo resuspendirali u 50  $\mu$ l hladnog FACS medija (Becton-Dickenson) i potom dodali 1  $\mu$ g monoklonskih protutijela otopljenih u istom volumenu. Koristili smo monoklonska protutijela na stanične biljege CD4, CD8, CD5 i mišji mIg (Becton-Dickenson). Nakon inkubacije od 30 minuta na  $+4^{\circ}\text{C}$  i odstranjenja viška nevezanih protutijela ispiranjem u FACS mediju, stanice smo konačno resuspendirali u 1 ml FACS medija s 1  $\mu$ g/ml

propidijum jodida (Serva 33671), fluorescentne boje koja služi za odvajanje mrtvih stanica na protočnom citometru.

b) Indirektna metoda bojenja: Za ovu metodu bojenja koristili smo primarna protutijela specifična za određeni biljeg i sekundarna protutijela konjugirana fluorescentnom bojom. Sekundarna protutijela su bila specifična za vrstu i razred primarnih protutijela. Inkubacija je također trajala 30 minuta na  $+4^{\circ}\text{C}$ , a nakon toga smo ispirali nevezana protutijela i dodali propidijum jodid.

Suspenzije stanica obilježenih specifičnim biljezima očitavali smo na protočnom citometru. Analizom dobivenih rezultata dobili smo postotak pozitivnih stanica na određeni stanični biljeg u ispitivanoj suspenziji.

Postotak nespecifičnog vezanja određivali smo kontrolnom probom koju smo pripremali po postupcima direktne ili indirektno imunofluorescencije. Pri tome smo koristili primarno protutijelo koje je bilo irelevantno za biljege stanica, ali je bilo iste vrste i razreda kao i protutijelo korišteno za detekciju biljega.

## **10. Metode za određivanje sadržaja nukleinskih kiselina u jetri**

### ***10.1. Izolacija nukleinskih kiselina iz jetre***

Postupak izolacije nukleinskih kiselina iz stanica tkiva jetre sastojao se od nekoliko faza. Prvo smo točno odvagani alikvot tkiva jetre homogenizirali s kvarcnim pijeskom i ekstrahirali komponente koje nemaju osobine nukleinskih kiselina, a topive su u alkoholu. Zatim su se uklanjale komponente topive u smjesi etanola i etera i konačno one topive u kiselini. Iz taloga koji je ostao nakon tog postupka vršili smo izolaciju nukleinskih kiselina.

1. Uzorak jetre smo homogenizirali Potter-Elvehjemovim teflonskim tučkom uz dodatak smjese za homogeniziranje (str.41), i to 5 ml otopine na 1 g jetre.
2. Homogenat smo inkubirali 20 minuta na  $60^{\circ}\text{C}$ .
3. U hladni homogenat dodavali smo 5 mol/l NaCl sve do koncentracije NaCl od 1 mol/l
4. Smjesi smo dodali isti volumen otopine kloroform:isoamilni alkohol (24:1) i dobro promućkali.



5. Smjesu smo ostavili 20-30 minuta na sobnoj temperaturi.
6. Centrifugirali smo na 2000 okr./min. 10 min. održavajući temperaturu na 4°C.
7. Vodeni sloj smo uklonili Pasteurovom pipetom.
8. Talogu smo dodali 10 ml 0,25 mol/l HClO<sub>4</sub> pri 4°C (HClO<sub>4</sub> mora biti u ledenoj vodenoj kupelji).
9. Ostavili smo stajati 20 minuta.
10. Ponovno smo centrifugirali na 2000 okr/min. 15 minuta na 4°C.
11. Supernatant smo odbacili.
12. Talog smo resuspendirali u 20 ml 0,25 mol/l HClO<sub>4</sub> pri 4°C, dobro izmješali staklenim štapićem i ostavili da stoji 20 minuta.
13. Centrifugirali smo i opet odbacili supernatant.
14. Postupak od 12 i 13 ponovili smo tri puta.
15. Dodiveni pročišćeni talog sadrži nukleinske kiseline koje smo onda ekstrahirali u 3 ml 0,5 mol/l HClO<sub>4</sub> i ostavili 40 minuta na temperaturi 80°C.
16. Centrifugirali smo 5 min na 2000 okr/min.
17. U supernatantu su nukleinske kiseline.

## **10.2. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina**

### **10.2.1. Određivanje koncentracije DNA**

Za određivanje DNA metodom po Burton-u (40) u 1 ml supernatanta dodali smo 2 ml difenilamin reagensa. Epruvete smo ostavili 20 minuta u kipućoj vodenoj kupelji da se razvije boja. Nakon hlađenja mjerili smo intenzitet boje spektrofotometrijski na 600 nm prema slijepoj probi. Rezultate smo očitali iz baždarnog dijagrama koji smo pripremili s timusnom DNA.

### **10.2.2. Određivanje koncentracije RNA**

Metodom po Mejbaumovoj (169) odredili smo koncentracije RNA u supernatantu.

U epruvetu smo uzeli 1 ml supernatanta dobivenog ekstrakcijom nukleinskih kiselina iz tkiva jetre i dodali smo 2 ml orcinol reagensa. Reakciju smo provodili 20 minuta u kipućoj vodenoj kupelji, epruvete smo ohladili i izmjerili apsorpciju prema slijepoj probi pri 640 nm.

Koncentraciju RNA odredili smo iz standardne krivulje koju smo priredili upotrebom standarda RNA kvasca.

Oba kolorimetrijska mjerenja koncentracije DNA i RNA izvršili smo na spektrofotometru Pye Unicam SP 500.

## **11. Metode za određivanje koncentracije proteina u jetri**

Koncentraciju proteina u jetri odredili smo metodom po Lowry-u (156), koju smo modificirali po Hartree-u (102).

Tkivo jetre homogenizirali smo u fiziološkoj otopini i dobiveni homogenizat razrijedili sa fiziološkom otopinom. Od tako razrijeđenog homogenizata uzeli smo alikvot od 1 ml, dodali 0,9 ml otopine A (str.42) i stavili 10 minuta u vodenu kupelj na 50°C. Uzorak smo ohladili na sobnu temperaturu i dodali 0,1 ml otopine B (str.42). U toku 10 minuta mora se naglo dodati 3,0 ml otopine C (str.42) uz miješanje. Nakon toga smo uzorak stavili u termostat na 50°C tijekom 10 minuta. Epruvete smo ohladili i nakon 30 minuta mjerili smo intenzitet nastalog obojenja na spektrofotometru kod valne dužine 650 nm. Rezultate smo očitavali iz standardne krivulje koju smo pripremili radeći paralelno i standardne otopine pripremljene iz govedskog serumskog albumina.

## **12. Metode za određivanje biokemijskih sastojaka u serumu**

### ***12.1. Priprema seruma za biokemijska određivanja***

Krv smo životinjama uzeli pod eterskom anestezijom iz očne vene plexus. Uzorci su ostavljeni 10 min. na 37 °C, da se izazove zgrušavanje, a zatim su centrifugirani 10 min. na 1475 x g. Serum smo izdvojili Pasterovim pipetama u plastične epruvetice i pohranili na -40°C do analize.

## *12.2. Biokemijske analize u serumu*

Analizu svih biokemijskih sastojaka u serumu miševa učinili smo na automatskom autoanalizatoru RA-1000 (Technicon, SAD), u laboratoriju Sušak Zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Rijeka.

Određivanje katalitičke aktivnosti transaminaza u serumu izvršili smo izvorim reagensima (Herbos, Sisak), modificiranom metodom po Karmen-u (124).

Katalitičku aktivnost alkalne fosfataze mjerili smo metodom po McCombu i Bowers-u (168).

Koncentraciju ukupnih proteina u serumu životinja odredili smo metodom sa biuretom (264), a albumina metodom po Doumas-u (66).

Koncentraciju glukoze odredili smo upotrebom izvornih reagensa (Herbos, Sisak), kao i koncentraciju ureje. Metoda određivanja koncentracije glukoze je po Trinder-u (17), a koncentracija ureje u serumu određena je potpuno enzimatskom metodom po Talke i Schubert-u (246).

Za određivanje koncentracije kreatinina koristili smo vlastite reagense i Jaffe-ovu metodu (119), koja je prilagođena za rad na automatskim analizatorima (44).

Određivanje koncentracije kalcija u serumu izvršili smo također vlastitim reagensima fotometrijski (228).

Koncentraciju fosfora odredili smo direktnom UV metodom (181).

Koncentracija CRP-a izmjerena je u serumima životinja na Turbox-nefelometru sa izvornim Turbox reagensima (Orion, SAD) imunokemijskom metodom.

## **13. Statistička obrada podataka**

Dobivene rezultate obrađivali smo primjenom Studentovog T-testa za male uzorke. Razlike među skupinama testirali smo s vjerojatnošću od 0,05 i manje ( $p < 0,05$ ) smatrali smo značajnim (192).

## **REZULTATI**

## **14. Metaboličke promjene tijekom imunološke reakcije humoralnog i staničnog tipa**

### ***14.1. Imunološka reakcija humoralnog tipa***

Imunološku reakciju humoralnog tipa inducirali smo u miševa intraperitonealnom senzibilizacijom s OE, dok su kontrolne skupine primale fiziološku otopinu. Intenzitet humoralnog imunološkog odgovora procjenili smo standardnom reakcijom određivanja PFC, a rezultate smo prikazali kao broj PFC/ $10^6$  splenocita i kao broj PFC/slezenu (slika 13). Kako se vidi na slici, u slezeni senzibiliziranih miševa četvrtog dana izrazito se povećava broj stanica koje stvaraju hemolitičke čistine.

#### ***14.1.1. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri***

Senzibilizacija s OE nije dovela do promjena u sadržaju nukleinskih kiselina i proteina u jetri. Rezultati su prikazani kao ukupna količina DNA, RNA i proteina u jetri izražena u mg/100 grama tjelesne mase miševa i kao koncentracija nukleinskih kiselina i proteina u jetri izražena u miligramima na gram jetre (slika 14).

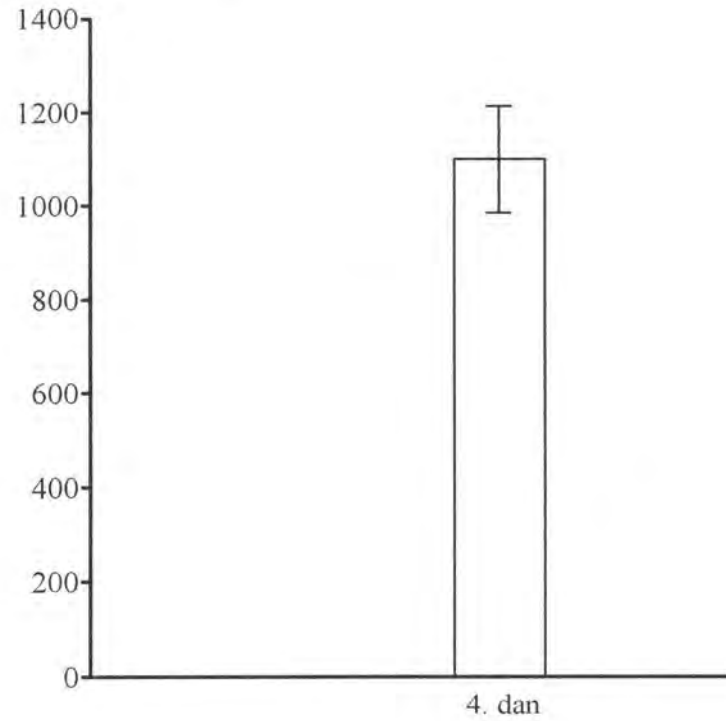
#### ***14.1.2. Promjene biokemijskih sastojaka u serumu miševa***

Učinak imunološke reakcije humoralnog tipa na biokemijske sastojke seruma miševa prikazan je u tablici 7. Utvrđeno je da su nakon senzibilizacije miševa s OE koncentracije ureje i kalcija u serumu miševa smanjene za oko 15 % u odnosu na kontrolne miševe ( $p < 0,05$ ), a vrijednosti ostalih biokemijskih pokazatelja ne pokazuju značajna odstupanja.

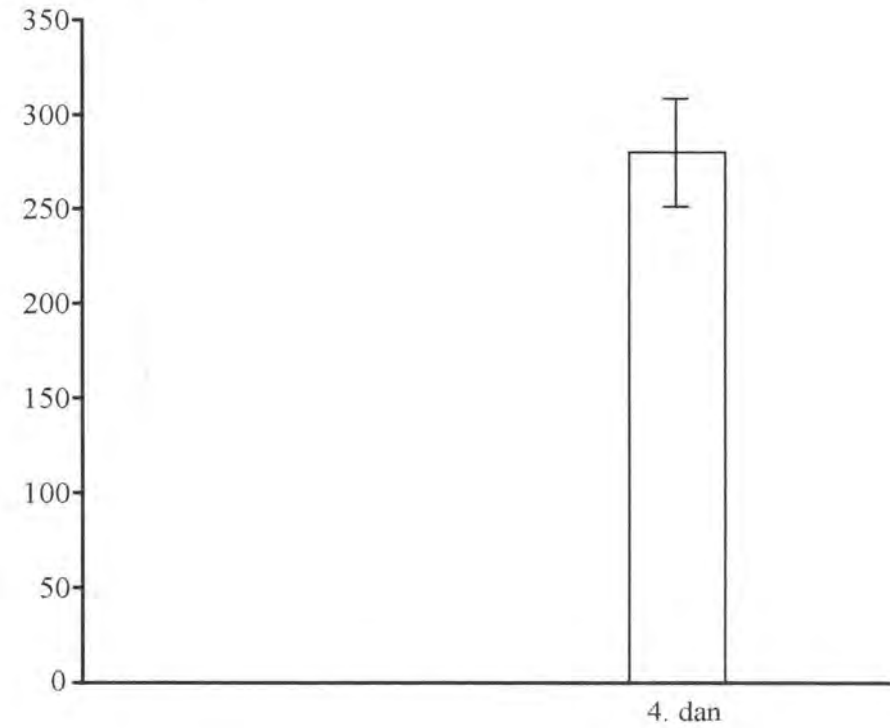
### ***14.2. Imunološka reakcija staničnog tipa***

Za procjenu učinka staničnog tipa imunosti na metaboličke promjene služili smo se modelom lokalne GVHR. U tu svrhu injicirali smo splenocite roditeljskog soja u  $F_1$  hibride i

PFC/ $10^6$  splenocita



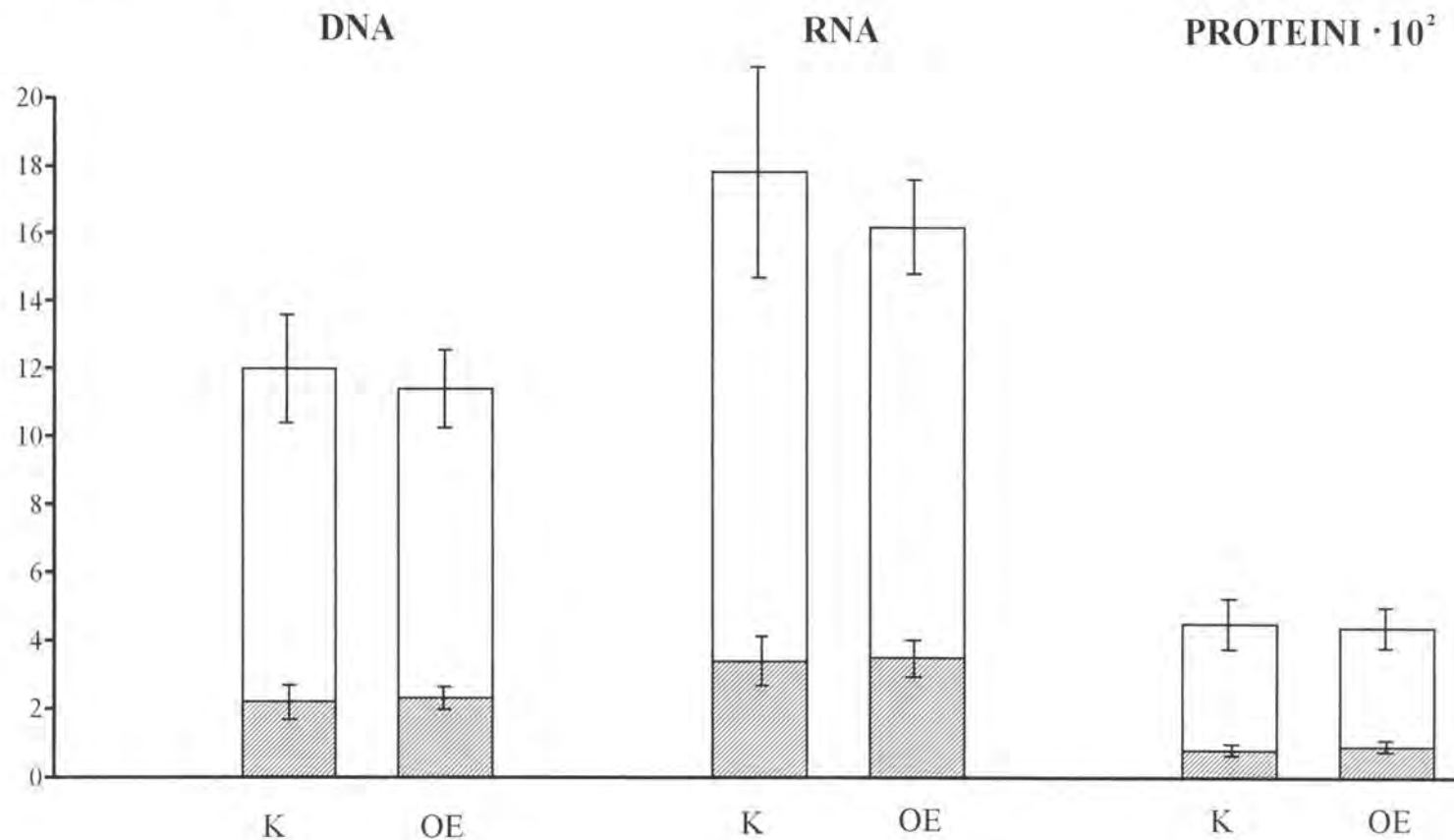
PFC/slezena  $\times 10^3$



**Slika 13. Intenzitet imunološkog odgovora nakon senzibilizacije miševa ovčjim eritrocitima**



mg/jetri/100g tj. mase □  
mg/g jetre ▨



Slika 14. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri kontrolnih miševa (K) i nakon senzibilizacije ovčjim eritrocitima (OE)

Tablica 7. Učinak senzibilizacije životinja ovčjim eritrocitima na biokemijske sastojke u serumu životinja

| Ispitivane životinje      | Broj životinja | AST (IJ/L) | ALT (IJ/L) | AP (IJ/L)    | Ukupni proteini (g/L) | Glukoza (mmol/L) | Ureja (mmol/L)     | Kreatinin ( $\mu$ mol/L) | Kalcij (mmol/L)    | Fosfor (mmol/L) |
|---------------------------|----------------|------------|------------|--------------|-----------------------|------------------|--------------------|--------------------------|--------------------|-----------------|
| Kontrolna skupina         | 6-7            | 69 $\pm$ 4 | 25 $\pm$ 2 | 360 $\pm$ 49 | 56 $\pm$ 2            | 7,5 $\pm$ 1,1    | 9,2 $\pm$ 0,5      | 47 $\pm$ 4               | 2,4 $\pm$ 0,04     | 2,7 $\pm$ 0,1   |
| Senzibilizirane životinje | 11-23          | 62 $\pm$ 3 | 22 $\pm$ 1 | 372 $\pm$ 28 | 56 $\pm$ 1            | 6,8 $\pm$ 0,4    | *<br>7,9 $\pm$ 0,2 | 42 $\pm$ 2               | *<br>2,0 $\pm$ 0,1 | 2,5 $\pm$ 0,1   |

Srednja vrijednost  $\pm$  standardna greška; \*p<0,05

pratili dinamiku lokalne GVHR određivanjem mase poplitealnih limfnih čvorova. Primaocce smo žrtvovali petog, sedmog i desetog dana po senzibilizaciji splenocitima.

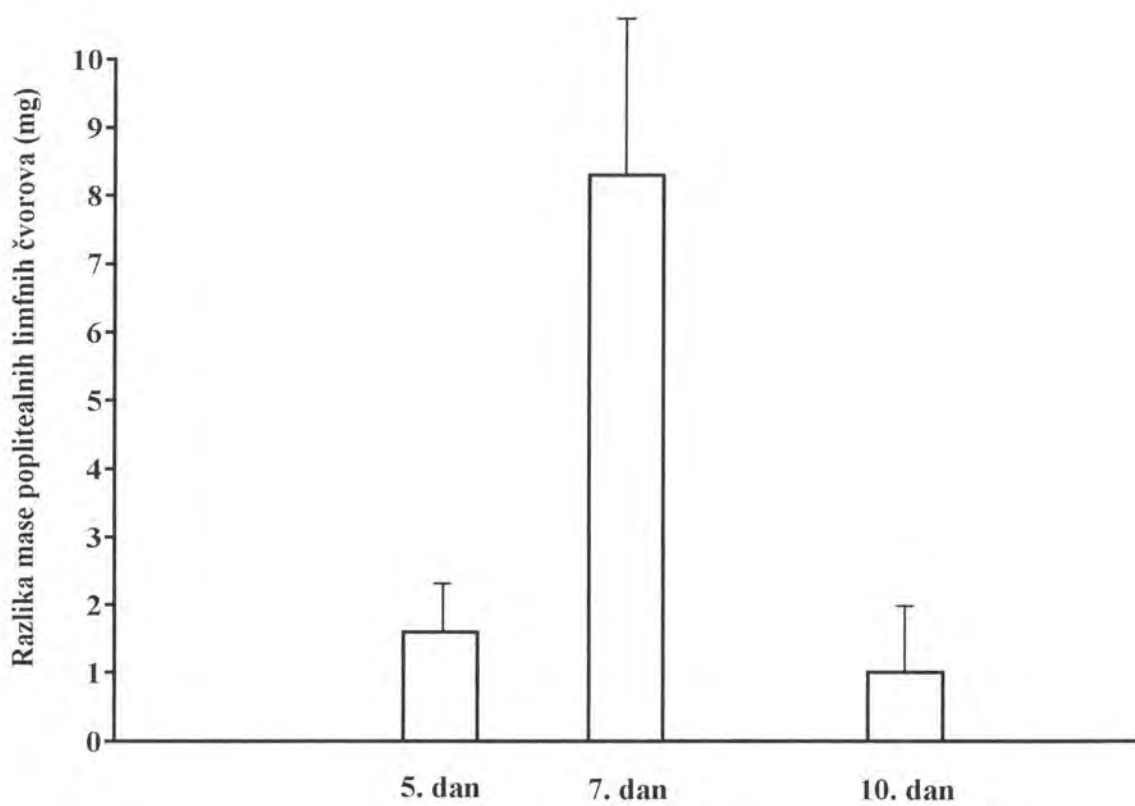
Rezultate smo prikazali kao srednju vrijednost razlika u masama poplitealnih limfnih čvorova desne - senzibilizirane i lijeve - nesenzibilizirane šapice, a odstupanja standardnom devijacijom. Primjetno je tipično povećanje razlike u masama limfnih čvorova sedmog u odnosu na peti dan, te pad desetog dana (slika 15).

#### *14.2.1. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri*

Analiza nukleinskih kiselina i proteina u jetri pokazala je da za vrijeme lokalne GVHR količina (mg/jetri/100gtj.mase) nukleinskih kiselina i proteina u jetri životinja opada, te u odnosu na kontrolne životinje pokazuje dinamičke promjene. Osim toga, dok je količina DNA u jetri opadala tijekom svih ispitivanih intervala, količina RNA pokazala je maksimalni porast sedmog dana reakcije kada je i intenzitet imunološke reakcije najveći, a količina proteina u jetri povećavala se u kasnijoj fazi, tj. desetog dana lokalne GVHR (slika 16). Koncentracije nukleinskih kiselina u jetri snižene su tijekom cijele GVHR (donji dio grafa), te uglavnom slijede gore opisane promjene.

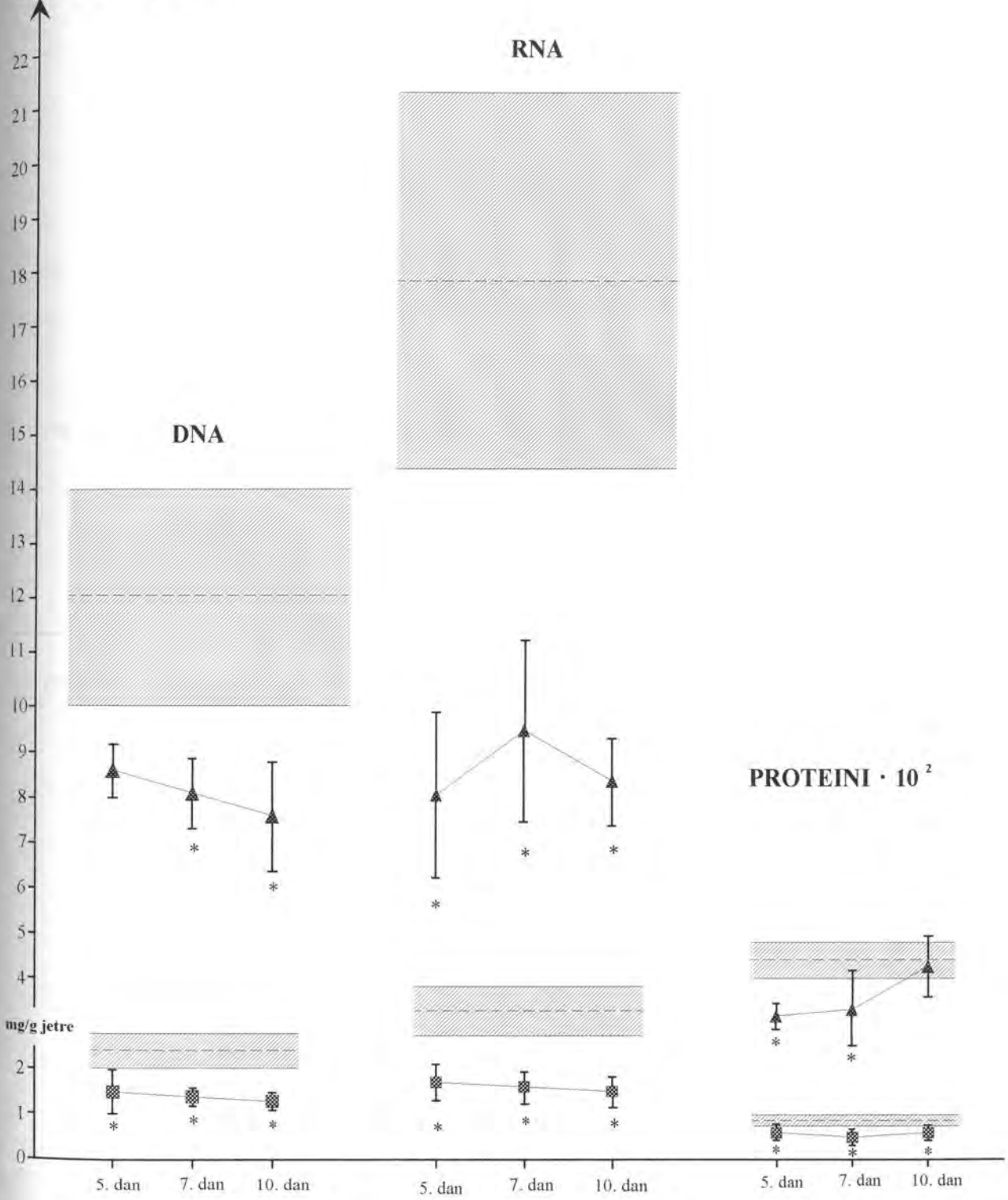
#### *14.2.2. Promjene biokemijskih sastojaka u serumu miševa*

Za vrijeme lokalne GVHR uočava se u serumu pad katalitičke aktivnosti ALT petog, sedmog i desetog dana reakcije i povećana katalitička aktivnost AP ( $p < 0,01$ ) koja je također visoka cijelo vrijeme, a najveću vrijednost ima petog dana, kada je dva puta veća od vrijednosti u kontrolnoj skupini. Koncentracije ukupnih proteina i albumina u serumu smanjuju se ( $p < 0,05$ ) desetog dana imunološke reakcije (slika 17). Tijekom cijele reakcije prisutna je hipoglikemija, a desetog dana reakcije vrijednosti su dvostruko manje od kontrolnih ( $p < 0,001$ ). Dok je koncentracija kreatinina u serumu smanjena desetog dana 15 %, koncentracija ureje ne pokazuje značajne promjene, a koncentracije kalcija su 10 % povećane sedmog i desetog dana lokalne GVHR (slika 18). Koncentracije CRP-a u serumu najveće su petog dana ( $p < 0,05$ ), a sedmog i desetog dana se normaliziraju (slika 19).



**Slika 15. Razlika u masama poplitealnih limfnih čvorova desne šapice injicirane roditeljskim splenocitima i lijeve nesenzibilizirane šapice za vrijeme lokalne GVHR**

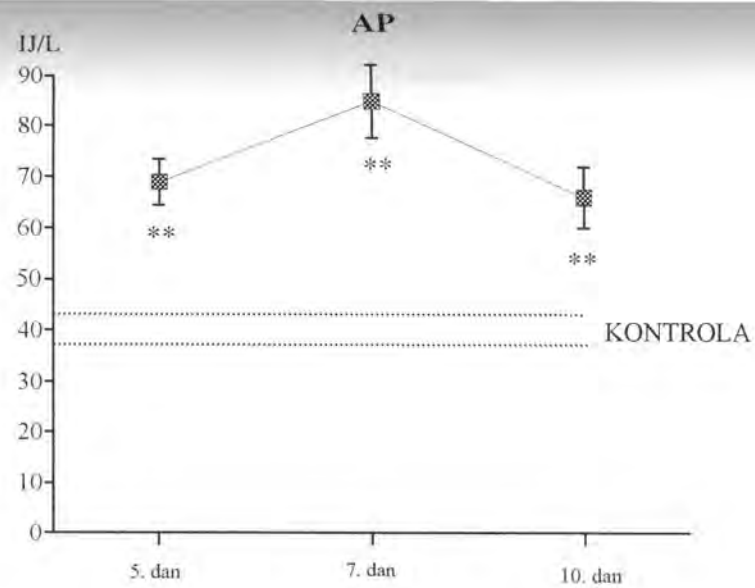
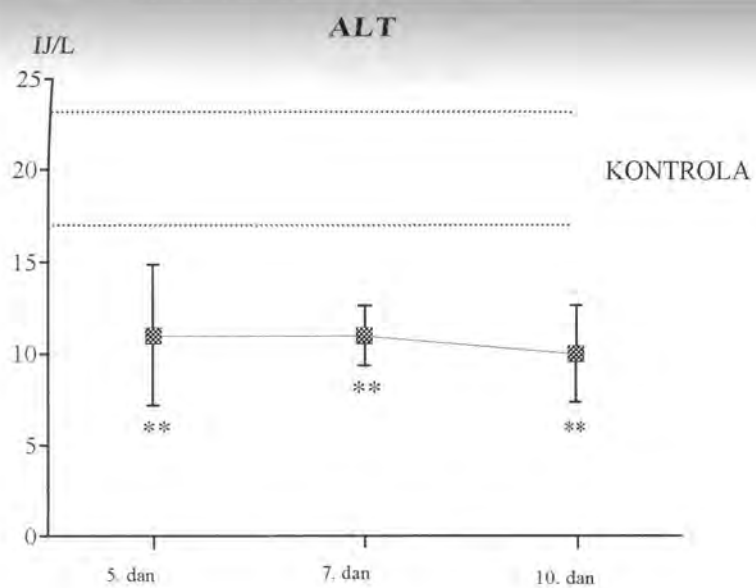
mg/jetri/100g tj. mase



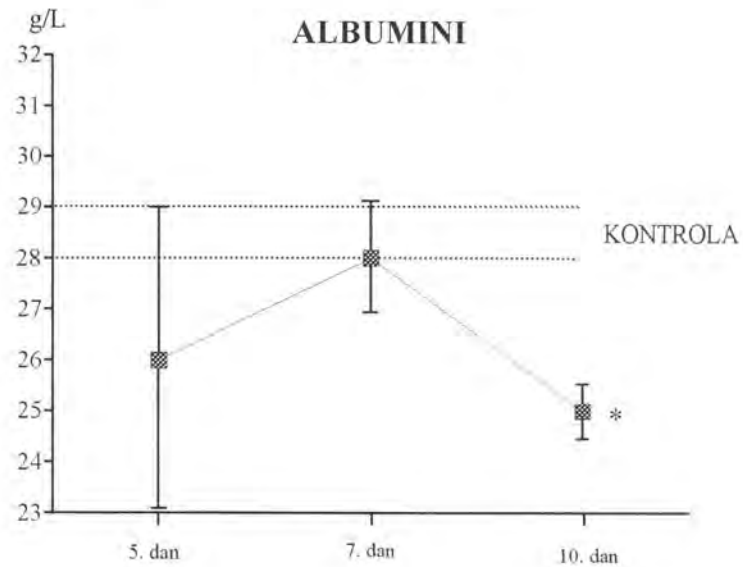
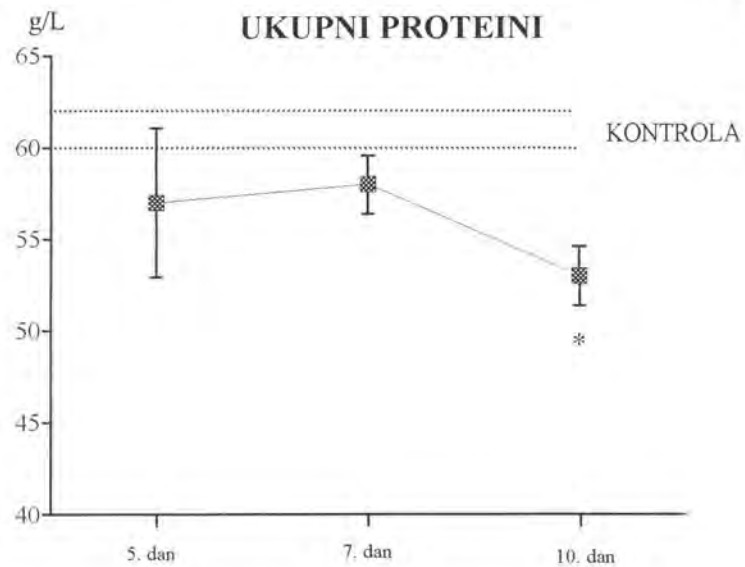
\*p<0,05

Slika 16. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteini u jetri za vrijeme lokalne GVHR



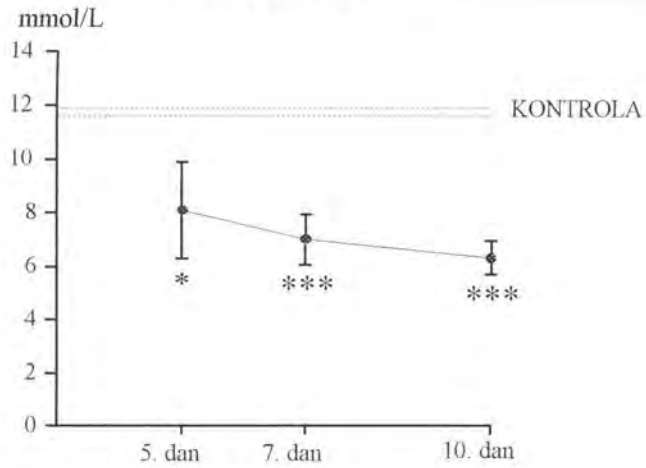


\*p<0,05  
\*\*p<0,01



Slika 17. Katalitička aktivnost ALT i AP, te koncentracije ukupnih proteina i albumina u serumu tijekom lokalne GVHR

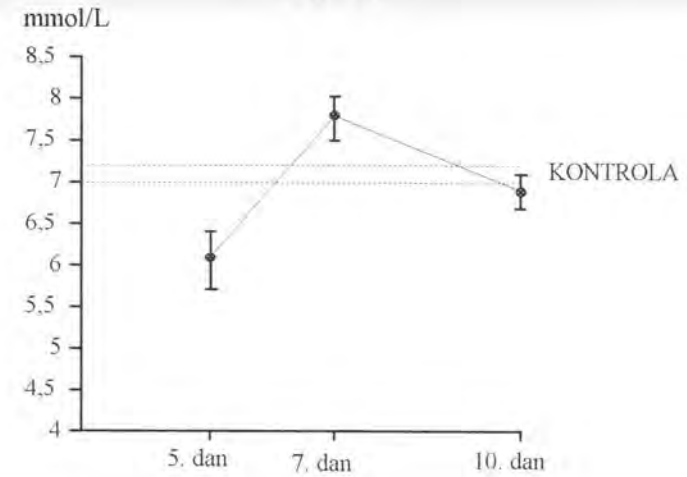
### GLUKOZA



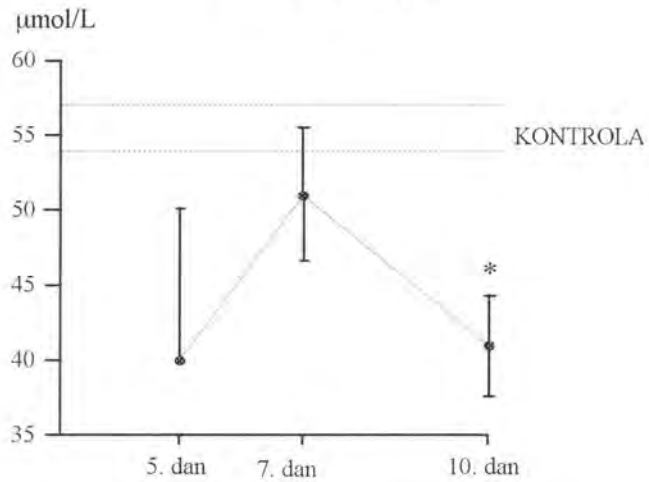
\* $p < 0,05$

\*\*\* $p < 0,001$

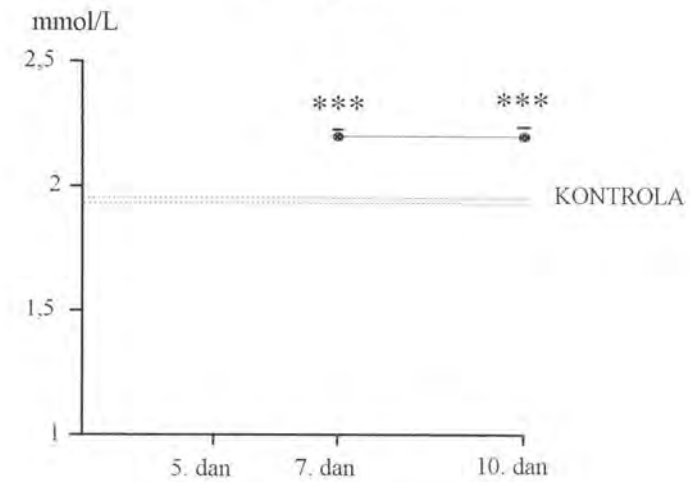
### UREJA



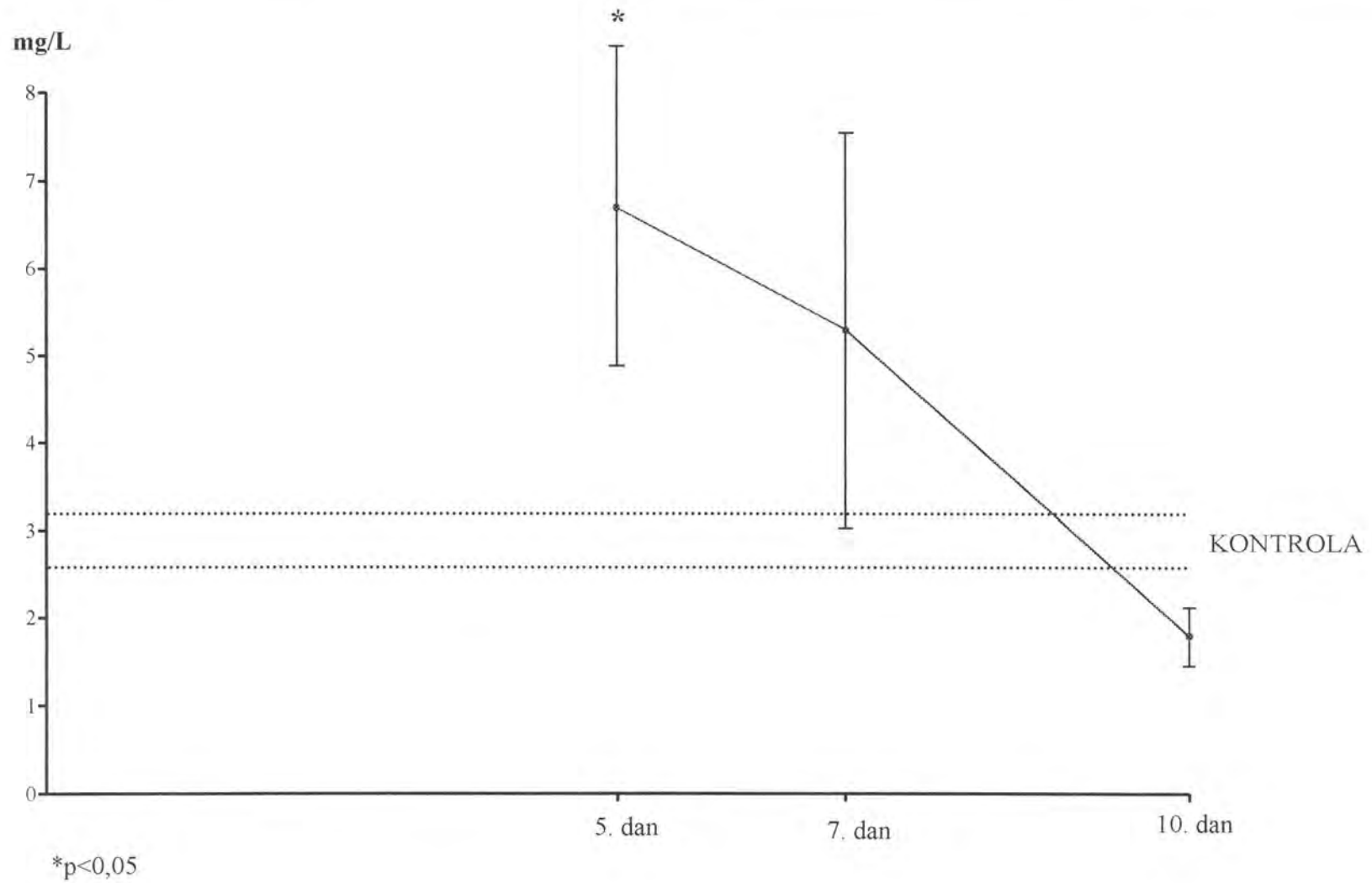
### KREATININ



### KALCIJ



Slika 18. Koncentracije glukoze, ureje, kreatinina i kalcija u serumu životinja tijekom lokalne GVHR



Slika 19. Koncentracija CRP (mg/L) u serumu miševa tijekom lokalne GVHR

## 15. Metaboličke promjene tijekom modificirane imunološke reakcije

Rezultati koje smo do sada opisali pokazali su da tijekom imunološke reakcije nastaju izrazite metaboličke promjene u jetri koje se odražavaju i na koncentracije biokemijskih sastojaka u serumu. Zbog toga smo u nastavku ispitivanja pokušali utvrditi koji mehanizmi dovode do opaženih promjena. U tu svrhu poslužili smo se metodologijom *in vivo* deplecije pojedinih T-limfocitnih subpopulacija. Pratili smo i imunološku reakciju i posljedice modificiranja imunološke reakcije halotanskom anestezijom odnosno hormonima.

### 15.1. Promjene uzrokovane deplecijom limfocitnih subpopulacija *in vivo*

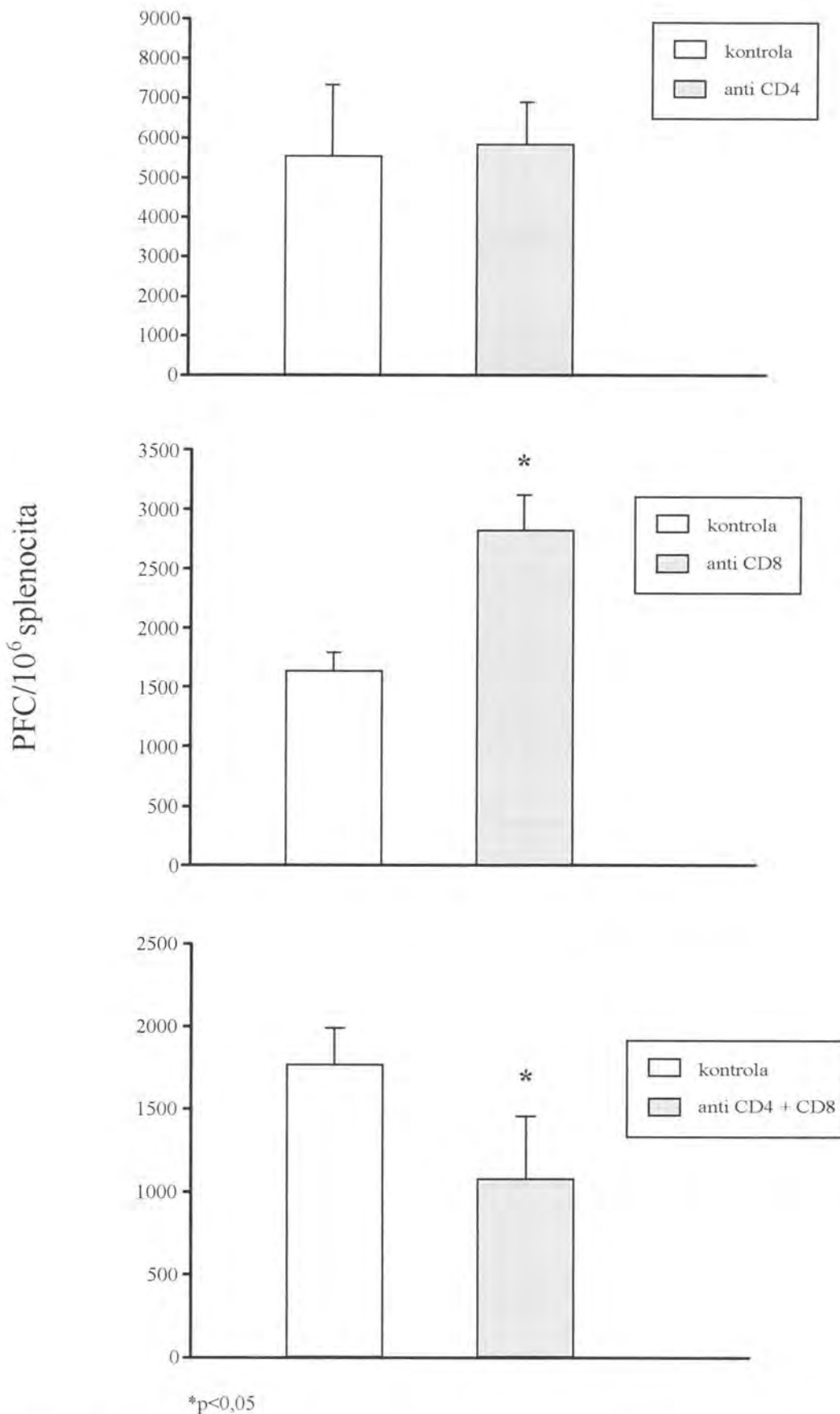
#### 15.1.1. Učinak deplecije limfocitnih subpopulacija na imunološku reakciju humoralnog tipa

Budući da su ovčji eritrociti T-ovisni antigeni, pratili smo učinke deplecije pojedinih T-limfocitnih subpopulacija na metaboličku funkciju jetre. Prema planu pokusa vidi se da smo depleciju izvršili injiciranjem specifičnih monoklonskih antitijela (anti CD4, anti CD8 i anti CD4 + anti CD8), dva dana prije indukcije imunološke reakcije humoralnog tipa. Kontrolnoj skupini injiciran je štakorski serum ili PBS. Rezultate smo prikazali kao broj PFC/milijun splenocita (slika 20) i kao postotak promjene broja PFC na milijun u depletiranih životinja u odnosu na kontrolne životinje (slika 20A).

Dok učinak deplecije CD4 limfocitne subpopulacije na humoralni imunološki odgovor nije značajan, deplecija CD8 limfocita stimulira, a dvostruka deplecija (anti-CD4 + anti-CD8) značajno suprimira broj stanica koje stvaraju hemolitičke čistine.

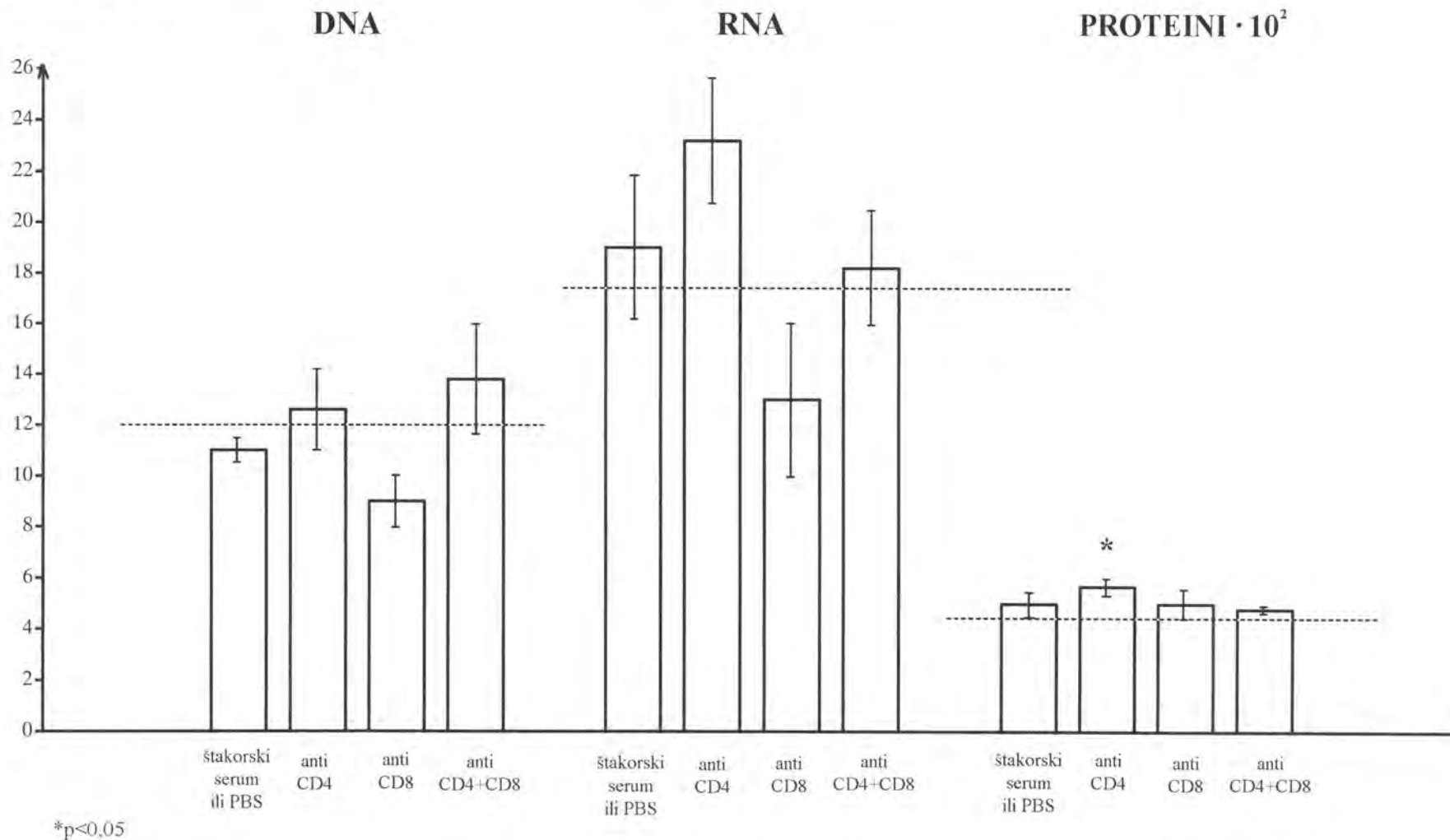
#### 15.1.2. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri

Na slici 21. prikazani su učinci deplecije pojedinih T-limfocitnih subpopulacija na sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri. Iako se uočavaju određene promjene u sadržaju DNA u jetri depletiranih životinja i tendencija porasta sadržaja RNA, ipak je jedina statistički značajna promjena povećana količina proteina u jetri životinja koje su dva dana



**Slika 20. Utjecaj deplecije T-limfocitnih subpopulacija na stvaranje PFC u imunološkom odgovoru humoralnog tipa**

mg/jetri/100g tj. mase



Slika 21. Učinak deplecije pojedinih T-limfocitnih subpopulacija na sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri miševa



prije indukcije imunološke reakcije bile in vivo depletirane s anti CD4 protutijelima ( $p < 0,05$ ).

## ***15.2. Promjene uzrokovane halotanskom anestezijom***

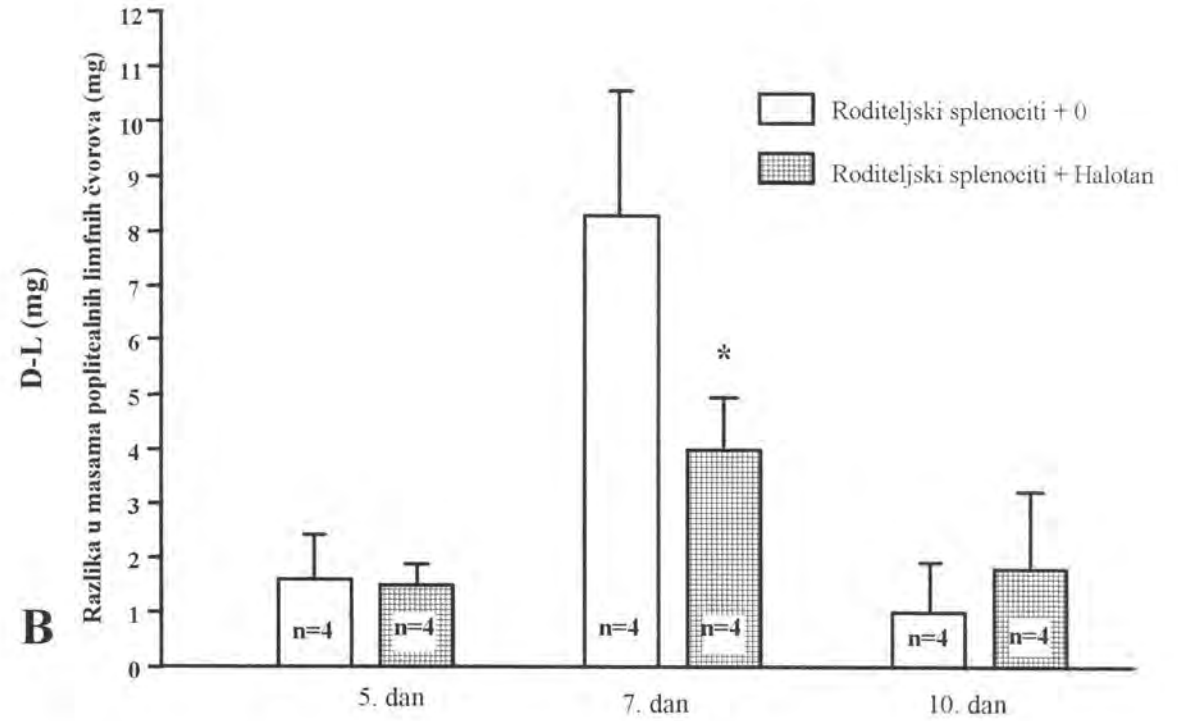
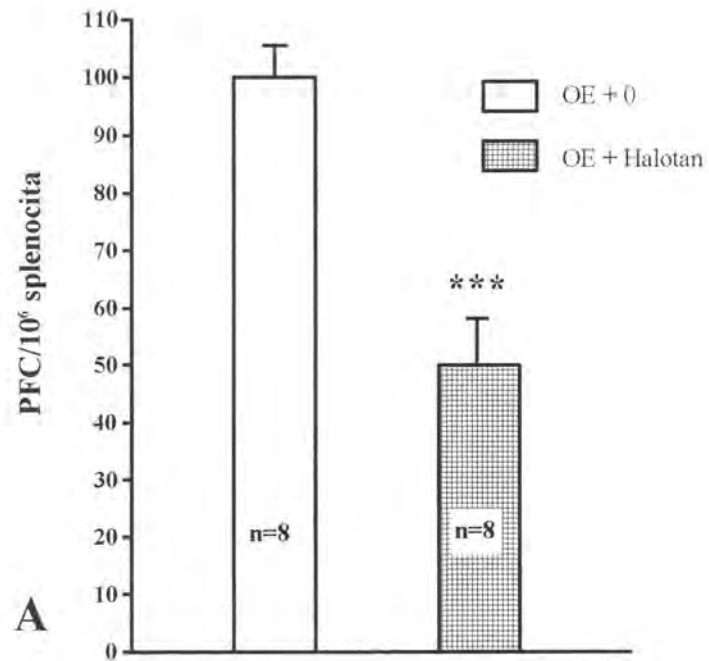
Često se naglašava da halotanska anestezija i operativni stres imaju određeno imunosupresivno djelovanje koje može biti posljedica izravnih toksičnih učinaka anestetika ili neizravnih mehanizama vezanih uz narušavanje neuroendokrino-imunološke homeostaze djelovanjem halotana ili operativnog stresa. Iako su imunosupresivni učinci ovih stanja relativno dobro poznati, a djelomično i prezentirani (211), metaboličke promjene koje prate ova stanja manje su istraživana, te smo ih u nastavku detaljnije analizirali.

### ***15.2.1. Imunosupresivno djelovanje halotanske anestezije***

Učinak halotanske anestezije na imunološku reakciju humoralnog tipa pratili smo određivanjem broja PFC. Pri tom su senzibilizirani miševi neposredno nakon injiciranja ksenogeničnih OE bili podvrgnuti jednosatnoj halotanskoj anesteziji. Na slici 22 A koja pokazuje broj PFC/ $10^6$  splenocita uočava se da halotanska anestezija značajno suprimira imunološki odgovor humoralnog tipa ( $p < 0,001$ ).

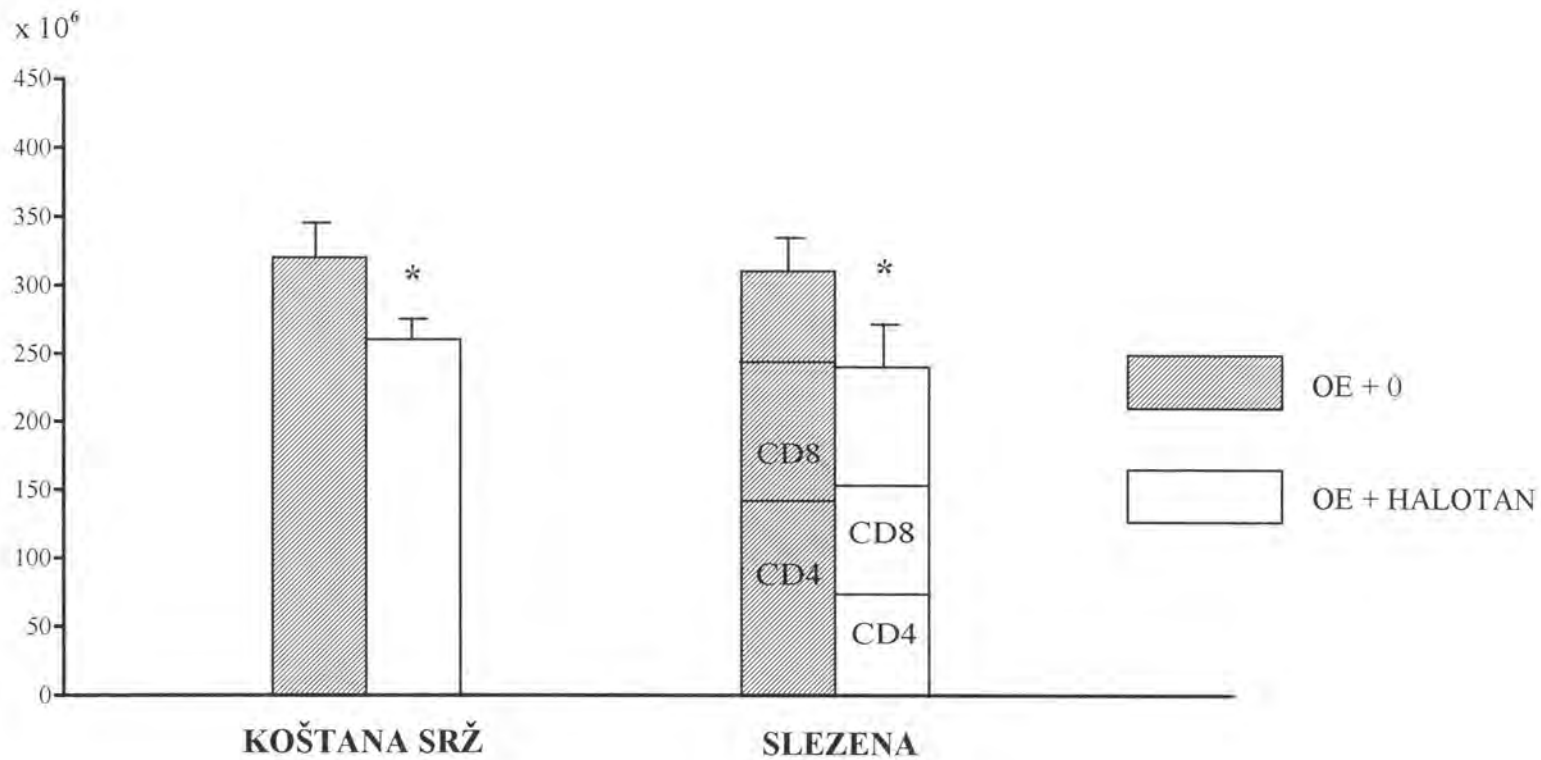
Istovremena analiza broja stanica koštane srži, te fenotipa slezene pokazala je da halotanska anestezija izaziva značajnu aplaziju koštane srži ( $p < 0,05$ ), te da u slezeni smanjuje broj CD4 i CD8 limfocita (slika 23).

Da halotanska anestezija djeluje supresivno i na imunološku reakciju staničnog tipa pokazali smo inducirajući lokalnu GVHR čiji smo intenzitet pratili određivanjem mase poplitealnih limfnih čvorova (slika 22 B). Rezultati su prikazani u mg i to kao srednja vrijednost razlika u težinama limfnih čvorova desne - injicirane i lijeve - nesenzibilizirane šapice, a pokazuju da halotanska anestezija značajno suprimira stanični imunološki odgovor sedmog dana imunološke reakcije ( $p < 0,05$ ).



n = broj životinja; \*p<0,05, \*\*\*p<0,001

Slika 22. Imunosupresivno djelovanje halotanske anestezije



\* $p < 0,05$

**Slika 23. Promjene broja stanica koštane srži i slezene nakon halotanske anestezije tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa**

### *15.2.2. Djelovanje halotanske anestezije na biokemijske pokazatelje u jetri i serumu*

Metaboličke promjene koje se javljaju četiri dana nakon jednosatnog izlaganja životinja halotanskoj anesteziji analizirali smo određivanjem nukleinskih kiselina i proteina u jetri i mjerenjem biokemijskih sastojaka seruma.

#### *15.2.2.1. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri*

Halotanska anestezija izazvala je u eksperimentalnih životinja smanjenije ukupne količine (mg/100g tjel.tež.) i koncentracije (mg/g) nukleinskih kiselina i proteina u jetri. Rezultati su prikazani kao postoci promjene u eksperimentalnoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu koja je 100% (slika 24).

#### *15.2.2.2. Promjene biokemijskih sastojaka u serumu*

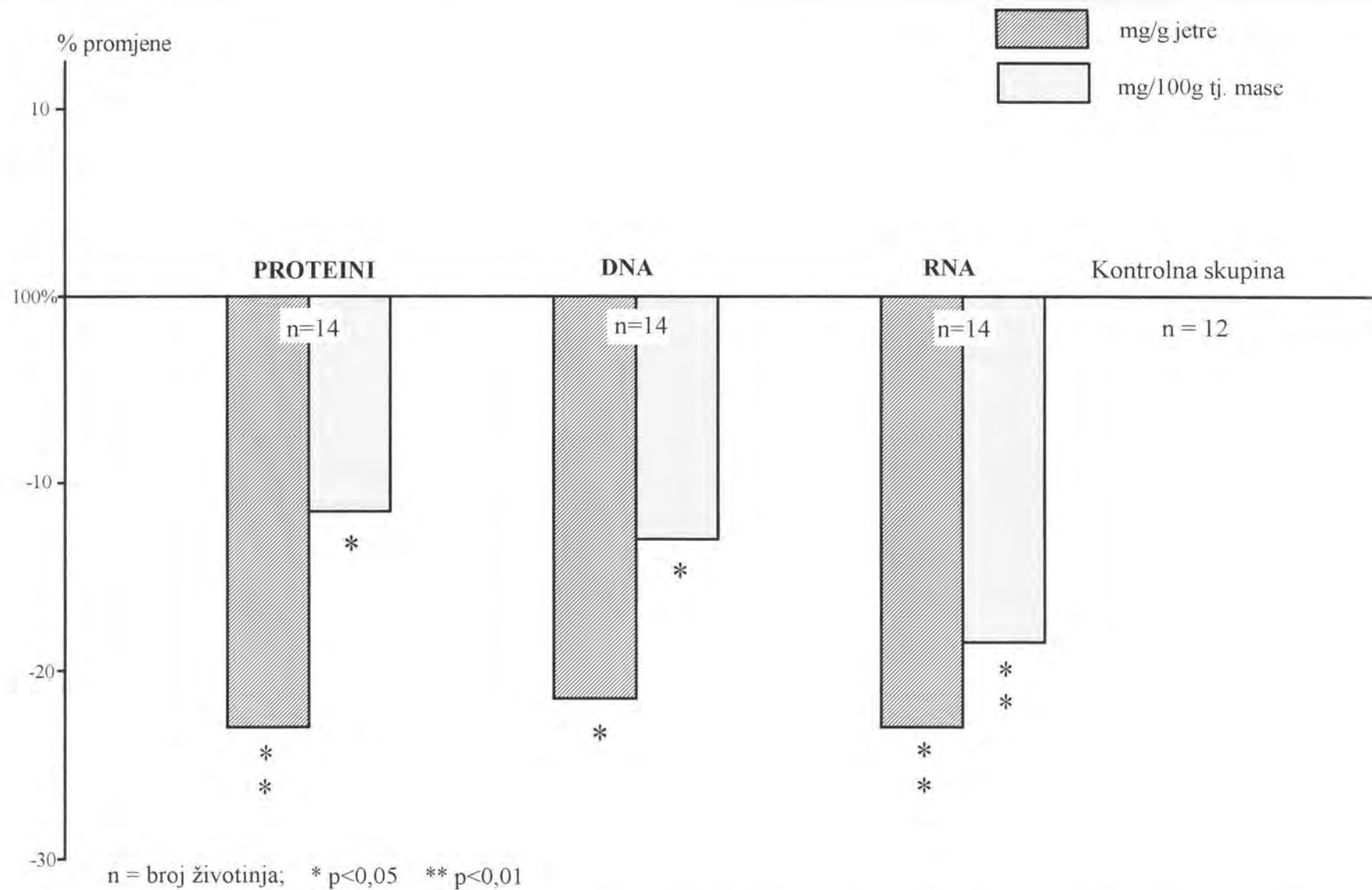
Nakon jednosatnog izlaganja senzibiliziranih životinja halotanskoj anesteziji u serumu je uočena povećana koncentracija albumina za 10 % ( $p < 0,05$ ) u odnosu na senzibilizirane životinje koje nisu bile izložene djelovanju halotana (tablica 8). Ostali biokemijski pokazatelji u serumu nisu promijenjeni.

### *15.3. Metaboličke promjene nakon primjene imunostimulatora tijekom halotanske anestezije*

S obzirom da je halotanska anestezija djelovala imunosupresivno, u nastavku smo ispitali imunokorektivna svojstva Plivnog imunostimulatora PGM-a i njegovih novih analoga. Rezultati koji se odnose na ova ispitivanja zaštićeni su patentom.

#### *15.3.1. Učinak PGM-a i njegovih analoga na imunološku reakciju humoralnog tipa*

Da bi ispitali učinak PGM-a na intenzitet imunološke reakcije humoralnog tipa, životinjama smo intraperitonealno injicirali različite doze PGM-a, odmah nakon



Slika 24. Relativan sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri životinja podvrgnutih jednosatnoj halotanskoj anesteziji

Tablica 8. Učinak halotanske anestezije na biokemijske sastojke u serumu životinja senzibiliziranih ovčjim eritrocitima

| Ispitivane životinje                          | Broj životinja | AST (IJ/L) | ALT (IJ/L) | AP (IJ/L)   | Ukupni proteini (g/L) | Albumini (g/L)     | Glukoza (mmol/L) | Ureja (mmol/L)      | Kreatinin ( $\mu$ mol/L) | Kalcij (mmol/L)     | Fosfor (mmol/L) |
|---|----------------|------------|------------|-------------|-----------------------|--------------------|------------------|---------------------|--------------------------|---------------------|-----------------|
| Kontrolna skupina (K)                         | 6-7            | 69 $\pm$ 4 | 25 $\pm$ 2 | -           | 56 $\pm$ 2            | -                  | 7,5 $\pm$ 1,1    | 9,2 $\pm$ 0,5       | 47 $\pm$ 4               | 2,4 $\pm$ 0,04      | 2,7 $\pm$ 0,1   |
| Senzibilizirane životinje (OE)                | 11-23          | 62 $\pm$ 3 | 22 $\pm$ 1 | 95 $\pm$ 7  | 56 $\pm$ 1            | 25 $\pm$ 0,4       | 6,8 $\pm$ 0,4    | *a<br>7,9 $\pm$ 0,2 | 42 $\pm$ 2               | *a<br>2,0 $\pm$ 0,1 | 2,5 $\pm$ 0,1   |
| Anestezirane senzibilizirane životinje (OE+H) | 6-16           | 60 $\pm$ 3 | 21 $\pm$ 1 | 106 $\pm$ 3 | 57 $\pm$ 1            | *b<br>28 $\pm$ 0,3 | 7,0 $\pm$ 0,3    | *c<br>8,6 $\pm$ 0,4 | 44 $\pm$ 2               | *c<br>2,2 $\pm$ 0,1 | 2,7 $\pm$ 0,1   |

Srednja vrijednost  $\pm$  standardna greška; \*p<0,05; a: K vs OE; b: OE vs OE+H; c: K vs OE+H



senzibilizacije s OE, i to uz halotansku anesteziju i bez nje. Podaci prikazani na slici 25 pokazuju da djelovanje PGM-a značajno ovisi o imunološkom statusu životinje prije primjene PGM-a. U životinja prethodno imunosuprimiranih halotanskom anestezijom, uočava se da je učinak PGM-a obrnuto proporcionalan dozi. Najveći imunostimulacijski učinak (66 %) uočen je u životinja koje su primile male doze PGM-a (10 mg/kg;  $p < 0,001$ ), dok su velike doze (100 mg/kg) izazvale imunosupresiju ( $p < 0,001$ ). U životinja koje nisu bile prethodno imunosuprimirane halotanskom anestezijom sve ispitivane doze PGM-a dovele su do značajne imunosupresije tj, smanjenja broja PFC ( $p < 0,001$ ).

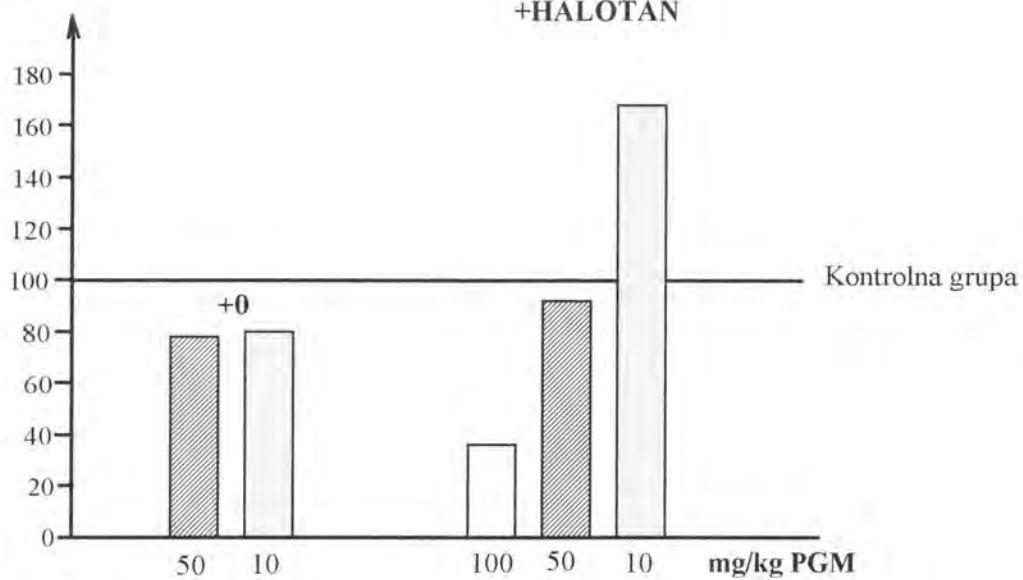
### *15.3.2. Učinak PGM-a na biokemijske pokazatelje u jetri i serumu tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa*

#### *15.3.2.1. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri*

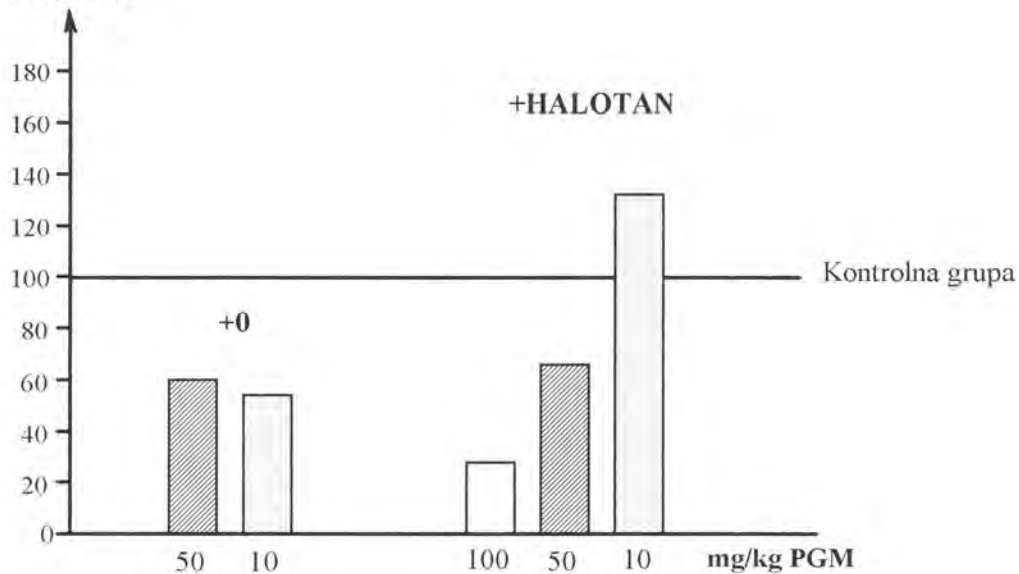
Učinak PGM-a i njegovih analoga na jetru prvobitno je ispitivan u miševa senzibiliziranih s OE i to nakon halotanske anestezije i bez nje (slika 26 i tablica 9). Male doze PGM-a (10 mg/kg) pokazale su najjače hepatomodularno djelovanje, jer su značajno povećale i ukupnu količinu (mg/100 g. tjel.tež.) i koncentraciju (mg/g) nukleinskih kiselina i proteina u jetri anesteziranih životinja. Budući da je istovremeno ova doza izazvala i najznačajniji porast broja PFC (slika 25), kako je gore opisano, postavilo se pitanje nije li ovaj hepatomodularni učinak PGM-a povezan zapravo sa stimulacijom humoralnog imunološkog odgovora. Da bismo to provjerili, ispitali smo hepatomodularno djelovanje PGM-a i njegovih analoga u nesenzibiliziranih životinja koje su bile izložene imunosupresivnom djelovanju halotanske anestezije. Rezultati pokazuju da PGM povećava količinu nukleinskih kiselina i proteina jetre i u nesenzibiliziranih miševa (slika 27), a još veći porast količine proteina u jetri dobiven je nakon primjene novih Plivinih analoga PGM-Zn i Na-acil derivata PGM-a.

U senzibiliziranih životinja koje nisu bile suprimirane halotanskom anestezijom PGM nije pokazao hepatomodularni učinak, tj. nije značajno povećao količinu i koncentraciju nukleinskih kiselina jetre. Male doze PGM-a nasuprot učinku u anesteziranih miševa čak su izazvale smanjenje ukupne količine proteina u jetri neanesteziranih životinja (slika 26).

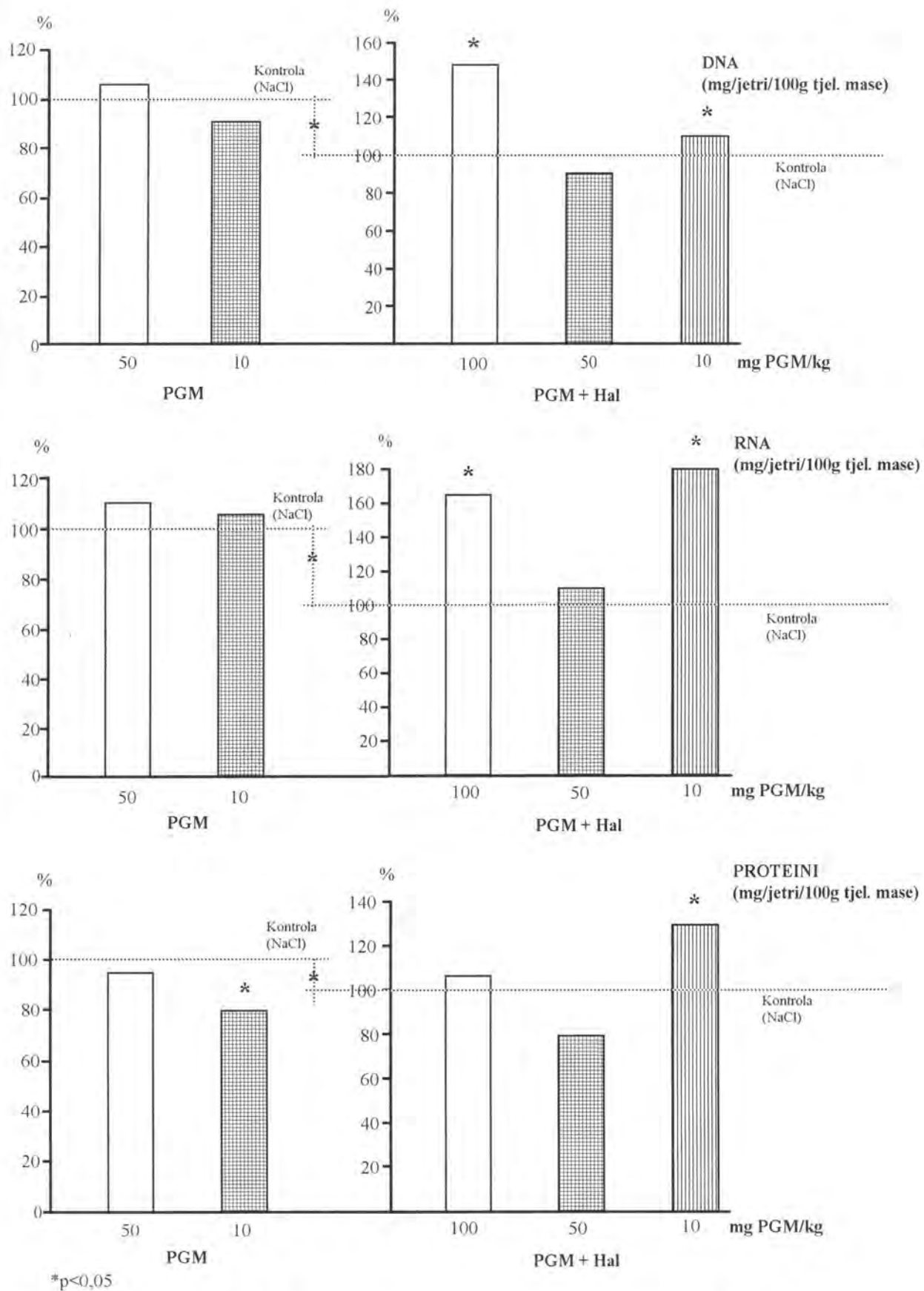
% promjene  
PFC/10<sup>6</sup>



% promjene  
PFC/slezene



**Slika 25. Učinak PGM-a na intenzitet imunološke reakcije humoralnog tipa u anestetiziranih (+ Halotan) i neanestetiziranih (+0) životinja. PGM je injiciran intraperitonealno, neposredno prije izlaganja halotanu.**





**Slika 26. Učinci PGM-a na količinu nukleinskih kiselina i proteina u jetri (mg/jetri/100 g tjel. mase) u anestetiziranih (PGM + Hal) i neanestetiziranih (PGM) senzibiliziranih miševa**

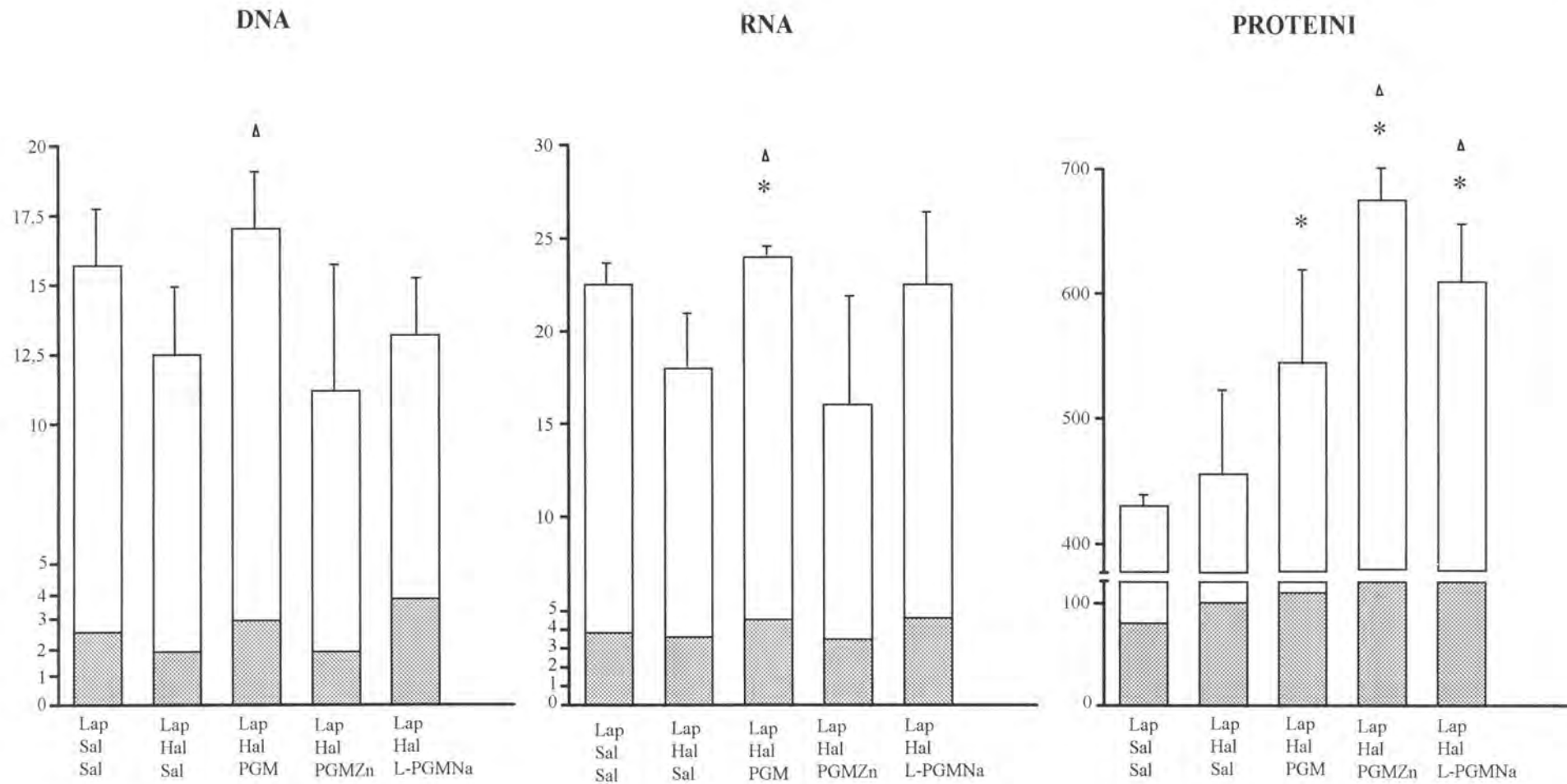
Tablica 9. Učinak PGM-a i njegovih analoga u miševa senzibiliziranih ovčjim eritrocitima nakon halotanske anestezije i bez nje na sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri

| Ispitivane životinje | DNA                |              | RNA                |              | PROTEINI           |             |
|----------------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|--------------------|-------------|
|                      | mg/100g tjel. mase | mg/g         | mg/100g tjel. mase | mg/g         | mg/100g tjel. mase | mg/g        |
| H+PGM (100mg/kg)     | *<br>10,1±2        | *<br>1,6±0,5 | *<br>15,4±4,7      | *<br>2,5±0,9 | 492±69             | 78,4±13     |
| H+PGM (50mg/kg)      | 6,2±0,6            | 1,2±0,1      | 10,1±3,0           | 1,95±0,4     | 379±57             | 78,4±12     |
| H+PGM (10mg/kg)      | *<br>8,7±2,7       | *<br>1,6±0,5 | *<br>16,7±5        | 3,1±0,8      | *<br>605±135       | *<br>114±22 |
| H+NaCl               | 6,9±1,0            | 1,2±0,2      | 9,3±1,8            | 1,7±0,4      | 464±88             | 84±15       |

| Ispitivane životinje | DNA                |         | RNA                |         | PROTEINI           |        |
|----------------------|--------------------|---------|--------------------|---------|--------------------|--------|
|                      | mg/100g tjel. mase | mg/g    | mg/100g tjel. mase | mg/g    | mg/100g tjel. mase | mg/g   |
| PGM (50mg/kg)        | 8,2±2,5            | 1,7±0,7 | 12,8±2,1           | 2,6±0,6 | 492±92             | 96±10  |
| PGM (10mg/kg)        | 7,1±1,6            | 1,5±0,4 | 12,2±1,7           | 2,5±0,4 | *<br>415±21        | 86±4   |
| NaCl                 | 7,9±1,0            | 1,6±0,5 | 11,7±2,1           | 2,2±0,5 | 530±70             | 111±27 |

srednja vrijednost ± standardna greška; \*p<0,05

mg/100 g tj. mase   
 mg/g 



\*p<0,05

Slika 27. Hepatotropni učinak PGM-a i njegovih analoga u nesenzibiliziranih životinja izloženih halotanskoj anesteziji (Hal)

### 15.3.2.2. Promjene u biokemijskim sastojcima u serumu

U serumu životinja tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa, nakon primjene PGM-a uočili smo 15 % povećanu koncentraciju kreatinina ( $p < 0,05$ ) u odnosu na senzibilizirane životinje injicirane fiziološkom otopinom. Nakon primjene PGMZn utvrdili smo pad koncentracije ukupnih proteina za oko 5 % ( $p < 0,05$ ) i porast koncentracije ureje za 20 % ( $p < 0,01$ ). PGMNa je izazvao 15 % povećanu koncentraciju ureje ( $p < 0,05$ ), a nakon davanja PGMCu 20 % je snižena katalitička aktivnost ALT ( $p < 0,05$ ) i 30 % povećana koncentracija kreatinina ( $p < 0,05$ ) u serumu senzibiliziranih životinja (tablica 10).

Kada smo usporedili učinak PGM analoga prema djelovanju samog PGM-a, uočili smo da PGMZn koji je pokazao najjači učinak na povećanje koncentracije i količine ukupnih proteina jetre, smanjuje ( $p < 0,01$ ) koncentraciju albumina (slika 28) i povećava koncentraciju ureje u serumu ( $p < 0,05$ ) za 10 % u odnosu na djelovanje samog PGM-a. Dok PGMNa povećava koncentraciju kalcija ( $p < 0,01$ ) i koncentraciju fosfora ( $p < 0,05$ ) za oko 10 % u serumu (slika 29), PGMCu smanjuje katalitičku aktivnost ALT ( $p < 0,05$ ) za oko 20%, a PGMNi smanjuje koncentraciju kreatinina ( $p < 0,05$ ) također za 20 % i značajno povećava ( $p < 0,01$ ) koncentraciju kalcija (tablica 10).

Dok je PGM u serumu senzibiliziranih životinja podvrgnutih halotanskoj anesteziji izazvao samo smanjenu koncentraciju fosfora ( $p < 0,05$ ), brojnije promjene izazvao je PGMNi gdje dodatno uočavamo 5 % smanjenu koncentraciju albumina, te pad katalitičke aktivnosti ALT ( $p < 0,05$ ) i AP ( $p < 0,01$ ), za 20 % u odnosu na životinje injicirane fiziološkom otopinom (tablica 11). PGMZn je uz halotansku anesteziju kod senzibiliziranih životinja izazvao 5 % smanjenu koncentraciju ukupnih proteina ( $p < 0,05$ ) i 20 % povećanu koncentraciju glukoze ( $p < 0,01$ ) prema vrijednostima u serumu životinja injiciranih s fiziološkom otopinom, a u odnosu na djelovanje samog PGM-a sniženu katalitičku aktivnost AST i porast katalitičke aktivnosti AP za 10 %, smanjenu koncentraciju ukupnih proteina (5%) i povećanu koncentraciju glukoze u serumu za 15 % ( $p < 0,05$ ). PGMCu je u odnosu na kontrolnu skupinu pokazao isto djelovanje kao i PGM, (jedino je smanjena koncentracija fosfora u serumu), ali u usporedbi prema djelovanju samog PGM-a PGMCu izaziva 17 % smanjenu koncentraciju ureje ( $p < 0,01$ ) i albumina 5 % ( $p < 0,05$ ). Na-acil derivat PGM-a

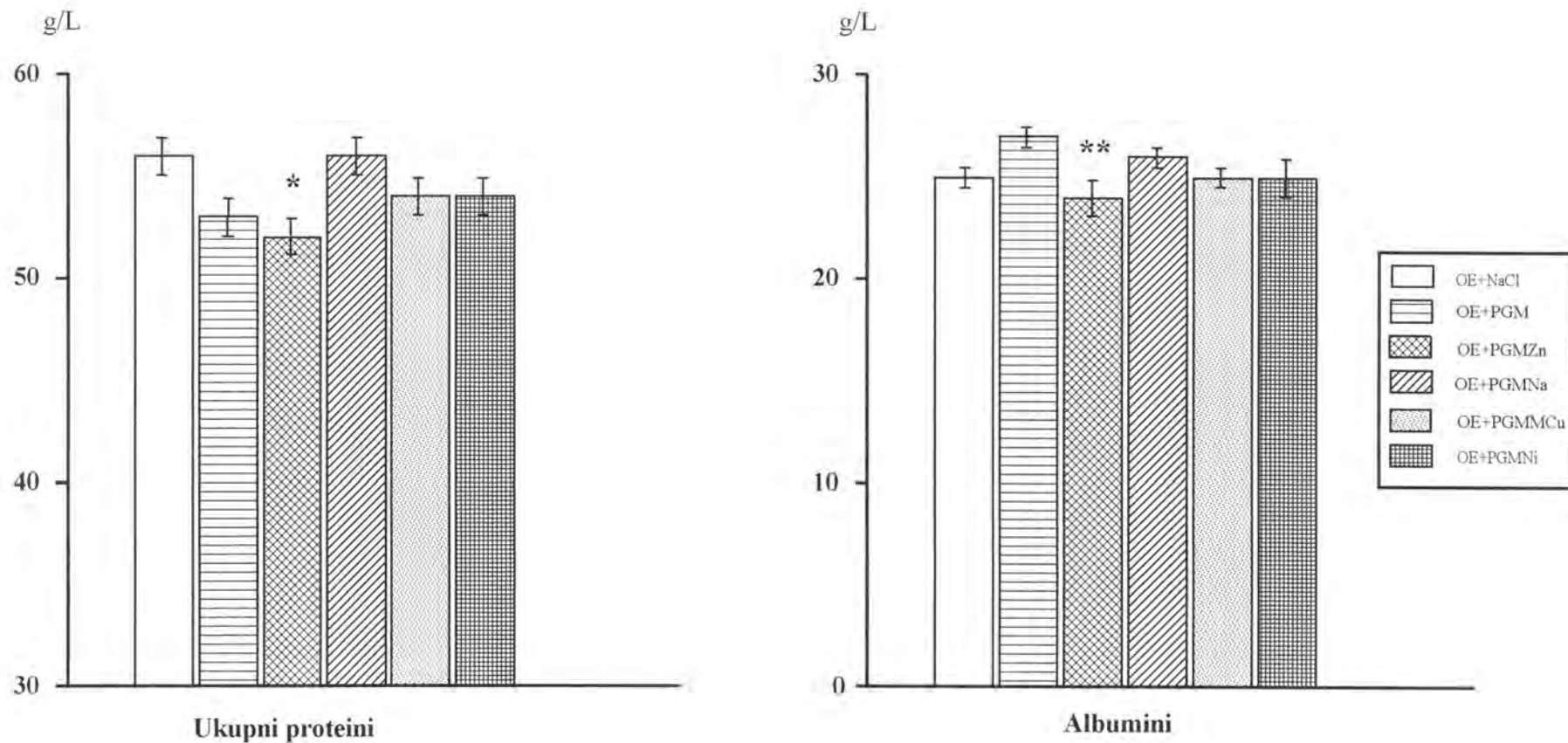


Tablica 10. Promjene biokemijskih sastojaka u serumu životinja tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa pod djelovanjem PGM-a, bez halotanske anestezije

| Ispitivane životinje | Broj životinja | AST (IJ/L) | ALT (IJ/L)         | AP (IJ/L)   | Ukupni proteini (g/L) | Albumini (g/L)   | Glukoza (mmol/L) | Ureja (mmol/L)          | Kreatinin ( $\mu$ mol/L) | Kalcij (mmol/L)       | Fosfor (mmol/L)     |
|----------------------|----------------|------------|--------------------|-------------|-----------------------|------------------|------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|
| OE+NaCl              | 11-23          | 62 $\pm$ 3 | 22 $\pm$ 1         | 95 $\pm$ 7  | 56 $\pm$ 1            | 25 $\pm$ 0,4     | 6,8 $\pm$ 0,4    | 7,9 $\pm$ 0,2           | 42 $\pm$ 2               | 2,0 $\pm$ 0,1         | 2,5 $\pm$ 0,1       |
| OE+PGM               | 5-11           | 65 $\pm$ 3 | 21 $\pm$ 1         | 101 $\pm$ 4 | 53 $\pm$ 1            | 27 $\pm$ 0,4     | 6,1 $\pm$ 0,3    | 8,2 $\pm$ 0,4           | *a<br>48 $\pm$ 1         | 2,1 $\pm$ 0,03        | 2,3 $\pm$ 0,1       |
| OE+PGMZn             | 4-11           | 62 $\pm$ 3 | 20 $\pm$ 1         | 97 $\pm$ 4  | *a<br>52 $\pm$ 1      | *b<br>24 $\pm$ 1 | 6,3 $\pm$ 0,2    | **a,*b<br>9,2 $\pm$ 0,3 | 46 $\pm$ 2               | 2,2 $\pm$ 0,05        | 2,2 $\pm$ 0,2       |
| OE+PGMNa             | 4-11           | 66 $\pm$ 4 | 20 $\pm$ 3         | 93 $\pm$ 4  | 56 $\pm$ 1            | 26 $\pm$ 0,4     | 6,2 $\pm$ 0,6    | *a<br>9,0 $\pm$ 0,5     | 44 $\pm$ 2               | **b<br>2,3 $\pm$ 0,04 | *b<br>2,6 $\pm$ 0,1 |
| OE+PGMCu             | 4-11           | 58 $\pm$ 4 | *a,b<br>17 $\pm$ 3 | 90 $\pm$ 8  | 54 $\pm$ 1            | 25 $\pm$ 0,4     | 6,4 $\pm$ 0,6    | 8,2 $\pm$ 0,5           | *a<br>56 $\pm$ 2         | 2,2 $\pm$ 0,05        | 2,5 $\pm$ 0,1       |
| OE+PGMNi             | 4-5            | 59 $\pm$ 2 | 19 $\pm$ 3         | 92 $\pm$ 5  | 54 $\pm$ 1            | 25 $\pm$ 1       | 6,6 $\pm$ 0,3    | 8,8 $\pm$ 0,6           | *b<br>40 $\pm$ 4         | **b<br>2,4 $\pm$ 0,2  | 2,4 $\pm$ 0,2       |

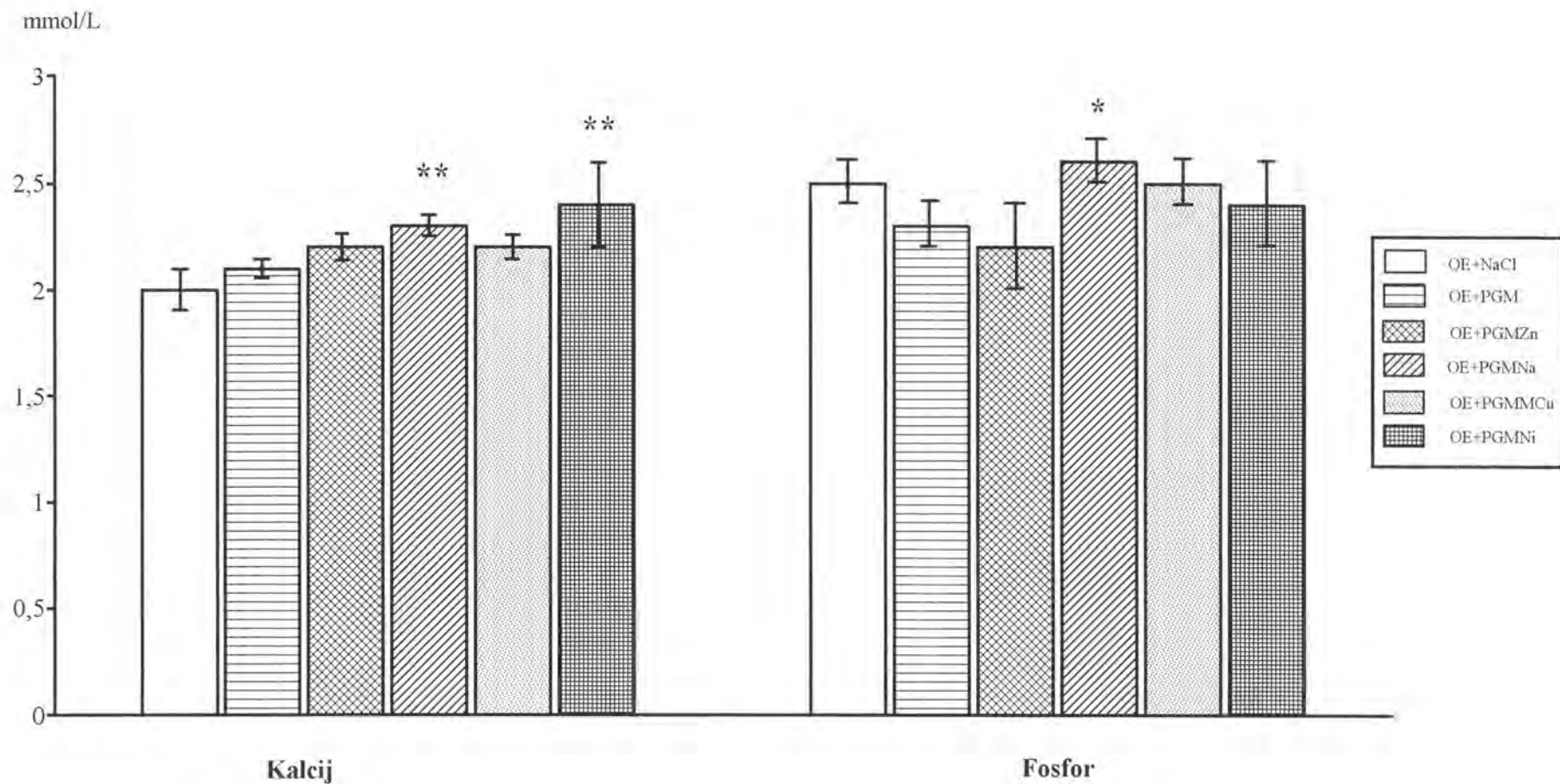
Srednja vrijednost  $\pm$  standardna greška; a: PGM i njegovi analozi prema senzibiliziranim životinjama koje su injicirane s NaCl-om  
b: analozi PGM-a prema učinku PGM-a

\*p<0,05; \*\*p<0,01



\* $p < 0,05$  prema NaCl-u; \*\* $p < 0,01$  prema PGM-u

**Slika 28. Koncentracija ukupnih proteina i albumina u serumu senzibiliziranih životinja koje su primale PGM i njegove analoge, a bez halotanske anestezije**



\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  prema PGM-u

**Slika 29. Koncentracije kalcija i fosfora u serumu životinja tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa, pod djelovanjem PGM-a i njegovih analoga, bez halotanske anestezije**

Tablica 11. Promjene biokemijskih sastojaka u serumu životinja tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa pod djelovanjem PGM-a, uz halotansku anesteziju

| Ispitivane životinje | Broj životinja | AST (IJ/L)                 | ALT (IJ/L)                   | AP (IJ/L)                    | Ukupni proteini (g/L)        | Albumini (g/L)                 | Glukoza (mmol/L)                | Ureja (mmol/L)                | Kreatinin ( $\mu$ mol/L)   | Kalcij (mmol/L) | Fosfor (mmol/L)               |
|----------------------|----------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------|-------------------------------|
| OE+NaCl+H            | 6-15           | 60 $\pm$ 3                 | 21 $\pm$ 1                   | 106 $\pm$ 3                  | 57 $\pm$ 1                   | 28 $\pm$ 0,3                   | 7,0 $\pm$ 0,3                   | 8,6 $\pm$ 0,4                 | 44 $\pm$ 2                 | 2,2 $\pm$ 0,1   | 2,7 $\pm$ 0,1                 |
| OE+PGM+H             | 6-17           | 63 $\pm$ 3                 | 24 $\pm$ 2                   | 99 $\pm$ 3                   | 56 $\pm$ 1                   | 29 $\pm$ 1                     | 7,4 $\pm$ 0,2                   | 9,1 $\pm$ 0,3                 | 47 $\pm$ 1                 | 2,2 $\pm$ 0,03  | <sup>a</sup><br>2,3 $\pm$ 0,1 |
| OE+PGMZn+H           | 6-17           | <sup>b</sup><br>54 $\pm$ 2 | 24 $\pm$ 2                   | <sup>b</sup><br>107 $\pm$ 2  | <sup>a,b</sup><br>54 $\pm$ 1 | 28 $\pm$ 0,5                   | <sup>a,b</sup><br>8,4 $\pm$ 0,4 | 8,5 $\pm$ 0,3                 | 46 $\pm$ 2                 | 2,2 $\pm$ 0,1   | 2,5 $\pm$ 0,1                 |
| OE+PGMNa+H           | 6-17           | 66 $\pm$ 4                 | 22 $\pm$ 1                   | 98 $\pm$ 2                   | <sup>a,b</sup><br>54 $\pm$ 1 | <sup>b</sup><br>27 $\pm$ 1     | 7,7 $\pm$ 0,3                   | <sup>b</sup><br>8,2 $\pm$ 0,2 | <sup>b</sup><br>41 $\pm$ 2 | 2,2 $\pm$ 0,1   | <sup>a</sup><br>2,3 $\pm$ 0,1 |
| OE+PGMCu+H           | 5-11           | 54 $\pm$ 2                 | 21 $\pm$ 2                   | 100 $\pm$ 4                  | 56 $\pm$ 1                   | <sup>b</sup><br>27 $\pm$ 0,5   | 6,8 $\pm$ 0,1                   | <sup>b</sup><br>7,6 $\pm$ 0,2 | 45 $\pm$ 2                 | 2,3 $\pm$ 0,1   | <sup>a</sup><br>2,3 $\pm$ 0,1 |
| OE+PGMNi+H           | 6-12           | 54 $\pm$ 3                 | <sup>a,b</sup><br>17 $\pm$ 1 | <sup>a,b</sup><br>88 $\pm$ 4 | 56 $\pm$ 1                   | <sup>a,b</sup><br>26 $\pm$ 0,4 | 7,5 $\pm$ 0,4                   | 8,9 $\pm$ 0,2                 | 44 $\pm$ 1                 | 2,3 $\pm$ 0,1   | <sup>a</sup><br>2,3 $\pm$ 0,1 |

Srednja vrijednost  $\pm$  standardna greška; \*p<0,05; \*\*p<0,01; a: PGM i njegovi analozi prema senzibiliziranim životinjama koje su injicirane s NaCl-om  
b: analozi PGM-a prema učinku PGM-a

smanjuje koncentraciju ukupnih proteina u serumu za oko 5 % i fosfora ( $p < 0,05$ ) prema kontrolnoj skupini, ali u odnosu prema djelovanju samog PGM-a izaziva smanjenje koncentracije ukupnih proteina i albumina za svega 2%, a ureje i kreatinina za 5 % ( $p < 0,05$ ). Na slici 30 prikazan je učinak PGM-a i njegovih analoga na katalitičku aktivnost transaminaza i AP u serumu anestetiziranih, senzibiliziranih životinja.

#### ***15.4. Promjene uzrokovane djelovanjem hormona***

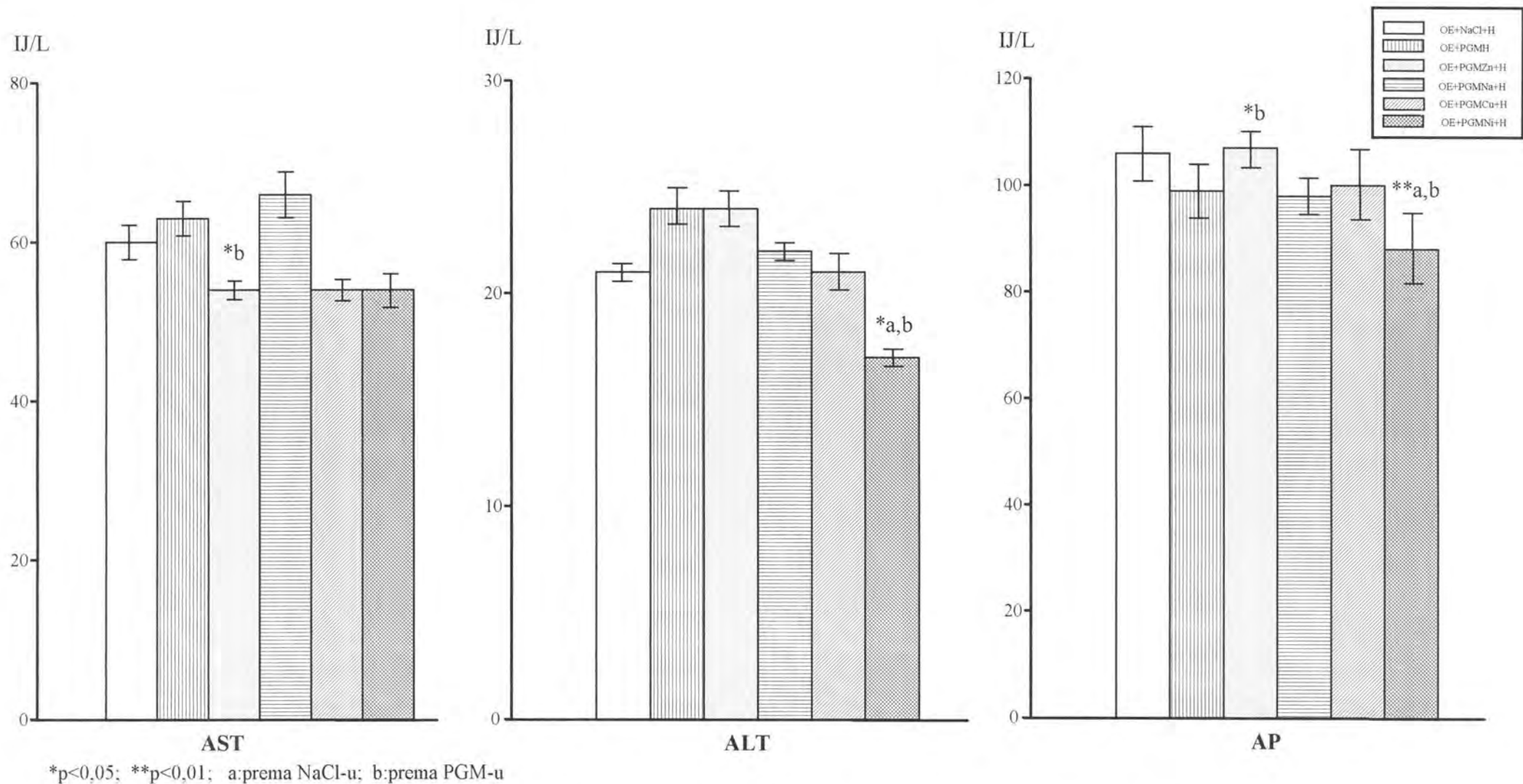
Poznato je da imunološku reakciju kontroliraju različiti hormoni koji reguliraju njen tijek i intenzitet, te osiguravaju ponovno uspostavljanje homeostaze narušene nakon ulaska antigena. U našim istraživanjima pratili smo metaboličke promjene nakon primjene hormona za koje je opisano da jedan djeluje izrazito supresivno (somatostatin; 203), a drugi poticajno na imunološku reakciju (hormon rasta, IGF).

##### ***15.4.1. Primjena somatostatina***

Somatostatin smo primjenili kratkotrajno (dvokratno injiciranje nakon senzibilizacije životinja OE), te dugotrajno (primjenom osmotskih minipumpica tijekom 6 dana). Pri tome smo učinke somatostatina na humoralni imunološki odgovor utvrđivali metodom određivanja broja PFC. Manjak hormona rasta koji nastaje kao posljedica primjene somatostatina nadomjestili smo injiciranjem egzogenog hormona rasta. Rezultati su opisani kao broj PFC po milijunu splenocita.

##### ***15.4.1.1. Učinak kratkotrajne primjene somatostatina na imunološku reakciju humoralnog tipa***

Kratkotrajna primjena somatostatina smanjuje stvaranje hemolitičkih čistina u slezeni u odnosu na kontrolnu skupinu kojoj je injicirana fiziološka otopina. Ovaj inhibicijski učinak mogao se međutim u potpunosti ispraviti istovremenom primjenom hormona rasta. Primjena hormona rasta, bez somatostatina dovela je do najvećeg stvaranja hemolitičkih čistina u



Slika 30. Učinak PGM-a i njegovih analoga na aktivnost transaminaza i AP u serumu anesteziranih, senzibiliziranih životinja



slezeni, ukazujući na stimulacijski učinak ovog hormona na humoralni imunološki odgovor (slika 31).

#### 15.4.1.1.1. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri

Iako je koncentracija i količina RNA povećana u jetri životinja injiciranih somatostatinom u odnosu na životinje koje su primile hormon rasta, ipak niti somatostatin, niti hormon rasta, a niti injicirana kombinacija dvaju hormona ne pokazuju učinak na koncentraciju i količinu nukleinskih kiselina u jetri prilikom kratkotrajnog injiciranja u odnosu na životinje kojima je injicirana fiziološka otopina (slika 32).

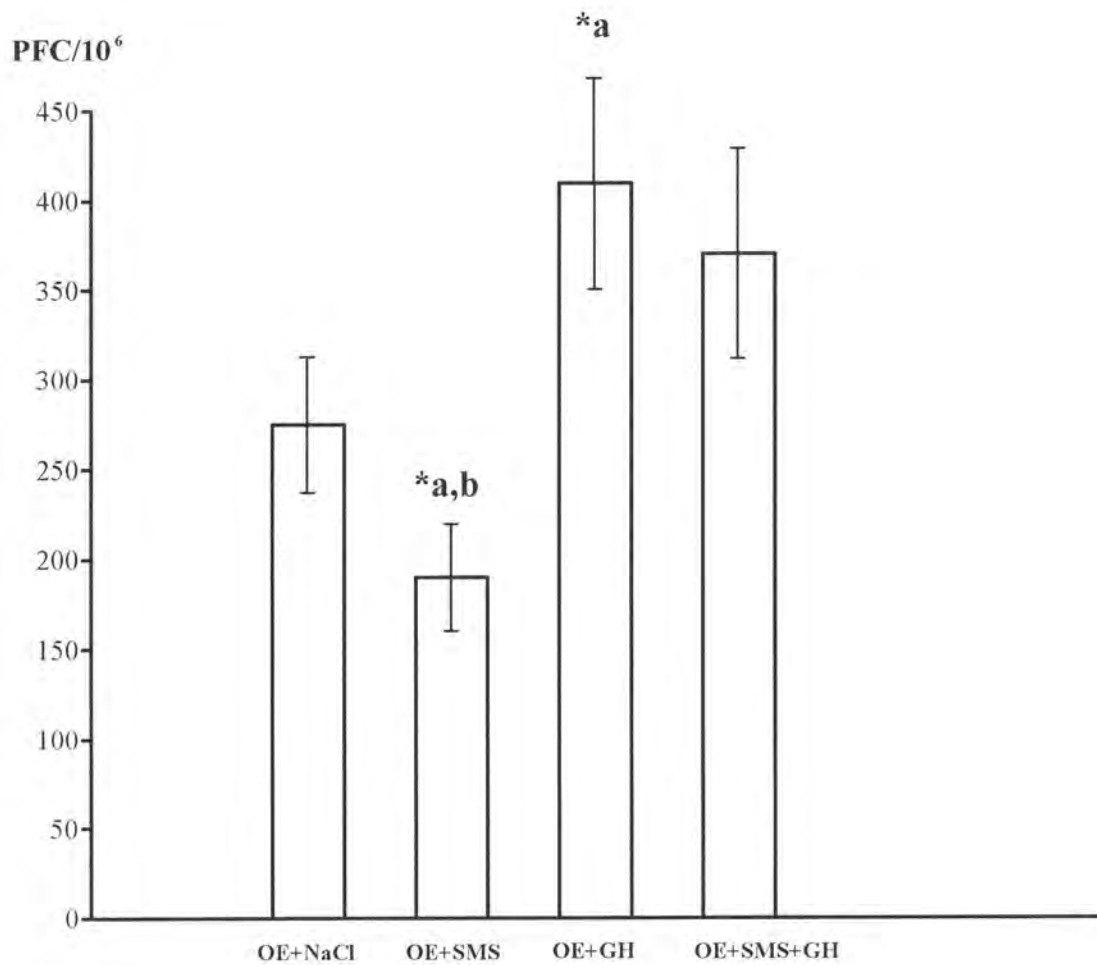
Ukupna količina proteina jetre izražena kao mg na tjelesnu težinu jednaka je u svim ispitivanim skupinama životinja, ali je koncentracija proteina (mg/g) povećana kako u životinja injiciranih somatostatinom, tako i u onih koje su primile hormon rasta u odnosu na životinje koje su injicirane fiziološkom otopinom.

#### 15.4.1.1.2. Promjene biokemijskih sastojaka u serumu

U serumu životinja kratkotrajno injiciranih sa somatostatinom i hormonom rasta uočavamo povećanje katalitičke aktivnosti ALT za gotovo 40 %, te povećanu koncentraciju kreatinina za 23 % ( $p < 0,05$ ) u odnosu na životinje koje su primale fiziološku otopinu (tablica 12).

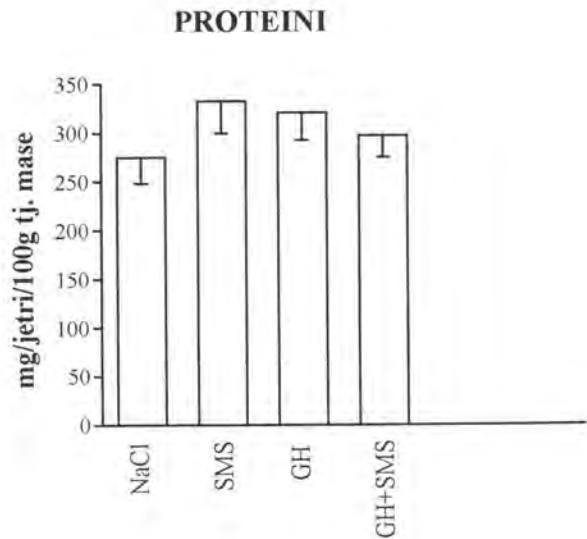
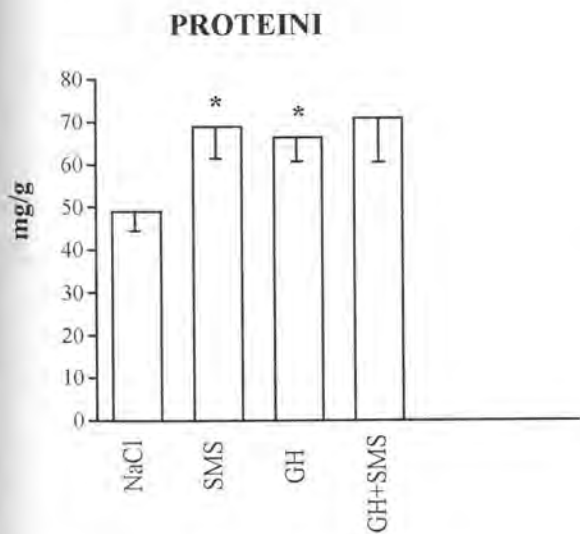
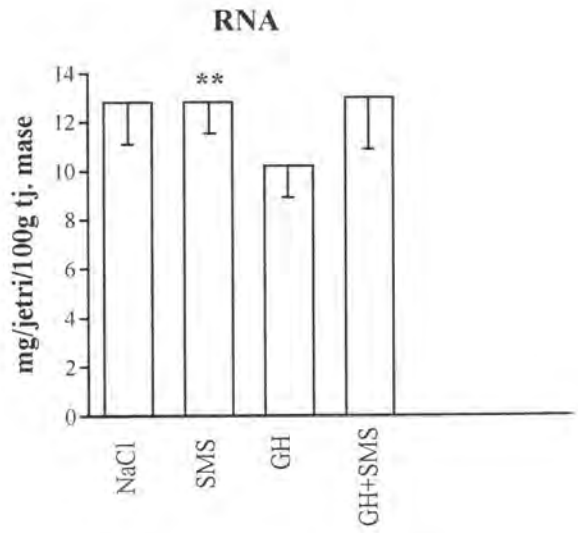
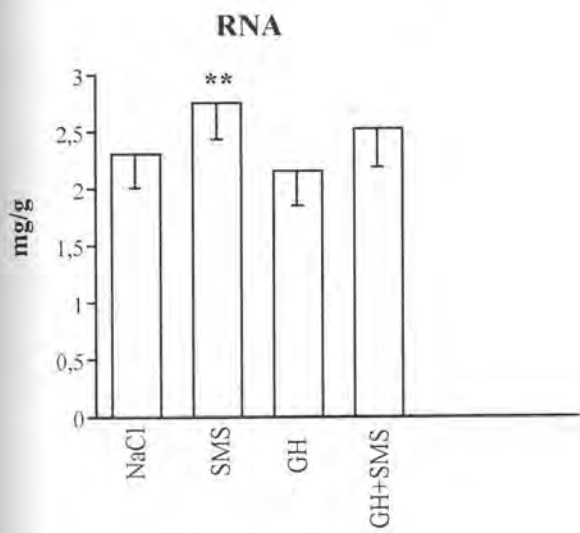
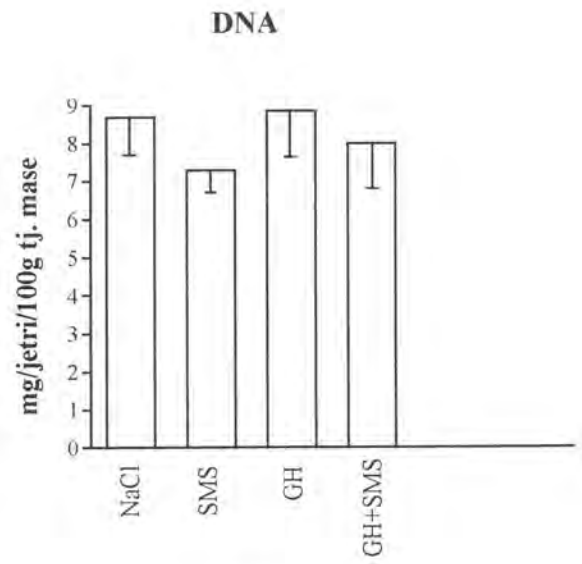
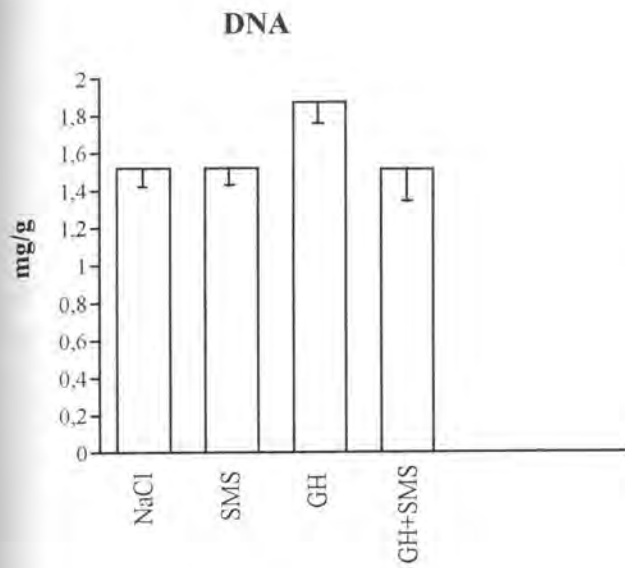
#### *15.4.1.2. Učinak dugotrajne primjene somatostatina na imunološku reakciju humoralnog tipa*

Dugotrajno davanje somatostatina putem mini pumpica (tijekom šest dana) nije rezultiralo supresijom humoralnog imunološkog odgovora, kao što je to bio slučaj pri kratkotrajnoj primjeni somatostatina. Hormon rasta je povećao stvaranje plakova u slezeni, ali niti ovi rezultati nisu bili statistički značajno različiti u odnosu na skupinu životinja koje su primale fiziološku otopinu (slika 33).



\*p<0,05; a:prema NaCl-u; b:prema GH+SMS

**Slika 31. Učinak kratkotrajne primjene somatostatina na imunološku reakciju humoralnog tipa**



\*prema NaCl-u; \*\* GH prema SMS

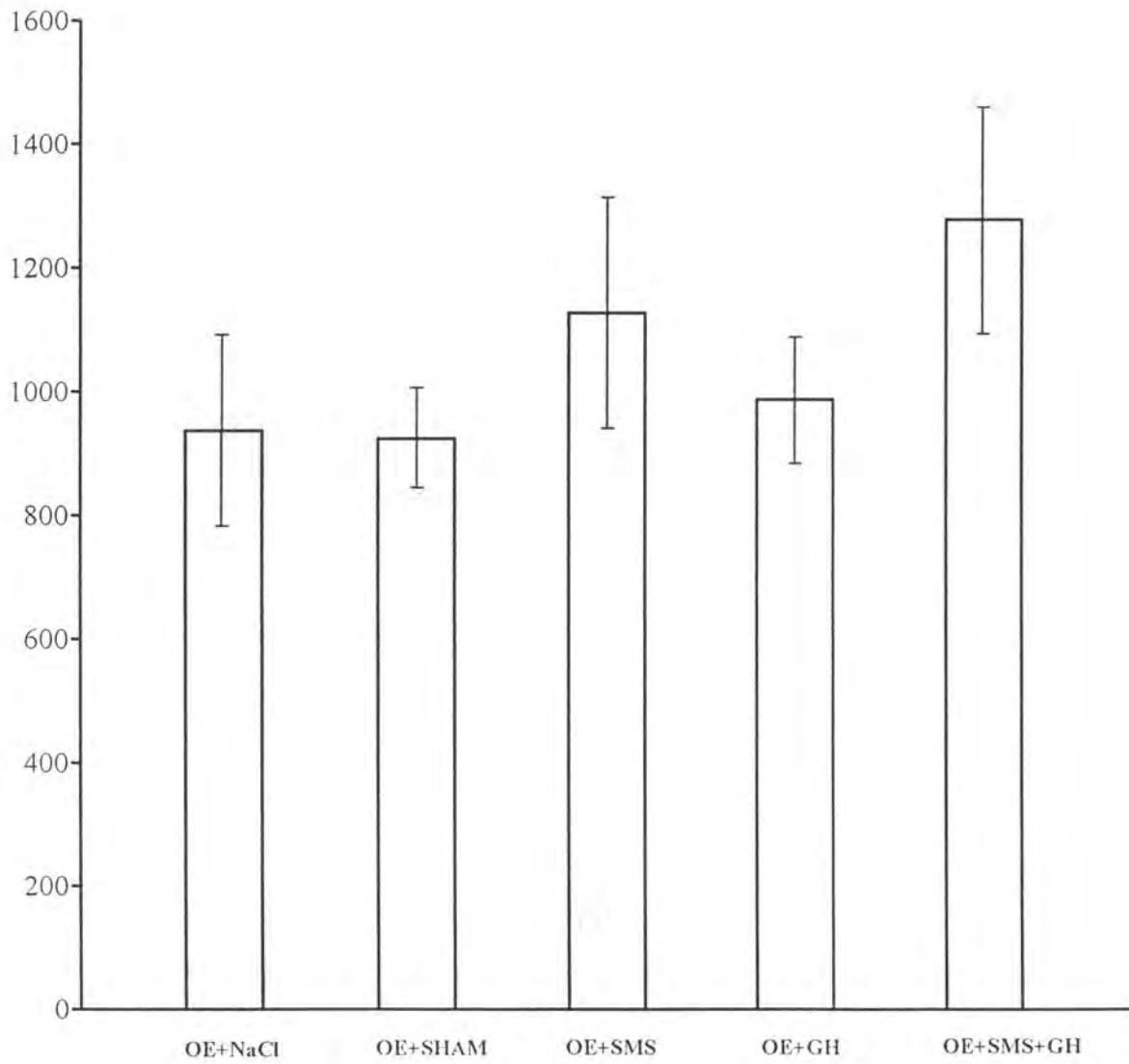
**Slika 32. Promjene u sadržaju nukleinskih kiselina i proteina u jetri uzrokovane kratkotrajnom primjenom hormona**

**Tablica 12. Učinak kratkotrajne primjene somatostatina na promjene biokemijskih sastojaka u serumu životinja tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa**

| Ispitivane životinje | Broj životinja | AST (IJ/L)  | ALT (IJ/L)      | AP (IJ/L)  | Ukupni proteini (g/L) | Albumini (g/L) | Glukoza (mmol/L) | Ureja (mmol/L)     | Kreatinin ( $\mu$ mol/L) | Kalcij (mmol/L) | Fosfor (mmol/L) |
|----------------------|----------------|-------------|-----------------|------------|-----------------------|----------------|------------------|--------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|
| OE+NaCl              | 2-4            | 68 $\pm$ 12 | 18 $\pm$ 1      | 58 $\pm$ 5 | 60 $\pm$ 2            | 28 $\pm$ 1     | 4,2 $\pm$ 0,2    | 6,3 $\pm$ 0,4      | 48 $\pm$ 2               | 2,0 $\pm$ 0,1   | 3,4 $\pm$ 0,1   |
| OE+SMS               | 2-5            | 74 $\pm$ 5  | *<br>26 $\pm$ 1 | 67 $\pm$ 7 | 66 $\pm$ 3            | 30 $\pm$ 1     | 4,2 $\pm$ 0,3    | 7,0 $\pm$ 0,6      | *<br>59 $\pm$ 3          | 2,1 $\pm$ 0,1   | 3,8 $\pm$ 0,3   |
| OE+GH                | 2-5            | 75 $\pm$ 2  | *<br>23 $\pm$ 1 | 66 $\pm$ 6 | 62 $\pm$ 1            | 29 $\pm$ 0,4   | 3,4 $\pm$ 0,3    | 6,9 $\pm$ 0,2      | 59 $\pm$ 5               | 2,2 $\pm$ 0,1   | 3,7 $\pm$ 0,2   |
| OE+SMS+GH            | 2-4            | 65 $\pm$ 3  | 25 $\pm$ 3      | 64 $\pm$ 9 | 67 $\pm$ 5            | 31 $\pm$ 1     | 4,6 $\pm$ 0,4    | *<br>8,2 $\pm$ 0,5 | *<br>59 $\pm$ 3          | 2,1 $\pm$ 0,1   | 3,7 $\pm$ 0,3   |

srednja vrijednost  $\pm$  standardna greška; \*p<0,05

PFC/10<sup>6</sup>



Slika 33. Učinak dugotrajne primjene somatostatina na imunološku reakciju humoralnog tipa

#### 15.4.1.2.1. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri

Količina i koncentracija DNA u jetri životinja tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa značajno su smanjene zbog kontinuiranog davanja somatostatina ( $p < 0,05$ ). Injiciranje hormona rasta ne mijenja količinu i koncentraciju DNA u odnosu na kontrolne skupine (životinje injicirane fiziološkom otopinom i lažno operirane) i te su vrijednosti značajno veće no u životinja injiciranih somatostatinom ( $p < 0,05$ ). Istovremeno injiciranje somatostatina i hormona rasta povećava i količinu i koncentraciju DNA u jetri u odnosu na životinje injicirane fiziološkom otopinom (slika 34).

Količina i koncentracija RNA u jetri životinja injiciranih somatostatinom manja je no u kontrolnim skupinama, a snižena je i količina proteina i to kako u odnosu na životinje injicirane fiziološkom otopinom i lažno operirane, tako i one koje su primale hormon rasta i kombinaciju dvaju hormona ( $p < 0,05$ ). Koncentracija ukupnih proteina u jetri pod djelovanjem somatostatina niža je samo u odnosu na skupinu životinja koje su primale istovremeno somatostatin i hormon rasta.

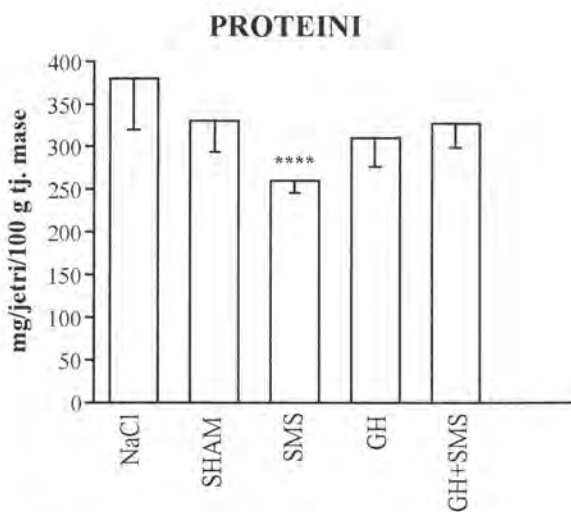
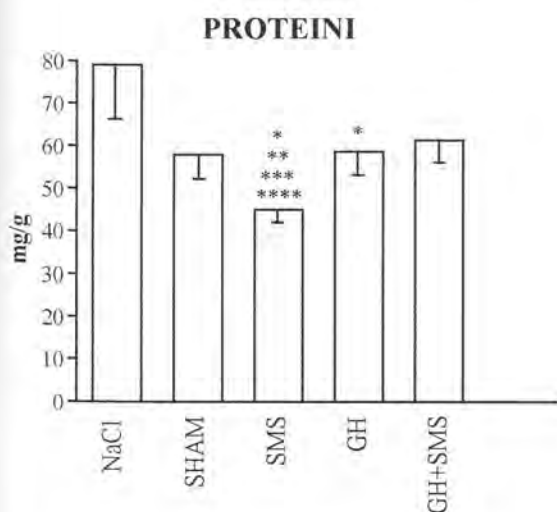
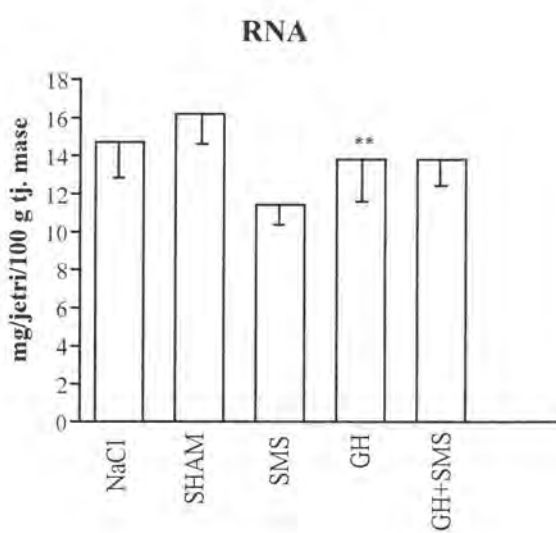
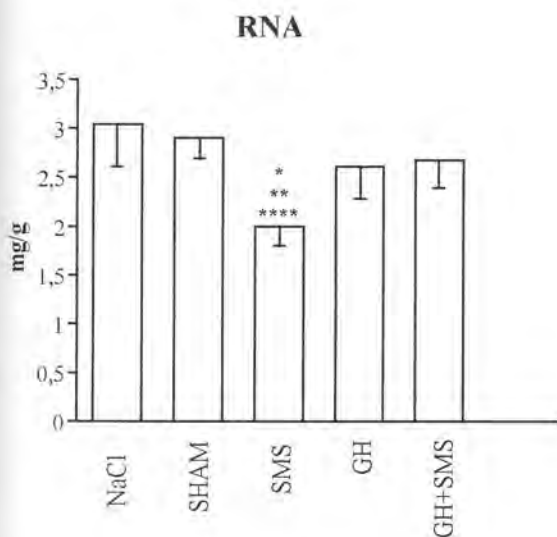
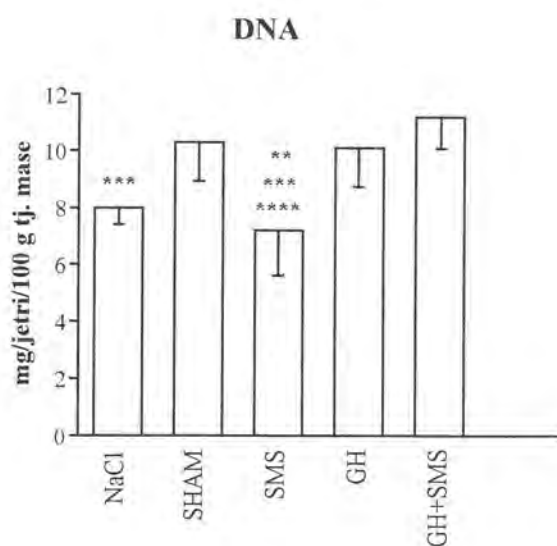
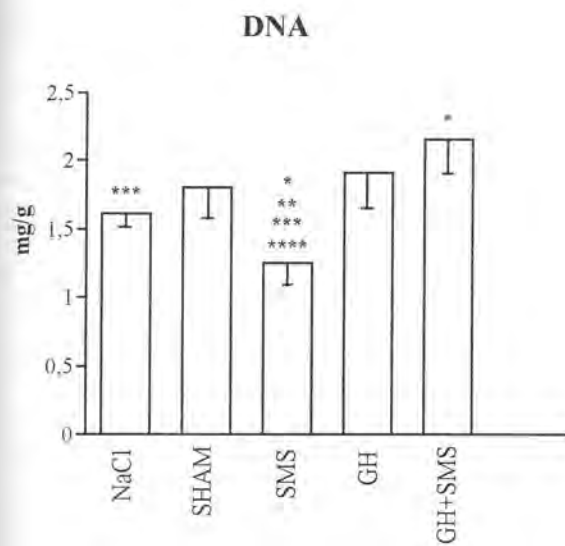
#### 15.4.1.2.2. Promjene biokemijskih sastojaka u serumu

Dugotrajno injiciranje somatostatina i hormona rasta izaziva u serumu pokusnih životinja povećanu katalitičku aktivnost ALT i AST (slika 35) i 7 % povećanu koncentraciju proteina ( $p < 0,05$ ). Takav porast nije uočen u serumu kontrolnih životinja, onih koje su primile istovremeno oba hormona i u lažno operiranih (životinjama su zbog kontrole implantirane pumpice bez injiciranja hormona). Koncentracija albumina u serumu svih grupa životinja injiciranih hormonima povećana je 10 % u odnosu na kontrolnu skupinu životinja koje su primale fiziološku otopinu (tablica 13).

#### 15.4.2. Primjena IGF- $\alpha$

Imunološka reakcija staničnog tipa inducirana je u  $F_1$  hibrida (CBA/BALB/c) miševa inokulacijom splenocita porijeklom iz BALB/c miševa u lijevu nožicu, a IGF je bio injiciran





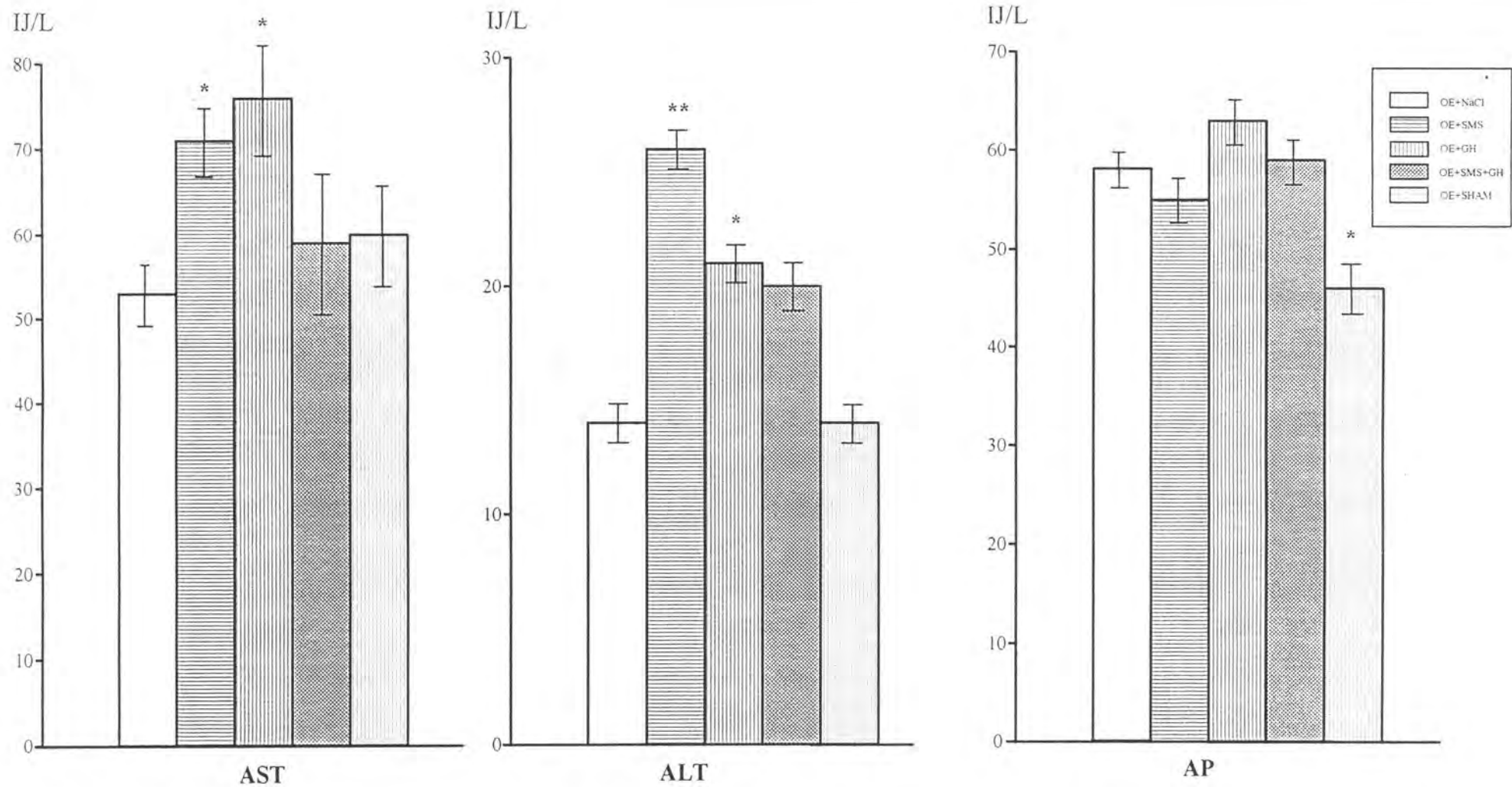
\*značajnost ( $p < 0,05$ ) prema NaCl-u

\*\*značajnost ( $p < 0,05$ ) prema SHAM

\*\*\*značajnost ( $p < 0,05$ ) prema SMS

\*\*\*\*značajnost ( $p < 0,05$ ) prema GH+SMS

**Slika 34. Promjene u sadržaju nukleinskih kiselina i proteina u jetri uzrokovane dugotrajnom primjenom hormona**



\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

Slika 35. Aktivnost enzima u serumu životinja pod utjecajem dugotrajnog učinka somatostatina tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa

Tablica 13. Učinak dugotrajne primjene somatostatina na promjene biokemijskih sastojaka u serumu životinja tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa

| Ispitivane životinje | Broj životinja | AST (IJ/L)      | ALT (IJ/L)       | AP (IJ/L)        | Ukupni proteini (g/L) | Albumini (g/L)   | Glukoza (mmol/L) | Ureja (mmol/L)     | Kreatinin ( $\mu$ mol/L) | Kalcij (mmol/L)     | Fosfor (mmol/L) |
|----------------------|----------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|-----------------|
| OE+NaCl              | 4-5            | 53 $\pm$ 4      | 14 $\pm$ 2       | 58 $\pm$ 2       | 52 $\pm$ 0,5          | 25 $\pm$ 0,4     | 5,0 $\pm$ 0,2    | 7,8 $\pm$ 0,3      | 50 $\pm$ 2               | 1,8 $\pm$ 0,05      | 2,7 $\pm$ 0,1   |
| OE+SMS               | 5              | *<br>71 $\pm$ 4 | **<br>26 $\pm$ 2 | 55 $\pm$ 3       | *<br>56 $\pm$ 2       | *<br>27 $\pm$ 1  | 4,7 $\pm$ 0,3    | *<br>7,0 $\pm$ 0,1 | 52 $\pm$ 1,5             | 1,9 $\pm$ 0,2       | 2,8 $\pm$ 0,1   |
| OE+GH                | 3-5            | 76 $\pm$ 7      | *<br>21 $\pm$ 2  | 63 $\pm$ 3       | *<br>56 $\pm$ 1       | **<br>28 $\pm$ 1 | 4,9 $\pm$ 0,4    | 6,7 $\pm$ 0,5      | 47 $\pm$ 2               | *<br>2,0 $\pm$ 0,04 | 3,0 $\pm$ 0,1   |
| OE+SMS+GH            | 4-5            | 59 $\pm$ 8      | 20 $\pm$ 3       | 59 $\pm$ 3       | 55 $\pm$ 1            | *<br>28 $\pm$ 1  | 4,4 $\pm$ 0,2    | 8,2 $\pm$ 0,6      | 51 $\pm$ 2               | *<br>2,0 $\pm$ 0,1  | 2,6 $\pm$ 0,1   |
| OE+SHAM              | 2-5            | 60 $\pm$ 6      | 14 $\pm$ 2       | **<br>46 $\pm$ 3 | 51 $\pm$ 1            | 25 $\pm$ 1       | 5,5 $\pm$ 0,3    | 8,1 $\pm$ 0,4      | 53 $\pm$ 2               | 2,0 $\pm$ 0,1       | -               |

srednja vrijednost  $\pm$  standardna greška; \*p<0,05; \*\*p<0,01

životinjama istovremeno u obje noge, dva puta dnevno; odmah po indukciji imunološke reakcije i nakon osam sati (s.c. 2x15 µg po životinji).

#### *15.4.2.1. Učinak primjene IGF-a na imunološku reakciju staničnog tipa*

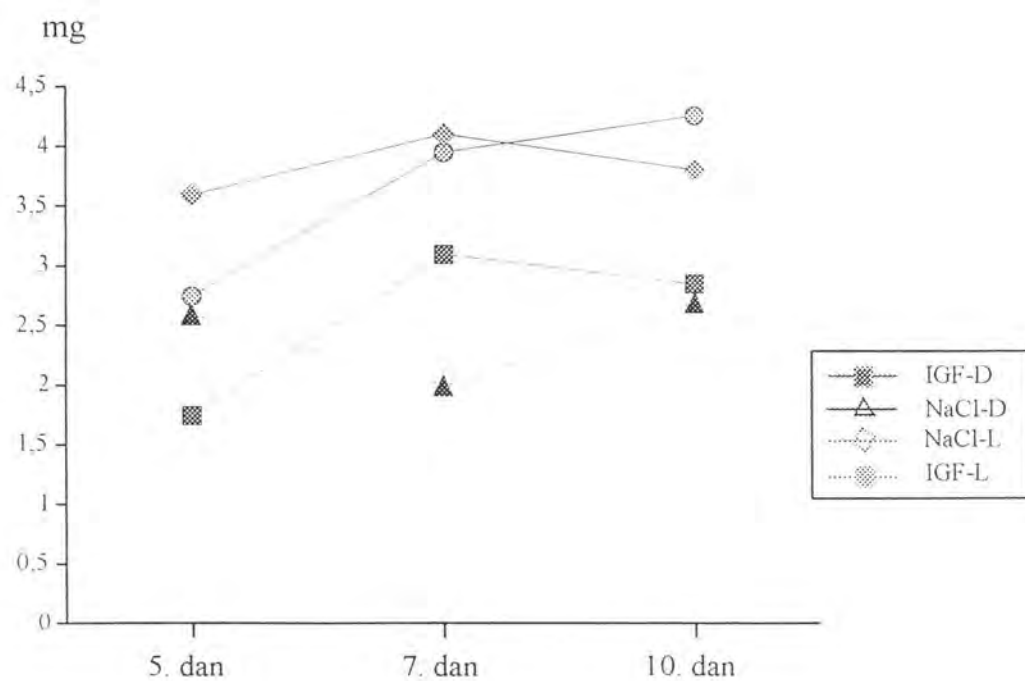
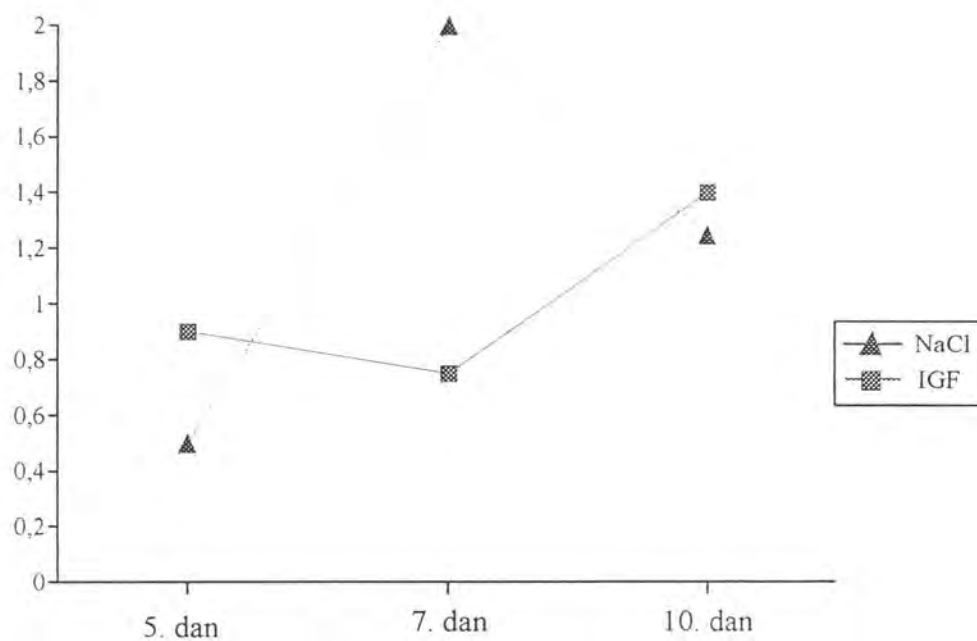
Dinamiku lokalne imunološke reakcije staničnog tipa prikazali smo kao razlike u težinama poplitealnih limfnih čvorova lijeve nožice u koju su injicirani splenociti i desne nesenzibilizirane nožice. Na gornjem dijelu slike 36. vidljivo je da IGF inhibira povećanje poplitealnih limfnih čvorova i pomiče vršak reakcije prema desetom danu. Rezultati u donjem dijelu slike pokazuju da IGF povećava i težinu kontralateralnih (nesenzibiliziranih) limfnih čvorova u kojima nije bila inducirana imunološka reakcija, ali u koju je bio injiciran IGF (IGF je davan dva puta dnevno, a ukupna doza bila je podijeljena i injicirana u obje nožice). Moguće je stoga da je rani limfotropni učinak IGF-a prekrrio stvarne promjene u dinamici lokalne GVH reakcije, koju smo određivali iz razlike u težinama poplitealnih limfnih čvorova.

Analiza broja stanica u limfatičkim organima za vrijeme indukcije lokalne GVHR (slika 37) također upućuje na inhibitorni učinak IGF-a na slezenu (sedmog dana) i koštanu srž (desetog dana).

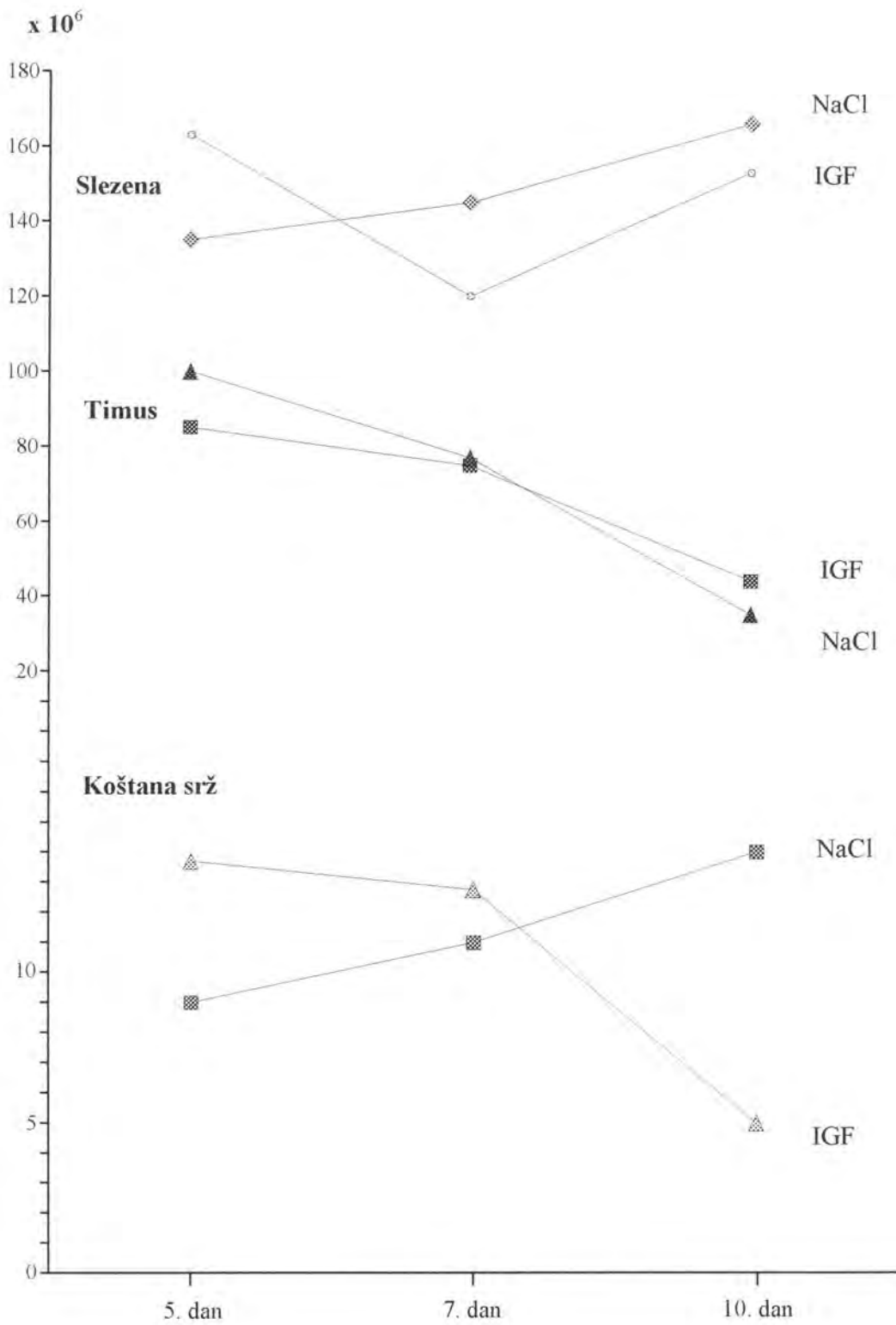
##### *15.4.2.1.1. Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri*

Iako primjena IGF-a ne mijenja bitno sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri tijekom imunološke reakcije staničnog tipa, ipak se uočavaju određeni učinci na dinamiku promjena. Dok se koncentracija i količina DNA u životinja koje nisu primale IGF smanjuje tijekom cijele imunološke reakcije, nakon primjene IGF-a uočavamo da se koncentracija i količina DNA povećavaju idući prema desetom danu imunološke reakcije. Ukupna količina proteina u jetri životinja injiciranih s IGF-om najveća je sedmog dana, a desetog dana ponovo pada (slika 38).

mg (L-D)

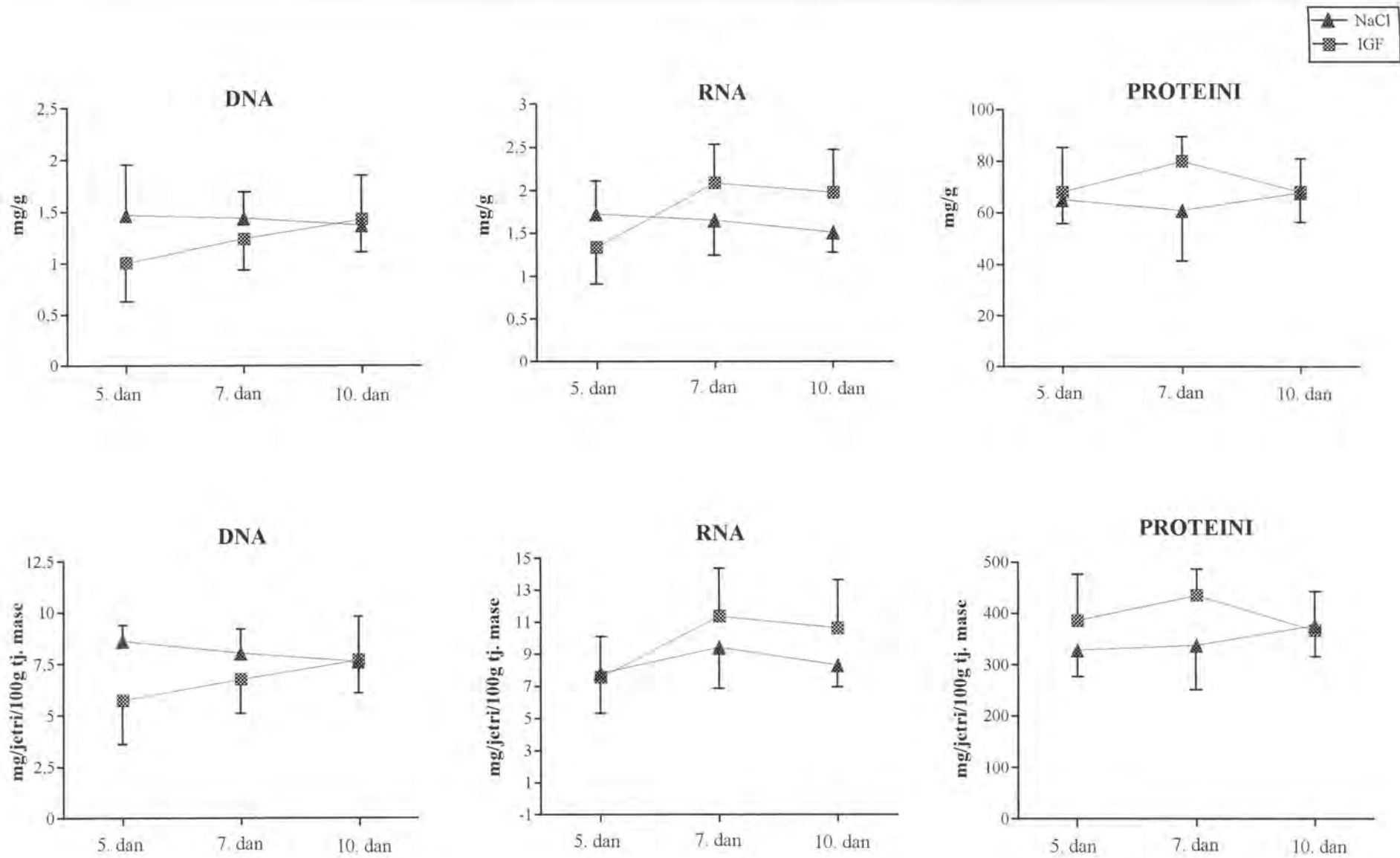


Slika 36. Učinak IGF-a na imunološku reakciju staničnog tipa



**Slika 37. Učinak IGF-a na staničnost slezene, timusa i koštane srži životinja tijekom imunološke reakcije staničnog tipa**





Slika 38. Učinak IGF-a na sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri tijekom imunološke reakcije staničnog tipa

#### 15.4.2.1.2. Promjene biokemijskih sastojaka u serumu

Tijekom lokalne GVHR u serumu životinja tretiranih IGF-om uočen je porast katalitičke aktivnosti ALT sedmog dana imunološke reakcije za 66 %, te 25 % povećana koncentracija glukoze i 20 % veća koncentracija kreatinina ( $p < 0,05$ ) desetog dana reakcije (tablica 14).

Tablica 14. Učinak IGF-a na dinamiku biokemijskih promjena u serumu životinja tijekom imunološke reakcije staničnog tipa

| Ispitivane životinje  | AST (IJ/L)         | ALT (IJ/L)             | AP (IJ/L)         | Ukupni proteini (g/L) | Albumini (g/L)      | Glukoza (mmol/L)          | Ureja (mmol/L)       | Kreatinin ( $\mu$ mol/L) | Kalcij (mmol/L)       | Fosfor (mmol/L)      | CRP (mg/L)           |
|-----------------------|--------------------|------------------------|-------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| NaCl + splen. 5. dan  | 65 $\pm$ 14<br>(3) | 11 $\pm$ 3<br>(3)      | 69 $\pm$ 2<br>(3) | 57 $\pm$ 4<br>(2)     | 26 $\pm$ 3<br>(2)   | 8,1 $\pm$ 1,5<br>(2)      | 6,1 $\pm$ 0,4<br>(2) | 40 $\pm$ 15<br>(2)       | -                     | -                    | 6,7 $\pm$ 1,9<br>(3) |
| IGF + splen. 5. dan   | 58 $\pm$ 13<br>(3) | 12 $\pm$ 1<br>(3)      | 81 $\pm$ 5<br>(3) | 58 $\pm$ 1<br>(3)     | 25 $\pm$ 1<br>(3)   | 5,9 $\pm$ 0,4<br>(3)      | 5,5 $\pm$ 0,2<br>(2) | 39 $\pm$ 8<br>(2)        | -                     | -                    | 8,3 $\pm$ 4,3<br>(3) |
| NaCL + splen. 7. dan  | 50 $\pm$ 4<br>(4)  | 11 $\pm$ 1<br>(4)      | 85 $\pm$ 6<br>(4) | 58 $\pm$ 1<br>(4)     | 28 $\pm$ 1<br>(4)   | 7,0 $\pm$ 0,5<br>(4)      | 7,8 $\pm$ 0,3<br>(4) | 51 $\pm$ 4<br>(4)        | 2,2 $\pm$ 0,01<br>(4) | 2,2 $\pm$ 0,1<br>(4) | 5,3 $\pm$ 2,3<br>(4) |
| IGF + splen. 7. dan   | 60 $\pm$ 3<br>(4)  | *<br>18 $\pm$ 2<br>(4) | 69 $\pm$ 4<br>(4) | 58 $\pm$ 2<br>(4)     | 28 $\pm$ 1<br>(4)   | 6,7 $\pm$ 0,1<br>(4)      | 7,0 $\pm$ 0,4<br>(4) | 48 $\pm$ 1<br>(4)        | 2,4 $\pm$ 0,1<br>(4)  | 2,3 $\pm$ 0,1<br>(4) | 7,5 $\pm$ 1,3<br>(4) |
| NaCL + splen. 10. dan | 58 $\pm$ 5<br>(3)  | 10 $\pm$ 2<br>(4)      | 66 $\pm$ 4<br>(4) | 53 $\pm$ 1<br>(4)     | 25 $\pm$ 1<br>(4)   | 6,3 $\pm$ 0,3<br>(4)      | 6,9 $\pm$ 0,2<br>(4) | 41 $\pm$ 3<br>(4)        | 2,2 $\pm$ 0,03<br>(4) | 2,0 $\pm$ 0,1<br>(4) | 1,8 $\pm$ 0,3<br>(4) |
| IGF + splen. 10. dan  | 53 $\pm$ 3<br>(4)  | 6 $\pm$ 1<br>(4)       | 71 $\pm$ 4<br>(4) | 56 $\pm$ 0,3<br>(4)   | 26 $\pm$ 0,3<br>(4) | *<br>7,8 $\pm$ 0,2<br>(4) | 7,1 $\pm$ 0,3<br>(4) | *<br>49 $\pm$ 1<br>(4)   | 2,4 $\pm$ 0,1<br>(3)  | 1,7 $\pm$ 0,1<br>(3) | 8,8 $\pm$ 3,7<br>(4) |

srednja vrijednost  $\pm$  standardna greška; ( ) - broj životinja u grupi; \*p<0,05

**RASPRAVA**

Poznato je da postoji dvosmjerna komunikacija između neuroendokrinog i imunološkog sustava (31), te da su hormoni, neurotransmiteri, polipeptidi i citokini zajedničke molekule koje preko gotovo identičnih receptora prenose signale i informacije između njih. Osim toga, ove molekule mogu modulirati i genetički određene funkcije brojnih drugih organa, pa se može reći da su oba sustava odgovorna općenito za komunikaciju između stanica, te za održavanje homeostaze organizma (208).

Poremećaji homeostaze izazvani infekcijom, ozljedom ili tumorskim rastom dovode do otpuštanja citokina čija je uloga u imunološkom sustavu poznata i opisana (11).

Uloga jetre u nespecifičnoj imunološkoj reakciji izuzetno je značajna i dobro opisana, jer se proteini akutne faze sintetiziraju upravo u hepatocitima, a pod utjecajem citokina i ostalih medijatora dešavaju se i druge brojne metaboličke promjene, koje međutim nisu dovoljno poznate.

Cilj je ovog rada bio ispitati metaboličke promjene u jetri i serumu tijekom specifične imunološke reakcije staničnog i humoralnog tipa, te modificiranih imunoloških reakcija kako bismo detaljnije ispitali čimbenike koji utječu na njih.

Metaboličke promjene u jetri pratili smo određivanjem sadržaja proteina i nukleinskih kiselina u jetri s jedne strane, te određivanjem nekih serumskih pokazatelja koji su vezani za funkciju jetre kao što su: transaminaze (AST i ALT), alkalna fosfataza, ukupni proteini, albumini, ureja glukoza i dr.

Naši rezultati pokazali su da se u serumu miševa četvrtog dana nakon intraperitonealnog injiciranja OE, a u vrijeme maksimalne proizvodnje protutijela, smanjuje koncentracija ureje i kalcija u odnosu na životinje injicirane fiziološkom otopinom (tablica 7). Sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri miševa nakon senzibilizacije nije promijenjen u odnosu na kontrolne miševe (slika 14).

Smanjena koncentracija ureje u serumu tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa mogla bi biti posljedica smanjenog katabolizma aminokiselina, odnosno povećane sinteze proteina u jetri. To može biti i posljedica akutnog oštećenja jetre (82), ili nekih drugih oboljenja, no Lum i sur. su pokazali da se pri rutinskim određivanjima u ljudi u samo 1% slučajeva mogu naći snižene vrijednosti za ureju u serumu (159). U našim pokusima inducirane imunološke reakcije, snižena koncentracija ureje u serumu mogla bi biti

posljedica preusmjeravanja metaboličkih puteva u jetri, u kojoj u sklopu obrambenih reakcija dolazi do povećane sinteze proteina akutne faze. Ispitujući učinak hormona rasta i IGF-a Grofte i sur. (94) pokazali su da oba hormona, svaki posebno, ali i mnogo intenzivnije kod istovremene primjene, snižavaju sintezu ureje, čime se pospješuje sinteza proteina u organima. Smatraju da je takav učinak posljedica smanjene translacije enzima ureja ciklusa, jer je razina mRNA za enzime ureja ciklusa bila smanjena nakon primjene hormona. U našim pokusima pri primjeni IGF-a u imunološkoj reakciji staničnog tipa, nismo uočili promjenu u koncentraciji ureje u serumu, a nije se mijenjala niti tijekom imunološke reakcije staničnog tipa bez primjene IGF-a. Preusmjeravanje metaboličkih puteva u jetri za vrijeme humoralne imunološke reakcije moglo bi biti posljedica djelovanja citokina koji sudjeluju u imunološkoj reakciji, a mehanizmi su možda drugačiji u staničnom odnosno humoralnom tipu imunosti. Tijekom upalnih reakcija u jetri dešavaju se dramatične promjene u sintezi proteina, jer jetra sintetizira proteine koji sudjeluju u imunološkom odgovoru. Ove promjene regulira nekoliko citokina: IL-6 (216, 164), IL-1 (216,128) i TNF- $\alpha$  (59), koji dolaze u jetru putem krvi ili se proizvode u samoj jetri, a poznato je da i hormoni mogu regulirati ove procese. IL-6 sudjeluje i u staničnom i humoralnom tipu imunosti, ali je njegova uloga različita ovisno o tipu imunološke reakcije u kojoj IL-6 nastaje. Poznato je da aktivirane T<sub>H</sub> 1 stanice izlučuju IL-2 i IFN, a aktivirane T<sub>H</sub> 2 stanice luče IL-4 i IL-5. U imunološkoj reakciji humoralnog tipa IL-4 aktivira mirujuće B-stanice i stimulira njihovu proliferaciju, te inducira ekspresiju IgE receptora na površini mastocita., a IL-5 inducira ekspresiju IgE receptora na površini B-limfocita i zajedno sa IL-4 pospješuje proizvodnju IgA i IgE. IFN- $\gamma$  djeluje antagonistički na IL-4 i zajedno s IL-2 povećava proizvodnju IgG. IL-6 u ovom tipu imunosti stimulira sintezu svih klasa imunoglobulina djelujući na B-limfocite. U staničnom tipu imunološke reakcije, aktivirani makrofazi ingestiraju, prerade antigen i prezentiraju ga T limfocitima i pri tome otpuštaju IL-1 koji djeluje na T-limfocite aktivirajući ih, te IL-6 koji stimulira citotoksične T-limfocite, a izlučuju i TNF koji djeluje izravno na ciljnu stanicu i IL-8 koji aktivira neutrofile. Citokini IL-2, IFN- $\gamma$  i TNF- $\beta$  u staničnoj imunosti stimuliraju citotoksične T-stanice i aktiviraju makrofage. IL-4 i IL-5 imaju važnu ulogu u mijelopoiezi i alergijskom odgovoru.

IL-6 je ključni medijator sinteze proteina akutne faze u jetri, iako je poznato da u ljudi (176, 42), a i u štakora (10, 85) postoji najmanje šest različitih citokina, koji djeluju u



mreži, što znači da svaki od njih može regulirati sintezu ostalih, te mijenjati njihove učinke na ciljnim stanicama sinergistički ili antagonistički. Točan mehanizam djelovanja citokina nije sasvim poznat, ali se smatra da su promjene u sintezi proteina koje izazivaju citokini inducirane i na transkripcijskom i postranskripcijskom nivou. Citokini se vežu za visokospecifične receptore koji su u malom broju prisutni na membrani hepatocita. Poznato je da se signal, nakon što se IL-6 veže na receptor, prenosi pomoću 130 kD glikoproteina koji je u svezi s IL-6-IL-6-receptor kompleksom (243). Do danas nije identificiran niti jedan poznati mehanizam drugog glasnika putem kojeg se prenosi signal citokina s membrane u jezgru hepatocita. Ispitujući IL-6 ovisni drugi glasnik u ljudskim B-limfocitima uočena je aktivacija H7-inhibirajuće protein kinaze, koja se razlikuje od poznate protein kinaze C (91). Mehanizam drugog glasnika za IL-1 u ciljnim stanicama izgleda da je protein kinaza C, ali i adenilat-ciklaza (180), koja je najvjerojatnije ovisna o aktivaciji G proteina (186). Transdukcija IL-1 signala je posebno zanimljiva, jer je uočeno da nakon što se IL-1 veže za svoj receptor, ne dolazi samo do fosforilacije receptora (83), nego i translokacije kompleksa ligand-receptor u jezgru (55). Opisano je da je drugi glasnik za TNF- $\alpha$  fosforilirani protein molekulske mase 28 kD (220), odnosno jedan miristilirani protein od 82 kD (249). U jezgri IL-6 inducira interakciju specifičnih čimbenika jezgre (npr. proteina koji vežu DNA) sa elementima IL-6 odgovornima za promotivno djelovanje na nekoliko gena za sintezu proteina akutne faze (201). Slični mehanizmi postoje i za indukciju gena za sintezu proteina akutne faze za ostale citokine IL-1 i TNF- $\alpha$ , gdje se indukcija vrši pomoću čimbenika jezgre NF $\kappa$ B ili proteina sličnog NF $\kappa$ B (236) ili kompleksa aktivator-protein-1 (36). Novija ispitivanja pokazala su da IL-6 koji je glavni regulator sinteze gotovo svih proteina akutne faze pospješuje sintezu proteina akutne faze tipa 2, a biokemijski proces transdukcije signala je IL-6--JAK2--APRF. IL-1 regulira set drugih gena za sintezu proteina akutne faze - tipa 1. IL-6 povećava učinak IL-1 i TNF- $\alpha$  na sintezu proteina akutne faze tipa 1 biokemijskim procesom transdukcije signala IL-1, IL-6--Ras--MSAP kinase--NFIL-6 (70).

Podaci o strukturi, vrijednostima i biosintezi CRP-a (jednog od glavnih proteina akutne faze) koja je inducirana djelovanjem IL-6 posebno ukazuju na postojanje specifične interakcije CRP-a sa kalcij-ovisnim i kalcij-neovisnim ligandima i interakciji CRP-a sa ionima kalcija (266).

U našim rezultatima uočili smo smanjenu koncentraciju kalcija u serumu tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa, ali je tijekom imunološke reakcije staničnog tipa ona bila povećana petog i sedmog dana, što također može upućivati na činjenicu da se ovisno o vrsti imunološkog odgovora u hepatocitima dešavaju drugačiji metabolički procesi. Osim učinka iona kalcija, pokazano je da i koncentracija glukoze može utjecati na sintezu CRP-a, tj glukoza inhibira ekspresiju  $\beta$ -galaktozidaze u odsutnosti cAMP-a, i smanjuje sintezu CRP-a jer reducira razinu CRP mRNA (243). CRP se i normalno sintetizira u hepatocitima, ali u malim količinama i zadržava se na endoplazmatskom retikulumu interakcijom sa dvije karboksilesteraze (gp60b i gp60b), koje se opet vežu za endoplazmatski retikulum putem COOH-retencijskih signala. Za vrijeme reakcije akutne faze, osim što se povećava sinteza CRP-a dolazi i do smanjenja njegove retencije na endoplazmatskom retikulumu, jer se smanjuje afinitet vezanja CRP-a za gp60b (265). Čimbenik rasta hepatocita (engl. hepatocyte growth factor - HGF) je snažni mitogen koji djeluje na zrele hepatocite tako da ovisno o dozi stimulira sintezu proteina plazme. Za razliku od IL-6, on stimulira sintezu negativnih proteina akutne faze: transferina, albumina i fibronektina, a ne utječe na sintezu CRP-a. Osim toga, IL-6 svoju aktivnost ispoljava već za 12 sati po stimulaciji, a HGF pokazuje učinak odložen za 48 do 72 sata. Na fibrinogen i  $\alpha$ -1-antitripsin djeluje slično kao IL-6. Prisustvo glukokortikoida nije neophodno, ali pospešuje djelovanje HGF-a (95).

IL-6 u ljudi, osim sinteze CRP-a, stimulira i stvaranje SAA, haptoglobina,  $\alpha$ <sub>1</sub>-antikimotripsina, fibrinogena,  $\alpha$ <sub>1</sub>-antitripsina,  $\alpha$ <sub>1</sub>-kiselog glikoproteina, ceruloplazmina, komplement čimbenika B, a inhibira sintezu albumina, transferina, fibronektina,  $\alpha$ -fetoproteina (10). IL-1 i TNF- $\alpha$  stimuliraju sintezu komplement čimbenika B i komponentu komplementa 3 (C3), te djeluju na negativne proteine akutne faze: albumin, transferin,  $\alpha$ -fetoprotein (10). Kao što je već rečeno, citokini djeluju pozitivno ili negativno na različitim razinama, ili regulirajući međusobno sintezu ili na ciljne stanice. Zbog toga je učinak citokina in vivo veoma kompliciran i nije u potpunosti razjašnjen.

Za vrijeme lokalne GVHR uočili smo u serumu pad aktivnosti ALT petog i sedmog dana reakcije ( $p < 0,05$ ) i porast aktivnosti AP ( $p < 0,01$ ) koja je bila visoka cijelo vrijeme, a najveću vrijednost je imala petog dana. Koncentracije ukupnih proteina i albumina u serumu smanjivale su se ( $p < 0,05$ ) desetog dana imunološke reakcije (slika 17). Tijekom cijele reakcije bila je prisutna hipoglikemija, koja je bila najjače izražena desetog dana reakcije

( $p < 0,001$ ). Dok je koncentracija kreatinina u serumu bila snižena desetog dana, koncentracija ureje nije pokazala značajne promjene, a koncentracije kalcija bile su značajno povećane sedmog i desetog dana lokalne GVHR (slike 17 i 18). Koncentracije CRP-a u serumu bile su najveće petog dana ( $p < 0,05$ ), a sedmog i desetog dana su se normalizirale (slika 19). Već je rečeno da osim što povećava koncentraciju proteina akutne faze inducirajući njihovu sintezu (u našim rezultatima uočavamo povećanu koncentraciju CRP-a), IL-6 smanjuje sintezu albumina, a posljedično tome snižava se i koncentracija ukupnih proteina u serumu, što se također slaže sa rezultatima koje smo mi dobili. Ispitujući učinak citokina oslobođenih iz Kupfferovih stanica na sintezu albumina u hepatocitima tijekom odgovora akutne faze Kowalski-Saunders i sur. (138) također su opazili smanjenu sintezu albumina i zaključili da je to dio akutnog odgovora, a uočili su da hepatociti mogu kompenzatorno i povećati sintezu albumina, nakon što se citokini povuku. Smanjena koncentracija kreatinina, ukazuje na mogućnost da se zbog povećane sinteze endogenih proteina smanjuje i sinteza kreatina u jetri. Uočene brojne promjene u biokemijskim pokazateljima u serumu životinja tijekom imunološke reakcije staničnog tipa bile su praćene i promjenama u sadržaju nukleinskih kiselina i proteina u jetri. Dok se sadržaj nukleinskih kiselina u jetri eksperimentalnih životinja tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa nije mijenjao (a i promjene u serumu vezane su samo uz smanjenu koncentraciju ureje i kalcija) tijekom imunološke reakcije staničnog tipa bio je značajno niži u odnosu na kontrolne životinje, te je pokazao dinamičke promjene. Količina DNA u jetri opadala je tijekom svih ispitivanih intervala, razina RNA pokazala je maksimalni porast sedmog dana reakcije kada je i intenzitet imunološke bio reakcije najveći, a količina proteina u jetri povećavala se u kasnijoj fazi, tj. desetog dana lokalne GVHR (slika 16). Relativno veliki broj čimbenika rasta može potaknuti sintezu DNA u kulturi hepatocita. (72). To su EGF, TGF- $\alpha$ , HGF, aFGF, HB-EGF i KGF. Osim toga čimbenici poput inzulina, glukagona, norepinefrina, koji sami ne djeluju na sintezu DNA, mogu modulirati učinak čimbenika rasta na replikaciju DNA u hepatocitima. Neka ispitivanja su pokazala da iako je EGF prisutan normalno u serumu štakora, djeluje mitogeno tek pri hepatektomiji i da je potrebno da se promijeni struktura receptora da bi se ligand vezao i aktivirao signal transdukcije. U normalnoj jetri proliferacija je vrlo spora i EGF ne djeluje kao mitogen. Nasuprot EGF-u, TGF- $\alpha$  ne djeluje endokrino već autokrino na hepatocite koji posjeduju receptore, a autokrino petlju sinteze

TGF- $\alpha$  stimuliraju sam TGF- $\alpha$  i EGF. HGF je heterodimerični glikoprotein koji se sastoji od lakih i teških lanaca molekulske mase 64 000 i 32 000 i snažan je mitogen za različite stanice, a proizvode ga mezenhimalne stanice u cijelom organizmu. U jetri ga sintetiziraju *Ito* stanice, Kupfferove stanice i endotelne stanice. Smatra se da se aktivira tek po oštećenju organa i da djeluje lokalno na staničnu površinu, tj. da je njegova aktivnost regulirana prisustvom receptora. Pokazano je da NF-kB proteini sudjeluju u aktivaciji, ne samo obrambenih mehanizama u organizmu, nego su odgovorni i za proliferaciju stanica, pa je povećani kapacitet vezanja NF-kB na DNA uočen u hepatocitima već 30 minuta nakon hepatektomije, što ukazuje na mogućnost da je aktivacija NF-kB možda početni korak u regeneraciji jetre, iako sama aktivacija NF-kB nije dovoljna da izazove sintezu DNA. Smatra se da se ciljna mjesta čimbenika rasta hepatocita i citokina preklapaju (63). Ispitivanja Diehl-a i sur. (63) pokazala su da TNF- $\alpha$  pospješuje regeneraciju jetre aktivirajući NF-kB i AP1, što znači da čimbenici uključeni u upalni odgovor mogu mijenjati proliferativni odgovor hepatocita intaktne jetre. TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6 izazivaju promjene na ekspresiji gena u hepatocitima, čime povećavaju sintezu "pozitivnih", a smanjuju sintezu "negativnih" proteina akutne faze (4). Pri tome citokini aktiviraju proteine koji vežu DNA, uključujući NF-kB, STAT-proteine i proteine koji pospješuju vezanje CCAAT (C/EBP), koji onda reguliraju transkripciju mnogih gena specifičnih za hepatocite. TNF- $\alpha$  izravno pospješuje in vitro sintezu DNA u hepatocitima primarna kulture, a pokazalo se da IL-1 i IL-6 taj mitogeni učinak inhibiraju (229). Osim toga pokazano je da u mnogim stanicama, pa i u hepatocitima, TNF- $\alpha$  može pospješiti indukciju C/EBP- $\beta$  i C/EBP- $\delta$ , što prethodi smanjenju kapaciteta vezanja DNA i ekspresiji C/EBP- $\alpha$  koji je antiproliferativni čimbenik transkripcije. Pokazano je nadalje da IL-1  $\beta$  inhibira proliferaciju hepatocita, iako ne tako intenzivno kao TGF- $\beta$ , a poseban inhibirajući učinak ima i IL-6. Preusmjeravajući sintezu proteina u jetri prema sintezi proteina akutne faze inhibicija DNA sinteze može biti posljedica orkestriranog reprogramiranja ekspresije gena pri čemu sinteza proteina akutne faze preovladava nad procesima sinteze koji dovode do replikacije hepatocita. U skladu sa navedenim saznanjima mogu se možda tumačiti i naši rezultati koji u staničnom tipu imunosti pokazuju dakle: porast sinteze CRP-a, smanjenu sintezu albumina i ukupnih proteina, snižen sadržaj nukleinskih kiselina, i hiperglikemiju koja se javlja desetog dana, a što sve može biti posljedica prevladavajućeg učinka IL-6. Treba naravno naglasiti da su



brojni drugi citokini, čimbenici rasta, pa i hormoni uključeni u sva zbivanja, pa je teško jednoznačno odrediti točan mehanizam svih zbivanja.

Grupa autora (259) pokušala je potvrditi hipotezu da se različite funkcije hepatocita tijekom sepsa pojedinačno reguliraju. U tu svrhu inducirali su sepsu u štakora, te mjerili izlučivanje žuči, katalitičku aktivnost transaminaza (AST i ALT), te sintezu i izlučivanje proteina (albumina i  $\alpha$ -1-kiselog glikoproteina) iz perfuzirane jetre kontrolnih štakora koje su podvrgli lažnoj operaciji i jetre štakora u kojih su inducirali sepsu. Sinteza  $\alpha$ -1-kiselog glikoproteina povećala se za 54%, sinteza albumina smanjila se za oko 30%, kao i protok žuči za oko 50% u životinja sa sepsom. Aktivnost transaminaza porasla je nešto u perfuzatu tijekom pokusa, ali jednako u obje ispitivane grupe, te su autori zaključili da nije došlo do oštećenja funkcije jetre, već da su tijekom sepsa različite funkcije jetre regulirane i preusmjeravane pojedinačnim individualnim mehanizmima.

U našim daljnjim ispitivanjima, pratili smo metaboličke promjene tijekom imunološke reakcije staničnog tipa uz primjenu IGF-a, koji je u našim ispitivanjima pokazao inhibitorni učinak na imunološku reakciju staničnog tipa, istovremeno smanjujući broj stanica limfatičkih organa - slezene sedmog dana, a koštane srži desetog dana (slika 37). IGF je inhibirao povećanje poplitealnih limfnih čvorova i pomaknuo vršak reakcije prema desetom danu. Poznato je da IGF pokazuje limfotropni učinak (139, 224), a i naši rezultati prikazani u donjem dijelu slike 36 pokazuju da IGF povećava i težinu kontralateralnih (nesenzibiliziranih) limfnih čvorova u kojima nije bila inducirana imunološka reakcija, ali u koju je bio injiciran IGF (IGF je davan dva puta dnevno, a ukupna doza bila je podijeljena i injicirana u obje nožice). Moguće je stoga da je taj rani limfotropni učinak IGF-a prekrivio stvarne promjene u dinamici lokalne GVHR, koju smo u našim pokusima određivali iz razlike u težinama poplitealnih limfnih čvorova. Iako primjena IGF-a nije bitno promijenila sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri tijekom imunološke reakcije staničnog tipa, ipak smo uočili određene učinke na dinamiku promjena. Naime, koncentracija i količina DNA povećavaju se idući prema desetom danu imunološke reakcije u odnosu prema vrijednostima u životinja koje nisu primale IGF, a u serumu uočavamo porast aktivnosti ALT-a sedmog dana imunološke reakcije, te povećanu koncentraciju glukoze i kreatinina ( $p < 0,05$ ) desetog dana reakcije (tablica 14). Učinci IGF-a na biokemijske parametre u serumu mogli bi jednim dijelom biti posljedica inhibirajućeg djelovanja IGF-a na imunološku

reakciju staničnog tipa, jer su se pod njegovim djelovanjem poništile gotovo sve promjene u serumu koje smo zabilježili u imunološkoj reakciji staničnog tipa. Međutim, budući su učinci IGF-a u organizmu ubikvitarni i podložni djelovanju mnogih čimbenika, teško da bi se moglo tako jednoznačno opisati događanja u jetri za vrijeme primjene IGF-a, a tijekom imunološke reakcije staničnog tipa. Pokazano je npr. da primjena IGF-a u zdravih osoba izaziva povećanu brzinu glomerularne filtracije i smanjuje izlučivanje inzulina, dok su koncentracije glukoze u serumu ostale nepromijenjene, što bi upućivalo da IGF utječe na funkciju bubrega i nasuprot hormonu rasta štedi inzulin, te da ova dva hormona ispoljavaju svoje učinke različitim mehanizmima (96). Ispitujući učinak IGF-a na funkciju bubrega Hirschberg i sur. su pokazali da infuzije IGF-a povećavaju brzinu glomerularne filtracije i klirens para-aminohipurne kiseline, a da snižavaju krvožilni otpor u bubrezima (105). IGF, isto kao i inzulin, može inhibirati staničnu razgradnju proteina djelujući na IGF-II/manoza-6-fosfatne receptore, a da pri tome ne mijenjaju ulazak glukoze u te stanice (130). Pokazan je i inhibirajući učinak IGF-a na glukoneogenezu koju u stanicama jetre potiče glukagon (9).

Intravenska infuzija IGF I može sniziti mRNA za IGF I i II u hepatocitima štakora i ovce. To su u svojim ispitivanjima pokazali Kind i sur. zaključujući da je jedan od mehanizama pomoću kojih se regulira koncentracija IGF-a u serumu, povratna sprega. Osim toga zaključili su da su upravo hepatociti izvor serumskog IGF-a, a ne npr. mišićne stanice jer u njima pad mRNA za IGF nije uočen (127).

Pokazalo se da IGF-I i somatostatin izravno inhibiraju oslobađanje hormona rasta i snižavaju ukupni sadržaj hormona rasta u kulturi stanica štitne žlijezde ovisno o dozi, te da glukokortikoidi mogu pospješiti osjetljivost hormona rasta prema učinku somatostatina, ali u potpunosti poništavaju inhibitorni učinak IGF-a. Nadalje, preparati izolirani iz humane krvi inhibiraju oslobađanje ne samo hormona rasta, nego i prolaktina, dok sintetizirani preparati IGF-a inhibiraju oslobađanje hormona rasta, ali potiču proizvodnju prolaktina (149). Namba H i sur. (183) pokazali su da IGF suprimira transkripciju mRNA za hormon rasta, a somatostatin ne, te su zaključili da ova dva peptida svoj učinak na hormon rasta vrše različitim mehanizmima.

U nastavku naših istraživanja ispitivali smo metaboličke promjene koje se dešavaju tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa pod utjecajem somatostatina. Supresija humoralnog imunološkog odgovora koju smo uočili nakon kratkotrajne primjene

somatostatina, čini se da je posljedica inhibitornog učinka somatostatina na hormona rasta, budući je istovremena primjena oba hormona poništila taj učinak (slika 31). Poznato je da hormon rasta pojačava proliferaciju limfocita T, a da pomagački limfociti T imaju važnu ulogu u regulaciji antigen specifične reaktivnosti imunološkog odgovora, posredovanog B limfocitima (30). Hormon rasta također utječe i na završnu diferencijaciju stanica u efektorske stanice. Ranija ispitivanja već su pokazala da somatostatin djeluje inhibitorno na imunološku reakciju humoralnog i staničnog tipa (211), a da se najjači imunosupresivni učinak postiže ukoliko se somatostatin injicira neposredno nakon izlaganja antigenu. To upućuje na zaključak da somatostatin zapravo djeluje na izlučivanje hormona. Poznato je naime da nakon stimulacije antigenom dolazi do pojačanog izlučivanja hormona, npr. kortikosterona (19), te hormona rasta i inzulina, a somatostatin može njihovo izlučivanje blokirati (67). Osim toga poznato je da somatostatin modulatorno djeluje na simpatički nervni sustav, te da može i izravno djelovati na membranu limfocita i monocita (26). Niti somatostatin, niti hormon rasta, a niti injicirana kombinacija dvaju hormona nisu mijenjali koncentraciju i količinu nukleinskih kiselina u jetri prilikom kratkotrajnog injiciranja u odnosu na životinje injicirane fiziološkom otopinom (slika 32), a iako je ukupna količina proteina jetre (mg/jetri/100gtj.mase) jednaka u svim ispitivanim skupinama životinja, koncentracija proteina (mg/g) povećana je kako u životinja injiciranih somatostatinom, tako i u onih koje su primile hormon rasta. Ispitujući učinak hormona rasta i somatostatina na sadržaj proteina u regenerirajućoj jetri nakon djelomične hepatektomije, Milin i sur. (173) pokazali su da kompenzatorni rast jetre nakon djelomične hepatektomije prati porast mase jetre, te porast sadržaja i koncentracije proteina u jetri. Primjena hormona rasta povećala je kako sadržaj proteina intaktne jetre, tako i sadržaj i koncentraciju proteina regenerirajuće jetre, a primjena somatostatina nije mijenjala sadržaj proteina intaktne jetre, ali je inhibitorno djelovala na kompenzatorni rast jetre (13%) nakon hepatektomije. Kako somatostatin suprimira izlučivanje glukagona i inzulina, autori su pretpostavili da je smanjeni sadržaj proteina u regenerirajućoj jetri bio posljedica supresije transporta aminokiselina u hepatocite, što je izazvalo i smanjenu sintezu proteina. U našim ispitivanjima smanjeni sadržaj proteina u jetri uočili smo tek nakon dugotrajne primjene somatostatina, a tada smo uočili ujedno i smanjenu koncentraciju proteina u jetri, te smanjenu količinu i koncentraciju nukleinskih kiselina i to i RNA i DNA, a osim toga dugotrajna primjena somatostatina



(pomoću osmotskih minipumpica tijekom šest dana) nije suprimirala humoralni imunološki odgovor. Možemo pretpostaviti da je inhibicija lučenja hormona rasta somatostatinom dovela do "rebound" učinka, tj. pojačanog lučenja endogenog hormona rasta, koji je poništio somatostatinom izazvanu supresiju humoralnog imunološkog odgovora. Poznato je da antiproliferacijske učinke somatostatin ispoljava inhibicijskim djelovanjem na različite živčane, pankreatične i gastrointestinalne funkcije, izazivajući inhibiciju adenilat ciklaze, pa se može pretpostaviti da na taj način djeluje i na hepatocite. Nakon vezanja za receptor, somatostatin izaziva stimulaciju  $G_i$  proteina, koji inhibira adenilat ciklazu, a to rezultira smanjenjem unutarstanične količine cAMP-a (131). Neka istraživanja ukazuju na moguće učinke somatostatina posredstvom protein tirozin kinaze iz *src* porodice. Poznato je da su kinaze unutarstanične domene receptora za inzulin, EGF, te čimbenika rasta dobivenog iz trombocita (PDGF), strukturno vrlo slične protein tirozin kinazama iz porodice *src*. S druge strane, poznat je i antiproliferacijski učinak somatostatina na EGF induciranu proliferaciju AR4-2J stanične linije, te na stanicama humanog hepatoma stimuliranog inzulinom (258), što bi moglo upućivati na to da somatostatin djeluje i putem tirozin kinaza-ovisnog aktivacijskog puta. Antiproliferacijski učinci somatostatina mogli bi biti vezani i za funkciju G-proteina. Poznato je da prijenos signala preko Ins P3 puta također aktivira G protein (8). Pored toga, G-proteinom je posredovan i regulacijski učinak somatostatina na kalijaska voltažna vrata kojim on izaziva hiperpolarizaciju stanične membrane (zbog izlaska kalija iz stanice), uz smanjenje unutarstanične koncentracije kalcija (174). Do oslobađanja iona kalcija u stanici, stimulacijom PI ovisnog puta, dovodi Ins P3. Kalcij ima niz važnih funkcija tijekom aktivacijskih zbivanja. Uzrokuje prelazak nekih čimbenika transkripcije iz citoplazme u jezgru stanice, a osim toga stimulira o kalmodulinu ovisnu protein fosfatazu kalcineurin (41). Preko kalcineurina npr. djeluje i imunosupresiv ciklosporin za kojega je također poznato da ne djeluje na rana aktivacijska zbivanja (slično kao somatostatin), ali ipak snažno inhibira limfocitnu proliferaciju za koju je potrebna mobilizacija kalcija (68).

Naši rezultati su pokazali da prilikom imunološke reakcije humoralnog tipa pod utjecajem kratkotrajnog djelovanja somatostatina, u serumu životinja ne uočavamo više smanjene koncentracije ureje i kalcija, kao što je bio slučaj u imunološkoj reakciji bez primjene hormona (što bi se moglo objasniti time što je somatostatin suprimirao imunološki odgovor), a dugotrajna primjena somatostatina (koja nije imala učinka na intenzitet

imunološkog odgovora) ponovo je izazvala sniženu koncentraciju ureje u serumu. Osim toga kratkotrajna primjena i somatostatina i hormona rasta povećava katalitičku aktivnost ALT u serumu, a nakon dugotrajne primjene somatostatina povećana je i katalitička aktivnost AST, te bi se moglo pretpostaviti da je to posljedica oštećenja jetrenih stanica koje je to veće što je primjena hormona duža. Smanjene koncentracije ukupnih proteina i albumina u serumu životinja za vrijeme humoralnog imunološkog odgovora uz dugotrajno djelovanje somatostatina i hormona rasta mogle bi se objasniti time da ovi hormoni (iako ne djeluju na intenzitet imunološkog odgovora) pri dugotrajnoj primjeni ipak djeluju na iste mehanizme putem kojih i u staničnom tipu imunosti dolazi desetog dana do smanjenja ovih biokemijskih sastojaka seruma.

Poznato je da se homeostaza glukoze održava pomoću složenog neuroendokrinog mehanizma koji uključuje tri periferna organa: jetru, pankreas i nadbubrežne žlijezde, a svi su oni pod kontrolom autonomnog nervnog sustava. U odgovoru na hemoragičnu hipotenziju i hipoglikemiju induciranu inzulinom, simpatoadrenalni sustav se aktivira povećavajući izlučivanje kateholamina iz nadbubrežnih žlijezda i glukagona iz pankreasa, koji su oba važni čimbenici u održavanju homeostaze glukoze. Povećana aktivnost simpatičkih nervnih vlakana uočava se u jetri tijekom hemoragične hipotenzije, a isto tako i u pankreasu, i to kao odgovor na hipoglikemiju izazvanu inzulinom. Arbos J i sur (6) pokazali su da citokin TNF- $\alpha$  (kahektin) značajno mijenja metabolizam glukoze povećavajući brzinu oksidacije u cijelom organizmu i smanjujući intestinalnu apsorpciju. TNF- $\alpha$  nema učinka na glukoneogenezu u hepatocitima (223), i ne pospješuje izlazak glukoze iz hepatocita (219), dok je pokazano da IL-1 može izazvati hipoglikemiju in vivo, sa ili bez promjena u koncentraciji inzulina u serumu, te da smanjuje glukoneogenezu i koncentraciju glukoze u krvi smanjujući steroidne receptore na hepatocitima i posljedično smanjuje indukciju fosfoenolpiruvat karboksikinaze (104). EGF inhibira glikogenični učinak inzulina (49), ali može isto kao inzulin inhibirati učinak glukagona na cAMP i glikogenfosforilazu u hepatocitima (33). Tijekom naših ispitivanja jedine promjene u koncentraciji glukoze u serumu pokusnih životinja uočili smo tijekom imunološke reakcije staničnog tipa, koju je karakterizirala značajna hipoglikemija, najjača deseti dan imunološke reakcije. Kada smo tijekom imunološke reakcije staničnog tipa životnije injicirali IGF-om, uočili smo da je koncentracija glukoze u serumu životinja petoga i sedmoga dana reakcije

ista kao u životinja injiciranih fiziološkom otopinom, a deseti dan se uočava hiperglikemija. Već smo rekli da je IGF inhibirao imunološku reakciju staničnog tipa, inhibirajući porast ipsilateralnih limfnih čvorova i pomičući vršak GVHR prema desno. Drugi autori pokazali su da IGF in vivo izaziva sniženu koncentraciju glukoze i inzulina u serumu, jer povećava unos glukoze u hepatocite (118), a isto tako i da poput EGF-a aktivira glikogen sintetazu mehanizmima različitima od inzulinskog (189)

Značajna supresija imunološkog odgovora (humoralnog i staničnog tipa) može se postići primjenom halotanske anestezije, i to zbog njenog izravnog toksičnog učinka na stanice limfatičkog sustava (207), ili neizravnim utjecajem anestetika, putem promjena u neuroendokrinim odnosima, koje utječu na intenzitet imunološkog odgovora. Anestezija smanjuje kemotaksiju, fagocitozu, opsonizaciju i koncentraciju komplementa u krvi, te smanjenje broja T-limfocita i suprimiranje humoralne imunosti (213). Osim imunosupresivnog učinka (207) podaci pokazuju da u nesenzibiliziranih miševa, pod utjecajem halotanske anestezije dolazi da značajnog smanjenja sadržaja nukleinskih kiselina i proteina u jetri, što znači da halotan djeluje i hepatosupresivno. Iako halotanska anestezija suprimira humoralni imunološki odgovor, u serumu anesteziranih i senzibiliziranih miševa uočena je smanjena koncentracija ureje u odnosu na kontrolne (isto kao kod neanesteziranih životinja), te povećana koncentracija albumina u odnosu na neanestezirane, senzibilizirane životinje. Moglo bi se pretpostaviti da su navedene promjene posljedica smanjene sinteze ureje, te da se metabolički putevi u jetri preusmjeravaju ka povećanoj sintezi albumina sa svrhom detoksikacije halotana. Halotan se razgrađuje u oksidativno-redukcijskom metabolizmu koji uključuje NADPH za transfer elektrona, te aktivnost mikrosomalnih enzima P-450. Hepatosupresivno djelovanje anestetika moglo bi biti posljedica hepatotoksičnog učinka. Naime većina halogenih narkotika metabolizira se u jetri, pri čemu nastaju toksični intermedijalni spojevi poput trifluoroacetil halida iz oksidativnog puta, ili slobodni radikali i karbonski međuprodukti iz reduktivnog puta.

Da bismo ispitali učinak PGM-a na intenzitet imunološke reakcije humoralnog tipa, životinjama smo intraperitonealno injicirali različite doze PGM-a, odmah nakon senzibilizacije ovčjim eritrocitima, i to uz halotansku anesteziju i bez nje. Rezultati pokazuju da djelovanje PGM-a značajno ovisi o imunološkom statusu životinje prije primjene PGM-a (slika 25). U životinja prethodno imunosuprimiranih halotanskom anestezijom, učinak

PGM-a obrnuto je proporcionalan dozi. Najveći imunostimulacijski učinak (66%) uočen je u životinja koje su primile male doze PGM-a (10 mg/kg;  $p < 0,001$ ), dok su velike doze (100 mg/kg) izazvale imunosupresiju ( $p < 0,001$ ). U životinja koje nisu bile prethodno imunosuprimirane halotanskom anestezijom sve ispitivane doze PGM-a dovele su do značajne imunosupresije tj. smanjenja broja PFC ( $p < 0,001$ ). PGM ima imunomodulatorno i protutumorsko djelovanje. Povećava humoralnu imunost (111), stimulira makrofage i T i B limfocite (108). Pokazalo se da njen učinak ovisi o starosti pokusnih životinja, dozi, vremenu i načinu primjene. Poslije intravenskog injiciranja, PGM se brzo izlučuje iz organizma, dijelom nepromijenjen, a dijelom razgrađen na šećer i peptide (117). Naši podaci pokazuju povezanost između imunostimulativnog i hepatotropnog učinka. Doze koje su izazvale maksimalnu stimulaciju proizvodnje PFC, ujedno su i povećale količinu nukleinskih kiselina i proteina u jetri, što upućuje na hepatoprotektivno djelovanje PGM-a. Moguće je da on izaziva aktivaciju Kupfferovih stanica u jetri, što bi oslobađanjem IL-1, TNF i/ili IL-6, moglo potaknuti imunološki sustav i sintezu proteina akutne faze u jetri. West i sur. su u svojim radovima (262) pokazali da Kupfferove stanice jetre mogu aktivirati ili inhibirati sintezu proteina u hepatocitima različitim mehanizmima, ovisno o septičkom stimulusu. Poznato je da u kulturama makrofaga MDP vrlo snažno inducira aktivnost IL-1 i TNF- $\alpha$  i inducira ekspresiju IL-6 (18), a da IL-1 i IL-6 izazivaju proliferaciju hepatocita (4). Stoga se može se pretpostaviti da PGM ostvaruje stimulaciju proizvodnje PFC aktivirajući makrofage jetre, ali se ne smiju isključiti niti drugi mogući putevi aktivacije, tim više što je pokazano da imunomodulatorno djelovanje MDP-a na humoralni imunološki odgovor *in vivo* i *in vitro* postiže pojačavajući učinak citokina IL-2 i IL-4 na B limfocite (237.). U serumu senzibiliziranih životinja tretiranih PGM-om, s ili bez anestezije nismo utvrdili značajnije promjene, ali su zato brojne promjene izazvali analozi PGM-a, posebno PGMZn. Tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa, utvrdili smo pad koncentracije ukupnih proteina i porast koncentracije ureje. Uz halotansku anesteziju kod senzibiliziranih životinja PGMZn je snizio koncentraciju ukupnih proteina i povećao koncentraciju glukoze, a u odnosu na djelovanje samog PGM-a utvrđena je smanjena katalitička aktivnost AST, povećana katalitička aktivnost AP, koncentracija ukupnih proteina bila je smanjena, a koncentracija glukoze u serumu povećana. PGMZn je ujedno pokazao i najjači učinak na povećanje koncentracije i količine ukupnih proteina jetre (slika 39). I drugi pokusi pokazali



su snažno imunoregulacijsko djelovanje, koje je još uvijek, zajedno sa ispitivanjem učinaka na metaboličke promjene u jetri predmet brojnih istraživanja (212).

U jednom dijelu naših pokusa pokušali smo utvrditi ulogu stanica koje sudjeluju u imunološkoj reakciji primjenom metode selektivne deplecije pojedinih T-limfocitnih populacija. Jedina metabolička promjena koju smo utvrdili bila je povećana količina ukupnih proteina u jetri životinja s manjkom CD4<sup>+</sup> limfocita. Deplecija CD4 limfocitne subpopulacije nije međutim utjecala na humoralni imunološki odgovor, dok ga je deplecija CD8 limfocita stimulirala, a dvostruka deplecija suprimirala. Slične promjene u sadržaju hepatskih proteina utvrđene su nakon deplecije CD4 +CD8 T-limfocitnih subpopulacija nakon parcijalne hepatektomije (197).

Na kraju možemo reći da se tijekom imunološke reakcije aktiviraju različite stanice koje izlučuju različite citokine. U toj aktiviranoj citokinskoj mreži teško je reći koji su učinci lokalni, a koji odgovaraju sistemskim učincima pojedinih neuroendokrinih tvari. Citokini aktiviraju neuroendokrinu osovinu i pobuđuju lučenje određenih neurotransmitera i hormona koji bi trebali uspostaviti ponovnu homeostazu. Poznato je da IL-1, IL-6 i TNF oslobađaju glukokortikoide koji će dovesti ili do smirivanja imunološke reakcije, ili do septičkog šoka u slučaju da se potakne izlučivanje prevelike količine citokina.

Naši rezultati, međutim, upućuju da se tijekom gotovo svih eksperimentalnih protokola izrazito mijenja sadržaj proteina u jetri, kao i koncentracija serumskih proteina i albumina, te koncentracija ureje. Opažene su i promjene u koncentraciji glukoze u serumu, a mijenjaju se i aktivnosti pojedinih enzima.

Iako se zbog složenosti različitih lokalnih ili sistemskih mehanizama koji se aktiviraju tijekom imunološke reakcije, promjene nisu mogle vezati za točno definirane metaboličke putove, opisani rezultati jasno ukazuju na ključnu ulogu jetre u ovim stanjima.

## **ZAKLJUČNI PREGLED**



U radu smo ispitivali:

## METABOLIČKE PROMJENE TIJEKOM IMUNOLOŠKE REAKCIJE

- a) Određivanjem sadržaja nukleinskih kiselina i proteina u jetri
- b) Određivanjem biokemijskih sastojaka seruma tj.  
mjenjenjem koncentracije ukupnih proteina, albumina, glukoze, ureje, kreatinina, kalcija, fosfora, CRP-a, te katalitičke aktivnosti transaminaza i alkalne fosfataze

Metaboličke promjene analizirali smo:

- 1. Tijekom imunološke reakcije: 1. humoralnog tipa  
2. staničnog tipa
- 2. Imunološke reakcije modificirane:
  - 1. in vivo deplecijama pojedinih T-limfocitnih subpopulacija
  - 2. primjenom halotanske anestezije i imunomodulatora PGM-a
  - 3. primjenom hormona: somatostaina i IGF-a

### **Rezultati su pokazali :**

Ad 1.1. Tijekom imunološke reakcije humoralnog tipa:

- a) nije bilo promjena u sadržaju nukleinskih kiselina i proteina u jetri.
- b) u serumu senzibiliziranih miševa smanjene su koncentracije ureje i kalcija.

Ad 1.2. Tijekom imunološke reakcije staničnog tipa:

- a) sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri opada, te u odnosu na kontrolne životinje pokazuje dinamičke promjene.
- b) u serumu miševa smanjena je katalitička aktivnost ALT 5. 7. i 10. dan reakcije. Povećana katalitička aktivnost AP i hipoglikemija prisutne su tijekom cijele reakcije. Koncentracije ukupnih proteina, albumina i kreatinina smanjene su 10. dan reakcije, koncentracija kalcija povećana je 7. i 10. dana, a CRP-a 5. dana.

Ad 2.1. Učinak deplecije CD4 limfocitne subpopulacije na humoralni imunološki odgovor nije značajan, deplecija CD8 limfocita ga stimulira, a dvostruka deplecija suprimira.

a) u jetri CD4 depletiranih životinja povećana je količina proteina.

Ad 2.2. Halotanska anestezija primjenjena tijekom jednog sata neposredno nakon senzibilizacije miševa s OE suprimira humoralni i stanični imunološki odgovor. Istovremeno, količine nukleinskih kiselina i proteina u jetri se smanjuju, a u serumu je povećana koncentracija albumina.

PGM injiciran životinjama odmah po senzibilizaciji (10 mg/kg), a neposredno prije anestezije, za 66% ispravlja smanjeni broj stanica koje stvaraju hemolitičke čistine.

a) PGM povećava sadržaj nukleinskih kiselina i proteina u jetri, koji je prethodno smanjen zbog anestezije.

b) PGM u serumu senzibiliziranih životinja smanjuje koncentraciju fosfora, a u serumu senzibiliziranih, anesteziranih životinja povećava koncentraciju kreatinina.

Ad 2.3. Somatostatin suprimira proizvodnju stanica koje stvaraju hemolitičke čistine u slezeni pri kratkotrajnoj primjeni, a hormon rasta poništava ovaj učinak.

a) injiciranje somatostatina kao i hormona rasta povećava količinu proteina u jetri.

b) u serumu životinja kratkotrajno injiciranih sa somatostatinom kao i hormonom rasta povećane su katalitička aktivnost ALT i koncentracija kreatinina.

Dugotrajno davanje somatostatina nije suprimiralo humoralni imunološki odgovor.

a) sadržaj DNA u jetri značajno je smanjen. Istovremenim injiciranjem somatostatina i hormona rasta povećava se sadržaj DNA u jetri.

b) u serumu životinja injiciranih hormonima povećane su katalitičke aktivnosti AST i ALT, te koncentracije proteina i albumina.

IGF inhibira porast ipsilateralnih limfnih čvorova i pomiće vršak GVHR prema desno.

Analiza staničnosti limfatičkih organa za vrijeme indukcije lokalne GVHR upućuje na inhibitorni učinak IGF-a na slezenu (7. dan) i koštanu srž (10. dan).

- a) nisu uočene promjene u koncentraciji nukleinskih kiselina i proteina u jetri.
- b) u serumu je povećana aktivnost ALT 7. dana i koncentracije glukoze i kreatinina 10. dan GVHR nakon primjene IGF-a.

## LITERATURA

1. Adam A, Lederer E. 1984. Muramyl peptides: imunomodulators, sleep factors, and vitamins. Stevens DG ed. Medicinal research reviews, vol. 4 New York: Willey and Sons 111-152: 130-135.
2. Ader R, Cohen N. 1981. Psychoneuroimmunology. Orlando FL Academic 281.
3. Agro A, Padol I, Stanisz AM. 1991. Immunomodulatory activities of the somatostatin analogue BIM 23014c: effects on murine lymphocyte proliferation and natural killer activity. Regul Pept 32: 129.
4. Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. 1990. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). FASEB J 4:2860-2867.
5. Alekseeva IN. 1994. Acute phase blood proteins: role in the homeostasis and their synthesis induction in the liver. Fiziol Zh 40 (1): 106-117
6. Allegretti N, Andreis I, Čulo F, Marušić M, Taradi M. 1987. Imunologija, Školska knjiga Zagreb.
7. Alpert LC, Brawer JR, Patel YC, Reichlin S. 1976. Somatostatinergic neurons in anterior hypothalamus. immunohistochemical localization. Endocrinology 98: 255-258.
8. Altman A, Coggeshall M, Mustelin T. 1990. Molecular events mediating T cell activation. Adv Immunol 48: 227-260.
9. Amaral JF, OConor JA, Shearer JD, Hull SL, Caldwell MD. 1989. Somatomedin-A inhibits glucagon-stimulated hepatic gluconeogenesis. J Trauma 29 (6):842-846.
10. Andus T, Bauer J, Gerok W. 1991. Effects of Cytokines on the Liver. Hepatology 13 (2): 364-375.
11. Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. 1990. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. Annu Rev Biochem 59: 783-836.
12. Armburst T, Ramadori G. 1996. Functional characterizatón of two different Kupffer cell populations of normal rat liver. J Hepatol 25 (4): 518-528.
13. Aterman K. 1992. The stem cells of the liver - a selective review. J Cancer Res Clin Oncol 118: 87-115.
14. Audibert F, Chedid L, Hannoun G. 1977. Augmentation de la reponse immunitaire au vaccin grippal par un glycopeptide synthetique adjuvant (N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine). CR Acad Sci Paris 285: 467-470.

15. Audibert F, Chedid L, Lefrancier P, Choay J. 1976. Distinctive adjuvanticity of synthetic analogs of mycobacterial water-soluble components. *Cell Immunol* 21:243.
16. Baker P, Fauntleroy M, Stashak P, Hiernaux J, Cantrell J, Rudbach J. 1989. Adjuvant effect of trehalose dimycolate on the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide. *Infect Immunol* 57: 912-917.
17. Barham D, Trinder P. 1972. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by oxidase system. *Analyst* 97:142-145.
18. Barnes PF, Fong SJ, Brennan PJ, Twomey PE, Mazumder A, Modlin RL. 1990. Local production of tumor necrosis factor and IFN- $\gamma$  in tuberculous pleuritis. *J Immunol* 145 : 149-154.
19. Basedovsky HO, Del Rey A, Sorkin E. 1981. Lymphokine containing supernatants from Con A stimulated cells increase corticosterone blood levels. *J Immunol* 26: 385-387.
20. Basedovsky HO, Del Rey A, Sorkin E, Dinarello CA. 1980. Immunoregulatory feedback between IL-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 233: 652-654.
21. Bateman A, Singh A, Kral T, Solomon S. 1989. The immune hypothalamic pituitary axis. *Endocr Rev* 10:92-112.
22. Bauer J, Ganter U, Geiger T. 1988. Regulation of interleukin-6 expression in cultured human blood monocytes and monocyte derived macrophages. *Blood* 72:1134-1140.
23. Berkenbosch F, Van Oers J, Del Ray A, Tilders F, Basedovsky HO. 1987. CRF-producing neurons in the rat activated by IL-1. *Science Wash DC* 238:5244-526.
24. Bernton EW, Beach JE, Holiday JW, Small-Ridge RC, Fein HG. 1987. Release of multiple hormones by direct action of Interleukin-1 on pituitary cells. *Science* 283:519-521
25. Bersani M, Thim L, Baldissera FG, Holst JJ. 1989. Prosomatostatin 1-64 is a major product of somatostatin gene expression in pancreas and gut. *J Biol Chem* 264: 10633-10666.
26. Bhathena SJ; Louie J, Schechter GP, Redman RS, Wahl L, Recant L. 1981. Identification of human mononuclear leukocytes and glucagon. *Diabetes* 30: 127-130.
27. Binoux M. 1995. The IGF system in metabolic regulation. *Diabete Metab* 21 (5):330-337.



28. Blalock JE, Harbour- Mc Menamin D, Smith EM. 1985. Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunologic systems. *J Immunol* 85:858-861s.
29. Blalock JE, Harp C. 1981. Interferon and adrenocorticotripic hormone inductions of steroidogenesis, melanogenesis and viral activity. *Arch Virol* 67:45-49.
30. Blalock JE, Smith E. 1985. A Complete regulatory loop between the immune and neuroendocrine system. *Federation Proceedings* 44 : 108-111.
31. Blalock JE. 1989. A molecular Basis for Bidirectional Communication Between the Immune and Neuroendocrine Systems. *Pysiol Rev* 69:1-39.
32. Boranić M. 1980. Centralni nervni sistem i imunitet. *Liječnički vijesnik* 102 : 603-608.
33. Bosch F, Bouscarel B, Slaton J, Blackmore PF, Exton JH. 1986. Epidermal growth factor mimics insulin effects in rat hepatocytes. *Biochem J* 239:523-530.
34. Bouwens L. 1988. Structural and functional aspects of Kupffer cells. *Revis Biol Celular* 16:69-94.
35. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 178: 77-79.
36. Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojkier M, Karin M. 1989. Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Nature* 337:661-663.
37. Broudy V C, Kaushansky K, Shoemaker SG, Aggarwal BB, Adamson JW. 1990. Muramyl dipeptide induces production of hemopoietic growth in vivo by a mechanism independent of tumor necrosis factor. *J Immunol* 144 : 3789-3794.
38. Brown SL, Smith LR, Blalock JE. 1987. IL-1 and IL-2 enhance proopiomelanocortin gene expresion in pituitary cells. *J Immunol* 139: 3181-3183.
39. Bruce DL. 1967. Effect of halothane anesthesia on experimental Salmonella peritonitis in mice. *J. Surg Res* 7: 180-185.
40. Burton K. 1956. A study of the Conditions and Mechanisms of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonukleic Acid. *Biochem J* 62:315.
41. Cahalan MD, Lewis RS. 1990. Functional roles of ion channels in lymphocytes. *Seminars in immunology* 2: 107-117.

42. Castel JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, Fabra R, et al. 1989. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett* 242:237-239.
43. Chambers RE, Whicher JT, Dieppe PA. 1989. Acute phase proteins in inflammatory diseases. *Clin Diag Lab* 1:29-37.
44. Chasson AL, Grady HT, Stanley MA. 1961. Determination of creatinine by means of automatic chemical analysis. *The Bull Regist Med Taaech* 30:207-212.
45. Chedid L, Parant M, Parant F, Lefrancier P, Choay J, Lederer E. 1977. Enhancement of non-specific immunity to *Klebsiella Pneumoniae* infection by a synthetic immunoadjuvant (N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) and several analogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 2089-2093.
46. Chedid L. 1983. Muramyl peptides as possible endogenous immunopharmacological mediators. *Microbiol Immunol* 27: 723-732.
47. Chedid L. 1986. Synthetic muramyl peptides: their origin, present status, and future prospects. *Federation Proceedings* Vol. 45 No 11 : 2531-2533.
48. Chevenne D. 1991. Somatomedins. *Ann Biol Clin* 49 (2): 69-91.
49. Chowdhury MH, Agius L. 1987. Epidermal growth factor counteracts the glycogenic effect of insulin in parenchymal hepatocyte cultures. *Biochem J* 247:307-314.
50. Cohen IJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. 1992. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 10:267-293.
51. Compton MM, Caron LA, Cidlowski JA. 1987. Glucocorticoid action on the immune system. *J Steroid Biochem* 27 (1-3): 201-208.
52. Compton MM, Cidlowski JA. 1987. Identification of glucocorticoid-induced nuclease in thymocytes. A potential "lysis gene" product. *J Biol Chem* 262 (17):8288-8292.
53. Compton MM. 1992. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev* 11 (2): 105-119.
54. Conover CA. 1996. Regulation and physiological role of insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr J* 43 Suppl: S43-S48.
55. Curtis BM, Widmer MB, DeRoss P, Qwarnstrom EE. 1990. IL-1 and its receptor are translocated to the nucleus. *J Immunol* 144:1295-1303.

56. Dafny N, Reyes-Vasquez C. 1985. Three different types of alpha-interferons alter naloxane-induced abstinence in morphine addicted rats. *Immunopharmacology* 9:13-17.
57. D'Alessio DA, Sieber C, Beglinger C, Ensink JW. 1989. A physiological role for somatostatin 28 as regulator of insulin secretion. *J Clin Invest* 84:857-862.
58. Dantzer R, Kelley KW. 1989. Stress and immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system. *Life Sciences* 44: 1995-2008.
59. Delers F, Mangeney M, Raffa D, Vallet-Colom I, Daveau M, Tran-Quang N, Davrinches C, et al. 1989. Changes in rat liver mRNA for  $\alpha$ -1-acid-glycoprotein, apolipoprotein E, apolipoprotein B and beta-actin after mouse recombinant tumor necrosis factor injection. *Biochem Biophys Res Commun* 161:81-88.
60. D'Ercole AJ, Ye P, Calikoglu AS, Gutierrez-Ospina G. 1996. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol Neurobiol* 13 (3): 227-255.
61. Devoino L, Iдова G, Alperina E et al. 1986. Distribution of immunocompetent cells underlying psychoneuroimmunomodulation. *Ann NY Acad Sci* 496: 292-300.
62. Diehl A, Yin M, Fleckenstein J, Yang S, Lin H, Brenner D, Westwick J, Bagby C, Nelson S. 1994. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces c-jun during the regenerative response to liver injury. *Am J Physiol* 267, G552- G561.
63. Diehl AM, Rai RM. 1996. *FASEB* 10, 215-227.
64. Dinarello CA, Krueger JM. 1986. Induction of interleukin-1 by synthetic and naturally occurring muramyl peptides. *Federation Proceedings* Vol. 45 No 11: 2545-2549.
65. Dougherty PM, Dafny N. 1988. Neuroimmune intercommunication, central opioids, and the immune response to bacterial endotoxin. *J of Neuroscience Research* 19: 140-148.
66. Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 31:87-96, 1971.
67. Efendić S, Hokfelt T, Luft R. 1978. Somatostatin. *Adv Metab Disor* 9: 367-424.
68. Eiras G, Schimizu Y, van Seventer GA, Doquesnoy RJ, Zevi A. 1991. Effects of FK 506 and cyclosporine on T-cell activation: integrin mediated adhesion of T cell proliferation and maturation of cytotoxic T cells. *Transl Proc* 23: 936-939.
69. Endo Y. 1989. Induction of histidine and ornithine decarboxylase activities in mouse tissues by recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Biochem Pharmacol* 38:1287-1292.

- 70.Engler R. 1995. Acute-phase proteins in inflammation. *CR Seances Soc Biol Fil* 189 (4):563-578.
- 71.Farghali H, Machkova Z, Kamenikova L, Janku I, Masek K. 1984. The protection from hepatotoxicity of some compounds by the synthetic immunomodulator muramyl dipeptide (MDP) in rat hepatocytes and in vivo. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 6/8: 449-454.
- 72.Fausto N, Laird AD, Weber EM. 1995. Role of growth factor and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J* 9, 1527-1536.
- 73.Feingold KR, Serio MK, Adi S, Moser AH, Grunfeld C. 1989. Tumor necrosis factor stimulates hepatic lipid synthesis and secretion. *Endocrinology* 124:2336-2342.
- 74.Feingold KR, Soued M, Serio MK, Moser AH, Dinarello CA, Grunfeld C. 1989. Multiple cytokines stimulate hepatic lipid synthesis in vivo. *Endocrinology* 125: 267-274.
- 75.Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, Carlson SL, Ackerman KD, Madden KS, Olschowki JA, Livant S. 1987. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev* 100: 225-260.
- 76.Folger WE, Fidler IJ. 1986. The activation of tumoricidal properties in human blood monocytes by muramyl dipeptide requires specific intracellular interaction. *J Immunol* 136: 2311.
- 77.Foreman JC, Jordan CC, Oehme P, Renner H. 1983. *J Physiol* 355,449.
- 78.Freemark M. 1986. Epidermal growth factor stimulates glycogen synthesis in fetal rat hepatocytes: comparison with the glycogenic effects of insulin-like growth factor I and insulin. *Endocrinology* 119:522-526.
- 79.Freemark M. 1986. Epidermal growth factor stimulates glycogen synthesis in fetal rat hepatocytes: comparison with the glycogenic effects of insulin-like growth factor I and insulin. *Endocrinology* 119: 522-526.
- 80.Fuller PJ, Verity K. 1989. Somatostatin gene expression in the thymus gland. *J Immunol* 143: 1015-1017.
- 81.Gabrilovac J, Tomašić J, Osmak M, Boranić M. 1988. Peptidoglycan monomer stimulates spontaneous cell - mediated cytotoxicity in spleens of C 57B1 mice. *Jugoslav Physiol Pharmacol Acta* Vol 24 No 2: 203-211.

82. Gallager JC, Seligson D. 1962. Significance of abnormally low blood urea levels. *N Engl J Med* 266: 492-495.
83. Gallis B, Prickett KS, Jackson J, Slack J, Schooley K, Sims JE, Dower SK. 1989. IL-1 induces rabbit phosphorylation of the IL-1 receptor. *J Immunol* 143: 3235-3240.
84. Gamulin S, Marušić M, Krvavica S. 1995. *Patofiziologija*, treće izdanje, Medicinska naklada, Zagreb.
85. Geiger T, Andus T, Klapproth J, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. 1988. Induction of rat acute-phase proteins by interleukin-6 in vivo. *Eur J Immunol* 18: 717-721.
86. Gerich JE. 1981. Somatostatin. In: Brownie M. ed. *Handbook of diabetes mellitus*. Vol 1. New York: Garland STPM Press 297-354.
87. Gewurz H. 1982. Biology of C-reactive protein and the acute phase response. *Hosp Pract* 17:67.
88. Ghezzi P, Saccardo B, Bianchi M. 1986. Recombinant tumor necrosis factor depresses cytochrome P450-dependent microsomal drug metabolism in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 136: 316-321.
89. Goetzl EJ, Adelman DC, Sreedharan SP. 1990. Neuroimmunology. *Advances Immunol* 48: 161-190.
90. Goetzl EJ, Chernov-Rogan T, Cooke MP, Renold F, Payan DG. 1985. Endogenous somatostatin-like peptides of rat basophilic leucemic cells. *J Immunol* 135: 2707-2712.
91. Goldstein H, Koerholz D, Chesky L, Van XD, Ambrus JL. 1990. Divergent activities of protein kinases in IL-6-induced differentiation of a human B cell line. *J Immunol* 145: 952-961.
92. Gonzales MC, Aguila MC, McCann SM. 1990. Effect on human-gama interferon on GH secretion in the male rat. 1<sup>st</sup> International Congress ISNIM, Florence, Italy - may 23-26, 1990, Abstract p118.
93. Gressner AM. 1996. Transdifferentiation of hepatic stellate cell (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl* 54: S39-S45.
94. Grofte T, Wolthers T, Jensen SA, Moller N, Jorgensen JO, Tygstrup N, Orskov H, Vilstrup H. 1997. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I singly and in combination on in vivo capacity of urea synthesis, gene expression of urea cycle enzymes, and organ nitrogen contents in rats. *Hepatology* 25 (4): 964-969.



95. Guillen MI, Gomez-Lechon MJ, Nakamura T, Castell JV. 1996. The hepatocyte growth factor regulates the synthesis of acute-phase proteins in human hepatocytes: divergent effect on interleukin-6-stimulated genes. *Hepatology* 23(6): 1345-1352
96. Guler HP, Schmid C, Zapf J, Froesch ER. 1989. Effects of recombinant insulin-growth factor I on insulin secretion and renal function in normal human subjects. *Proc natl Acad Sci USA* 86 (8): 2868-2872.
97. Guyre PM, Girard MT, Morganelli PM, Manganiellos PD. 1988. Glucocorticoid effects on the production and actions of immune cytokines. *J Steroid Biochem* Vol 30 No 1-6 : 89-93.
98. Hadden JW. 1989. Therapy of secondary T-cell immunodeficiencies with biological substances and drugs. *Immune Consequences of Trauma, Shock, and Sepsis*, edited by Springer - Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong 509-519.
99. Hall K, Tally M. 1989. The somatomedin-insulin-like growth factor. *Journal of Internal Medicine* 225: 47-54.
100. Hall NR, Goldstein AL. 1981. Neurotransmitters and the immune system. In: *Ader R* edited by *Psychoneuroimmunology*. Academic, New York, pp 521-543.
101. Harris AG. 1990. Future medical prospects for Sandostatin. *Metabolism* 39 (9Suppl 2): 180-185.
102. Hartree EF. 1972. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Chem* 48:422-427
103. Heijnen CJ, Kavelaars A, Balleieux RE. 1991. Beta-endorphin: cytokine and neuropeptide. *Immunological Reviews* 119: 41-63.
104. Hill MR, Stith RD, McCallum RE. 1986. Interleukin 1: a regulatory role in glucocorticoid-regulated hepatic metabolism. *J Immunol* 137: 858-862.
105. Hirschberg R, Kopple JD. 1989. Evidence that insulin-like growth factor I increase renal plasma flow and glomerular filtration rate in fasted rats. *J Clin Invest* 83 (1): 326-330.
106. Horejsi V. 1991. Surface Antigens of Human Leukocytes. *Advances in immunology* 49: 75-147.



- 107.Hršak I, Kušić B. 1990. Binding of peptidoglycan monomer (PGM) on lymphocytes and macrophages. *Period Biol* 92 (1): 20-21.
- 108.Hršak I, Novak D, Tomašić J. 1980. Immunostimulant activity of peptidoglycan monomer on in vivo primary response to sheep erythrocytes, *Salmonella typhimurium* and Newcastle disease virus. *Period Biol* 82: 147.
- 109.Hršak I, Tomašić J, Osmak M. 1983. Immunotherapy of B 16 melanoma with peptidoglycan monomer. *Eur J Cancer Clin Oncol*. Vol 19 No 5: 681-686.
- 110.Hršak I, Tomašić J, Pavelić K, Benković B. 1979. On the mechanism of immunostimulatory activity of monomeric peptidoglycans. *Period Biol* 81 (2): 155-157.
- 111.Hršak I, Tomašić J, Pavelić K, Valinger Z. 1979. Stimulation of humoral immunity by peptidoglycan monomer from *Brevibacterium divaricatum*. *Z Immun Forsch* 155: 312.
- 112.Hršak I, Tomašić J. 1985. Immunostimulatory and antimalignant activity of peptidoglycan monomer and its metabolites. *Period Biol* 88 (1): 22-23.
- 113.Husebekk A. 1991. Measurement of C-reactive protein gives valuable information in patients with all types of inflammation. *Tidsskr Nor Laegeforen* 111 (9): 1127-1129
- 114.Idem. 1982. Somatostatin. In: Krieger DT, Brownstein M, Matrin JB eds. *Brain peptides*. New York: John Wiley 712-752.
- 115.Ikeda T, Fujiyama K, Takeuchi T, Honda M, Mokuda O, Tominaga M, Mashiba H. 1989. Effect of thyroid hormone on somatomedin-C release from perfused rat liver. *Experientia* 45 (2): 170-171
- 116.Ioffe S, Havlicek V, Friesen H, Chernick V. 1978. Effect of somatostatin (SRIF) and L-glutamine on neurons of the sensorimotor cortex in awake habituated rabbits. *Brain Res* 153: 441-448.
- 117.Jablons DM, Mule JJ, McIntosh JK. 1989. IL-6/IFN $\beta$ 2 as a circulating hormone. *J Immunol* 142: 1542-1547.
- 118.Jacob R, Barrett E, Plewe G, Fagin KD, Sherwin RS. 1989. Acute effects of insulin-like growth factor I on glucose and amino acid metabolism in the awake fasted rat: comparison with insulin. *J Clin Invest* 83: 1717-1723.
- 119.Jaffe MZ. 1886. *Zeitschrift fuer Physiologische Chemie* 10: 391-400.
- 120.Jekins RC, Ross RJ. 1996. Growth hormone therapy for protein catabolism. *QJM* 89(11): 813-819.

121. Johnson HM, Smith EM, Torres BA, Blalock JE. 1982. Neuroendocrine hormone regulation of in vitro antibody production. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4171-4174.
122. Jones MT. 1978. Control of corticotropin (ACTH) secretion, u: Jeffcoatee S, Hutchinson JSM (ured.): *The endocrine hypothalamus*. Academic Press-London, 385-419.
123. Junqueira CJ, Carneiro J, Kelley RO. 1995. *Osnove histologije*. Školska knjiga, Zagreb.
124. Karmen A. 1955. A note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest* 34: 131-133.
125. Keglević D, Ladešić B, Hadžija O, Tomašić J, Valinger Z, Pokorný M. 1974. Isolation and study of composition of peptidoglycan complex excreted by the biotin - requiring mutant of *Brevibacterium divaricatum* NRRL - 2311 in the presence of penicillin. *Eur J Biochem* 42: 389-400.
126. Keglević D, Ladešić B, Tomašić J, Valinger Z, Naumski R. 1979. Isolation procedure and properties of monomer unit from lysozyme digest of peptidoglycan complex excreted into the medium by penicilin - treated *Brevibacterium divaricatum* mutant. *Biochim Biophys Acta* 585: 273-281.
127. Kind KL, Owens JA, Lok F, Robinson JS, Qinn KJ, Mundy L, Gilmour RS, Owens PC. 1996. Intravenous infusion of insulin-like growth factor I in fetal sheep reduces hepatic IGF-I and IGF-II mRNAs. *Am J Physiol* 271 (6Pt2): R1632-1637.
128. Klapproth J, Castell J, Geiger T, Andus T, Heinrich PC. 1989. Fate and biological action of human recombinant interleukin-1  $\beta$  in the rat in vivo. *Eur J Immunol*; 19:1485-1490.
129. Klasing KC. 1988. Nutritional aspects of leukocytic cytokines. *J Nutr* 118:1436-1446.
130. Knolle P, Lohr H, Treichel U, Dienes HP, Loshe A, Schlaack J, Gerken G. 1995. Parenchymal and nonparenchymal liver cells and their interaction in local immune response. *Z-Gastroenterol* 33 (10): 613-620.
131. Koch BD, Dorfinger LJ, Schonbrunn A. 1985. Pertussis toxin blocks both cyclic AMP-mediated and cyclic AMP-independent activation of somatostatin. *J Biol Chem* 260: 13138-13145.
132. Koff WC, Dunegan MA. 1985. Modulation of macrophage-mediated tumoricidal activity by neuropeptides and neurohormones. *J Immunol* 135: 350-354.

133. Koj A. 1985. Definition and classification of acute phase proteins in the acute phase response to injury and infection. Ed AH Gorton and A Koj 10: 132-232. Amsterdam; Elsevier.
134. Kotani S, Tsujimoto M, Koga T, Nagao S, Tanaka A, Kawata S. 1986. Chemical structure and biological activity relationship of bacterial cell walls and muramyl peptides. Federation Proceedings Vol 45 No 11: 2534-2540.
135. Kotani S, Watanabe Y, Kinoshita F, Kato K. 1977. Inabilities as an immunadjuvant of cell walls of the group B peptidoglycan types and those of arthrobacters. *Biken J* 20: 1-4.
136. Kotani S, Watanabe Y, Shimono T, Harada K, Shiba T, Kus Moto S, Yokogawa K, Taniguchi M. 1976. Correlation between the immunoadjuvant activities and pyrogenicities of synthetic N-acetylmuramyl peptides or amino acids. *Biken J* 19: 9-13.
137. Kovacina KS, Steele-Perkins G, Roth RA. 1989. A role for the insulin-like growth factor II/mannose-6-phosphate receptor in the insulin-induced inhibition of protein catabolism. *Mol Endocrinol* 3(6): 901-906.
138. Kowalski-Saunders PW, Winwood PJ, Arthur MJ, Wright R. 1992. Reversible inhibition of albumin production by rat hepatocytes maintained on a laminin-rich gel (Engelbrecht-Holm-Swarm) in response to secretory products of Kupffer cells and cytokines. *Hepatology* 16 (3): 733-741.
139. Kozak RW, Haskell JF, Greenstein LA, Rechler MM, Waldman TA, Nissley SP. 1987. Type I and II insulin-like growth factor receptors on human phytohemagglutinin-activated T lymphocytes. *Cell Immunol* 109 (2): 318-331.
140. Krantić S, Martel JC, Weismann D, Pujol JF, Quirion R. 1990. Quantitative radioautographic study of somatostatin receptors heterogeneity in the rat extrahypothalamic brain. *Neuroscience* 39: 127-137.
141. Krisch B. 1981. Somatostatin-immunoreactive fiber projections into the brain stem and the spinal cord of the rat. *Cell Tissue Res* 217: 531-532.
142. Krueger JM, Pappenheimer JR, Karnowsky ML. 1982. Sleep - promoting effects of muramyl peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 6102-6106.
143. Kruger TK, Blalock JE. 1986. Cellular requirements for thyrotropin enhancement of in vitro antibody production. *J Immunol.* 137:197-200.

144. Krulich L, Dhariwal APS, McCann SM. 1968. Stimulatory and inhibitory effects of purified extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology* 83:783-790.
145. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. 1994. *Osnove patologije. prema američkom petom izdanju, Školska knjiga, Zagreb.*
146. Kurose I, Ebinuma H, Higuchi H, Yonei Y, Saito H, Kata S, Miura S, Ishii H. 1995. Nitric oxide mediates mitochondrial dysfunction in hepatoma cells induced by non-activated Kupffer cells: evidence implicating ICAM 1-dependent process. *J Gastroenterol Hepatol* 10 Suppl: S68-71
147. Kushner I et al. 1988. The acute phase response: (an overview). *Methods in Enzymology* 163: 373-383.
148. Kushner I, Feldman G. 1978. Control of the acute phase response. Demonstration of C-reactive protein synthesis and secretion by hepatocytes during acute inflammation in the rabbit. *J Exp Med* 148: 466.
149. Lamberts SW, den Holder F, Hofland LJ. 1989. The interrelationship between the effects of insulin-like growth factor I and somatostatin on growth hormone secretion by normal rat pituitary cells: the role of glucocorticoids. *Endocrinology* 124 (2): 905-911.
150. Larsson LI. 1980. Gastrointestinal cells producing endocrine, neuroendocrine and acrine messengers. *Clin Gastroenterol* 9: 485-516.
151. Laskin DL. 1996. Sinusoidal lining cells and hepatotoxicity. *Toxicol Pathol* 24:112-118.
152. Leclerc C, Bourgeois E, Chedid L. 1982. Demonstration of muramyl dipeptide (MDP) - induced T-suppressor cells responsible for MDP immunosuppressive activity. *Eur J Immunol* 12: 249-252.
153. Leclerc C, Chedid L. 1982. Macrophage activation by synthetic muramyl peptides. *Lymphokines* 7: 1-21.
154. Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. 1988. *Science* 241: 1218.
155. Lotze MT, Frana LW, Sharow SO, Robb RJ, Rosenberg SA. 1985. In vivo administration of purified human IL-2. I Half-life and immunological effects of the Jurkat cell line-derived IL-2. *J Immunol* 134: 157-166.

156. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265.
157. Lowy I, Leclerc C, Chedid L. 1980. Induction of antibodies directed against self and altered - self determinants by a synthetic adjuvant muramyl dipeptide and some of its derivatives. *Immunology* 39 : 441-450.
158. Luft R, Efendić S, Hohfelt T. 1978. Somatostatin - both - hormone and neurotransmitter? *Diabetologia* 14:1.
159. Lum G, Leal-Khourī S. 1989. Significance of Low Serum Urea Nitrogen Concentrations. *Clin Chem.* 35/4, 639-640.
160. Mackiewicz A et al. 1991. Effects of cytokine combinations on acute phase protein production in two human hepatoma cell lines. *J Immunol* 146: 3032-3037.
161. Mackiewicz A, Schooltink H, Heinrich PC, Rose-John S. 1992. Complex of soluble human IL-6-receptor /IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *J Immunol* 149 (6):2021-2027.
162. MacLeod CM, Avery OT. 1941. The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood: 111. Immunological properties of the C-reactive protein and its differentiation from normal blood proteins. *J Exp Med* 73:191.
163. Mandarino I, Stenner D, Blanchard N, Nissen S, Gerich J. 1981. Selective effects of somatostatin -14, -25 and -28 on in vitro insulin and glucagon secretion. *Nature* 291: 76-77.
164. Marinkovic S, Jahreis GP, Wong GG, Baumann H. 1989. IL-6 modulates the synthesis of a specific set of acute phase plasma proteins in vivo. *J Immunol* 142 :808-812.
165. Marmour J. 1961. *J Mol Biol* 3: 208.
166. Masihi KN, Kroger H, Lange W, Chedid L. 1989. Muramyl peptides confer hepatoprotection against murine viral hepatitis. *Int J immunopharmacol* 11 (8): 879-886.
167. Mawet E, Shiratori Y, Hikiba Y, Takada H, Yoshida H, Okano K, Komatsu Y, Matsumura M, Niwa Y, Omata M. 1996. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant release from hepatocytes is modulated by Kupffer cells. *Hepatology* 23 (2): 353-358.
168. McComb RB, Bowers GN Jr, Posen S. 1979. *Alkaline Phosphatase*. Plenum Press, New York.



169. Mejboum W. 1939. *Z Physiol Chem.* 258: 117-127.
170. Melchers F, Broun V, Galanos C. 1975. The lipoprotein of the outer membrane of *Escherichia coli*: a B-lymphocyte mitogen. *J Exp Med* 142: 473.
171. Merrill JE, Kutsunai S, Mohlstrom C, Hofman F, Groopman J, Golde DW. 1984. *Science* 224, 1428.
172. Metal'nikov S, Chorine V. 1926. Role des reflexes conditionnels dans l'immunité. *Ann Inst Pasteur Paris* 40: 893-900.
173. Milin Č, Radošević-Stašić B, Kirigin M, Rukavina D. 1982. Effect of growth hormone and somatostatin on the protein content of the regenerating liver in rats. Proc of the 12<sup>th</sup> Cong of Un Yug Physiol Soc, Sept, 1982.
174. Mollard P, Vacher P, Dufy B, Berker JI. 1988. Somatostatin blocks  $Ca^{++}$  action potential activity in prolactin-secreting pituitary tumor cells through coordinate actions on  $K^{+}$  and  $Ca^{++}$  conductances. *Endocrinology* 123: 721-732
175. Moriarity DM, Di Sorbo DM, Litwack G, Savage CR Jr. 1981. Epidermal growth factor stimulation of ornithin decarboxylase activity in a human hepatoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 1752-2756.
176. Moshage HJ, Roelofs HMJ, Van Pelt JF, Hazenberg BPC, Van Leuven MA, Limburg PC, Aarden LA, et al. 1988. The effect of interleukin-1, interleukin-6 and its interrelationship on the synthesis of serum amyloid A and C-reactive protein in primary cultures of adult human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 155: 112-117.
177. Mosmann TR, Coffman RL. 1989. Heterogeneity of Cytokines Secretion Patterns and Function of Helper T Cells. *Adv Immunol* 46: 111-142.
178. Moule SK, McGivan JF. 1988. Epidermal-growth-factor stimulation of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes involves the inactivation of pyruvate kinase. *Biochem J* 255: 361-364.
179. Muegge K, Durum SK. 1990. Cytokines and transcription factors. *Cytokine* 2:1-8.
180. Munoz E, Beutner U, Zubiaga A, Huber BT. 1990. Il-1 activates two separate signal transduction pathways in T helper type II cells. *Immunology* 144: 964-969.
181. Munoz MA, Balon M, Fernandez C. 1983. Direct determination of inorganic phosphorus in serum with a single reagent. *Clin Chem* 29: 372-374.



182. Muscettola M, Grasso G, Fanetti G. 1990. Effect of somatostatin and VIP on interferon-gama production in vitro. 1<sup>st</sup> International Congress ISNIM, Glorence, Italy, May 23-26,1990. Abstract, p 195.
183. Namba H, Morita S, Melmed S. 1989. Insulin-like growth factor-I action on growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels: interaction with somatostatin. *Endocrinology* 124 (4): 1794-1799.
184. Nijsten M, De Groot E, Ten Duis H, Klasen H, Hack C, Aarden L. 1987. Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. *Lancet* (II): 921-21.
185. Nong YH, Titus RG, Ribeiro JMC, Remold HG. 1989. *J Immunol* 143:45.
186. O'Neil LAJ, Bird TA, Gearing AJH, Saklatvala J. 1990. Interleukin-1 signal transduction. *J Biol Chem* 265: 3146-3152.
187. Ottaway CA. 1989. In "Neuroimmune Networks: Physiology and Diseases (ed. Goetzl EJ, Spector NH); p235 Liss, New York.
188. Parillo JE, Fauci As. 1979. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 19: 179-201.
189. Parkes JL, Cardell RR, Grieninger G. 1986. Insulin-like growth factors (IGF I and IGF II) mimic the effect of insulin on plasma protein synthesis and glycogen deposition in cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 134: 427-435.
190. Parks JS. 1989. *Molecular Biology of Growth Hormone. Acta Paediatr Scand (Suppl)* 349: 127-135.
191. Patel YC, Amherdt M, Orci L. 1982. Quantitative electron microscopic autoradiography of insulin, glucagon and somatostatin binding sites on islets. *Science* 217: 1155-1156.
192. Pavlić I. 1985. *Statistička teorija i primjena. Zagreb: Tehnička knjiga.*
193. Pavlov IP. 1928. *Lecture on Conditioned Reflexes. New York, Liverright.*
194. Payan DG, Hess CA, Goetzl EJ. 1984. Inhibition by somatostatin of the proliferation of T lymphocytes and Molt-4 lymphoblasts. *Cell Immunol* 84: 433.
195. Payan DG, McGillis JP, Renold FK, Mitsuhashi M, Goetzl EJ. 1986. Neuropeptide modulation of leukocyte function. *Ann NY Acad Sci* 496: 182.
196. Perianin A, Snyderman R, Malfroy B. 1989. *Biochem Biophys Res Commun.* 161, 520.
197. Petković M, Čuk M, Radošević-Stašić B, Trobonjača Z, Milin Č, Verbanac D, Dvornik Š, Ravlić-Gulan J, Muhvić D, Rukavina D. 1997. Regulatory effects of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>

- T lymphocytes on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. 4<sup>th</sup> International Congress on The Immune Consequences of Trauma, Shock and Sepsis, Munich, Germany 4-8 March.
198. Philips A, Drakenberg K, Persson B, Sjogren B, Eklof AC, Hall K Sara V. 1989. The effects of altered nutritional status upon insulin-like growth factors and their binding proteins in neonatal rats. *Pediatr Res* 26 (2):128-134.
  199. Piotrowski W, Foreman JC. 1985. On the actions of substance P, somatostatin and vasoactive intestinal polypeptide on rat peritoneal mast cells and in human skin. *Naunyn-Schmeideberg's Arch Pharmacol* 331: 364-368.
  200. Polak J, Pearse AGE, Grimelius L, Bloom S, Arimura A. 1975. Growth hormone in gastrointestinal and pancreatic D-cells. *Lancet* 1: 1220-1222.
  201. Poli V, Cortese R. 1989. Interleukin 6 induces a liver-specific nuclear protein that binds to the promoter of acute-phase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8202-8206.
  202. Polić B, Lučin P, Rukavina D. 1990. Effect of Sandostatin on the proliferation of lymphoid cells. *Period biol* 92 (Supp 3): 38.
  203. Polić L, Radošević-Stašić B, Rukavina D, Efendić S. 1983. Humoral immune response of mice and rats treated with somatostatin. *Period biol* 85 (Supp3): 101-102.
  204. Polić L, Radošević-Stašić B, Rukavina D, Efendić S. 1986. Local GVHR in F1 hybrid mice after the treatment of donors with somatostatin. *Period biol* 88 (Supp1): 87-89.
  205. Polić L, Radošević-Stašić B, Rukavina D. 1983. The action of somatostatin on the lymphatic tissue in rats. *Iugoslav Physiol Pharmacol Acta* 19: 164-167.
  206. Postel-Vinay MC, Kelly PA. 1996. Growth hormone receptor signalling. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 10 (3): 323-336.
  207. Radošević-Stašić B, Ćuk M, Mrakovčić-Šutić I, Barac-Latas V, Muhvić D, Lučin P, Petković M, Rukavina D. 1990. Immunosuppressive properties of halothane anesthesia and/or surgical stress in experimental conditions. *Intern J Neuroscience* 51: 235-236.
  208. Radošević-Stašić B, Ćuk M, Rukavina D. 1990. Immunomodulation by somatostatin. *Period. biol* 93/1: 131-139.
  209. Radošević-Stašić B, Polić L, Mrakovčić I, Pahor Đ, Rukavina D. 1987. Modulation of circadian rhythms in antibody and cell-mediated immunity by chemical sympathectomy. *Ann New York Academy of Sciences* 496: 388-394.

210. Radošević-Stašić B, Polić L, Rukavina D, Efendić S. 1983. Inhibition of local graft-versus-host reaction by somatostatin in mice. *IRCS Med Sci*, 11, 1097.
211. Radošević-Stašić B, Trobonjača Z, Lučin P, Ćuk M, Polić B, Rukavina D. 1995. Immunosuppressive and antiproliferative effects of somatostatin analog SMS 201-995. *Intern J Neuroscience* 81: 283-297.
212. Radošević-Stašić B, Trobonjača Z, Petković M, Milin Č, Ćuk M, Ravlić-Gulan J, Marić I, Rukavina D. 1995. Immunoregulating Effects of Peptidoglycan Monomer Linked with Zinc in Adult Mice. *Int Arch Allergy Immunol* 106: 219-228.
213. Radošević-Stašić B, Udović-Širola M, Polić L, Rukavina D. 1986. Humoral immunity of mice subjected to isolated or combined effects of halothane and operative stress. *Periodicum biologorum Vol 88 Supp 1* : 24-26.
214. Radošević-Stašić B. Interni elaborati "Plive".
215. Ramadori G, Sipe JD, Dinarello CA, Mizel SB, Colten HR. 1985. Pretranslational modulation of acute phase hepatic protein synthesis by murine recombinant interleukin-1. *J Exp Med*; 162: 930-942.
216. Ramadori G, Van Damme J, Reider H, Meyer zum Buschenfelde KH. 1988. Interleukin-6, the third mediator of acute-phase reaction, modulates hepatic protein synthesis in human and mouse: comparison with interleukin-1  $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Eur J Immunol* 18: 1259-1264.
217. Reichlin S. 1982. Somatostatin in the nervous system. In: Bloom FE, Bird S, Schmitt FO. eds. *Molecular genetic neuroscience*. New York: Raven Press, 359-372.
218. Rinderknecht E, Humbel RE. 1987. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem*, 253: 2769-2776.
219. Ritchie DG. 1990. Interleukin 6 stimulates hepatic glucose release from prelabeled glycogen pools. *Am J Physiol* 258: E57-E64.
220. Robaye B, Hepburn A, Lecocq R, Fiers W, Boeynaems JM, Dumont JE. 1989. Tumor necrosis factor  $\alpha$  induces the phosphorylation of 28 kD stress proteins in endothelial cells: possible role in protection against cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 163: 301-308.

221. Robbins RJ, Sutton RE, Reichlin S. 1982. Sodium- and calcium-dependent somatostatin release from dissociated cerebral cortical cells in culture. *Endocrinology* 110: 496-499.
222. Robinson ICAF. 1991. The Growth Hormone Secretory Pattern: a Response to Neuroendocrine Signals. *Acta Paediatr Scand (Suppl)* 372: 70-78.
223. Rofe AM, Conyers RA, Bais R, Gamble JR, Vadas MA. 1987. The effects of recombinant tumour necrosis factor (cachectin) on metabolism in isolated rat adipocyte, hepatocyte and muscle preparations. *Biochem J* 247: 789-792.
224. Roldan A, Charreau E, Schillaci R, Eugui EM, Allison AC. 1989. Insulin-like growth factor-1 increases the mitogenic response of human peripheral blood lymphocytes to phytohemagglutinin. *Immunol Lett* 20 (1): 5-8.
225. Roosth J, Pollard RB, Brown SL, Meyer III WJ. 1986. Cortisol stimulation by recombinant interferon-2. *J Neuroimmunol* 12: 311-316.
226. Rostad OP, Epelbaum J, Brazeau P, Martin JB. 1979. Chromatographic and biological properties of immunoreactive somatostatin in hypothalamic and extrahypothalamic brain regions of the rat. *Endocrinology* 105: 1083-1092.
227. Rustgi VK, Jones DB, Dinarello CA, Hoofnagle JH. 1987. Lymphokines and bile secretion in the rat. *Liver* 7: 149-154.
228. Sarkar BC, Chauhan UP. 1967. A new method for determining microquantities of calcium in biological materials. *Anal Biochem* 20: 155-156.
229. Satoh M, Yamazaki M. 1992. Tumor necrosis factor stimulates DNA synthesis of mouse hepatocytes in primary culture and is suppressed by transforming growth factor beta and interleukin 6. *J Cell Physiol* 150 (1): 134-139.
230. Sava G, Tomašić J, Hršak I. 1984. Antitumor and antimetastatic activity of the immunoadjuvant peptidoglycan monomer PGM in mice bearing MCa mammary carcinoma. *cancer Immunol Immunother* 18: 49-53.
231. Scarborough DE, Lee SL, Dinarello CA, Reichlin S. 1989. Interleukin 1 beta stimulate somatostatin biosynthesis in primary cultures of fetal rat brain. *Endocrinology* 124: 549-551.

232. Schusdziarra V, Rouiller D, Unger RH. 1979. Oral administration of somatostatin reduces postprandial plasma triglycerides: gastrin and gut glucagon-like immunoreactivity. *Life Sci* 24:1595-1600.
233. Screpanti I, Morrone S, Meco D, Santoni A, Qulino A, Paolini R, Crisanti A, Mathieson BJ, Frati I. 1989. *J Immunol* 142, 3378.
234. Shi J, Fujieda H, Kokubo Y, Wake K. 1996. Apoptosis of neutrophils and their elimination by Kupffer cells in rat liver. *Hepatology* 24 (5): 1256-1263
235. Shields D, Warren TG, Green RF, Roth SE., Brenner MJ. 1981. The primary events in the biosynthesis and post-translational processing of different precursors to somatostatin. In: Rich DH, Gross B: eds. *Peptides: synthesis-structure-function: proceedings of the seventh American Peptide Symposium*. Rockford III. Pierce Chemical Company 471-479.
236. Shirakawa F, Chedid M, Suttles J, Poliok BA, Mizel SB. 1989. Interleukin-1 and cyclic AMP induce kappa immunoglobulin light chain expression via activation of an NFkB-like DNA-binding protein. *Mol Cell Biol* 9: 959-964.
237. Souvannavong V, Brown S, Adam A. 1990. MDP synergises with interleukin 2 and interleukin 4 to stimulate, respectively the differentiation and proliferation of B cells. *Cell Immunol* 126: 106-116.
238. Specter S, Cimprich H, Friedman H, Chedid L. 1978. Stimulation of an enhanced in vitro immune response by synthetic adjuvant, muramyl dipeptide. *J Immunol* 120: 487-491.
239. Stanisz AM, Scicchitano R, Payan DG, Bienestock J. 1986. In vitro studies of immunoregulation by substance P and somatostatin. *Ann N Y Acad Sci* 496: 217-226.
240. Stead RH, Bienestock J, Stanisz AM. 1987. Neuropeptide regulation of mucosal immunity. *Immunol Rev* 100: 333-358.
241. Steel DM, Witehead AS. 1994. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 15 (2): 81-88.
242. Szentagothai J. 1968. Anatomical considerations, u Szentagothai J i sur. Hypothalamic control of the anterior pituitary.



243. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. 1989. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp 130. *Cell* 58: 573-581.
244. Takei Y, Kawano S, Nishimura Y, Goto M, Nagai H, Chen SS, Omae A, Fusamoto H, Kamada T, Ikeda K. 1995. *J Gastroenterol Hepatol* 10 suppl 1: S65-67.
245. Takezawa R, Watanabe Y, Akaike T. 1995. Direct evidence of macrophage differentiation from bone marrow cells in the liver: a possible origin of Kupffer cells. *J Biochem Tokyo* 118(6): 1175-1183.
246. Talke H, Schubert GE. 1965. Enzymatische Harnstoffbestimmung in Blut und Serum im optischen Test nach Warburg. *Klin Wochenschr* 43:174-175.
247. Tannenbaum GS. 1991. Neuroendocrine Control of Growth Hormone Secretion. *Acta Paediatr Scand (Suppl)* 372: 5-16.
248. Tape C, Kisilevsky R. 1990. Apolipoprotein A-I and serum amyloid A protein half-lives during acute inflammation and amyloidogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1043: 295-300.
249. Thelen M, Rosen A, Nairn AC, Aderem A. 1990. Tumor necrosis factor  $\alpha$  modifies against-dependent responses in human neutrophil by inducing the synthesis and myristoylation of a specific protein kinase C substrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5603-5607.
250. Thoma WEG. 1980. Somatostatin - the long lost antral chalone. *Med Hypotheses* 6: 919-927.
251. Tiller WS, Francis T. 1930. Serological reactions in pneumonia with a non-Protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med* 52:561.
252. Tomioka M, Stead RH, Nielsen L, Coughlin MD, Bienenstock J. 1988. *J Allergy Clin Immunol* 82: 599.
253. Tomljanović D, Naumski R. 1986. Influence of peptidoglycan monomer (PGM) from *Brevibacterium divaricatum* on delayed cutaneous hypersensitivity to 6-aminopenicilinic acid (6-APA) on guinea pigs. *period Biol* 88 (1): 156-157. Rakočević S, Silobrčić V. 1990. A peptidoglycan monomer (PGM) as an antitumor agent in mice: stimulation of phagocytosis but not of specific antitumor immunity by PGM. *Perio Biol* 92 (3): 311-317.



254. Udem BJ, Weinreich D. 1989. In "Neuroimmune Networks: Physiology and Diseases" (ed. Goetzl EJ, Spector NH), p 155. Liss, New York.
255. Vale W, Rivier C, Brazeau P, Guillemin R. 1975. Effects of somatostatin on the secretion of thyrotropin and prolactin. *Endocrinology* 95: 968-977.
256. van Oosten M, van de Bilt E, de Vries HE, van Berkel TJ, Kuiper J. 1995. Vascular adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression on the rat liver cells after lipopolysaccharide administration in vivo. *Hepatology* 22 (5): 1538-1546.
257. Vanderkerken K, Bouwens L, Wisse E. 1990. Characterization of phenotypically and functionally distinct subset of large granular lymphocytes (pit cells) in rat liver sinusoids. *Hepatology* 12 (1): 70-75.
258. Viguerie N, Tahiri-Jouti N, Ayral AM, Cambillau C, Scemama JL, Bastie MJ, Knuhtsen S, Estve JP, Pradayrol L, Susini C, Vaysse N. 1989. Direct inhibitory effects of somatostatin analog, SMS 201-995 on AR4-2J cell proliferation via pertussis toxin-guanosine triphosphate-binding protein-independent mechanism. *Endocrinology* 124: 1017-1025
259. Von Allmen D, Hasselgren PO, Higashiguchi T, Fischer JE. 1992. Individual regulation of different hepatocellular functions during sepsis. *Metabolism* 41 (9): 961-969.
260. Warren TG, Shields D. 1982. Cell-free biosynthesis of somatostatin precursors: evidence for multiple forms of preprosomatostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 3729-3733.
261. Weeke J, Hansen AP, Lundaek K. 1975. Inhibition by somatostatin of basal levels of serum thyrotropin in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 41: 168-171.
262. West MA, Billiar TR, Curran RD, Hyland BJ, Simmons RL. 1989. Evidence that rat Kupffer cells stimulate and inhibit hepatocyte protein synthesis in vitro by different mechanisms. *Gastroenterology* 96 (6): 1572-1582.
263. Whicher JT, Evans SW. 1990. Cytokines in Disease. *Clin Chem* 36/7:1269-1281.
264. Wolfson Q. 1948. Studies in serum proteins; rapid procedure for estimation of total protein, true albumin, total globulin, alpha globulin, beta globulin and gamma globulin in 1,0 ml of serum. *Am J Clin Path* 18: 723-730.



## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1958. god. u Osijeku gdje sam završila osnovno i gimnazijsko školovanje. Studij na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu započela sam školske godine 1976/77, a diplomirala sam 1980.god. na medicinsko-biokemijskom smjeru.

Nakon završenog jednogodišnjeg staža i položenog stručnog ispita zaposlila sam se 1982. god. u Kliničkom bolničkom centru Rijeka u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku.

Školske godine 1980/81. upisala sam postdiplomski studij na Medicinskom fakultetu u Zagrebu iz Kliničke laboratorijske dijagnostike. 1981.god. diplomirala sam na prvom dijelu postdiplomske nastave, a magistarski rad obranila sam 1989. god.

Specijalistički ispit iz medicinske biokemije položila sam 1986. god.

Od 1987. god. radim kao stručni suradnik u dopunskom radnom odnosu na Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, a u zvanje znanstveni asistent izabrana sam 1989.god.

5. studenog 1992.god. postavljena sam na funkciju Predstojnika Zavoda za laboratorijsku dijagnostiku u Kliničkom bolničkom centru Rijeka.

U veljači 1993. god. preuzela sam vodstvo dva kolegija na Medicinskom fakultetu u Rijeci i to Medicinska biokemija i Fizikalne metode u medicinskoj biokemiji za studente VI stupnja Medicinsko-laboratorijski inženjeri.

Tijekom šk.god. 1996/97 vodila sam veliki elektivni predmet za studente XII semestra studija medicine na Medicinskom fakultetu u Rijeci.

Dugogodišnji sam aktivni član znanstvenog projekta 3-01-168, a od 1997.g. suradnik sam na novom projektu 0062002, kojeg vodi prof.dr. Biserka Radošević-Stašić. Sudjelovala sam i u stručnim projektima "Plive" iz Zagreba. Do sada sam objavila 2 izvorna znanstvena rada, od kojih se jedan citira u CC, a objavila sam i 6 kongresnih priopćenja.