

**SVEUČILIŠTE U RIJECI**  
**Medicinski fakultet**

**Ivana Marić**

**ULOGA MORFOGENIH PROTEINA U  
EKSPERIMENTALNOM KOLITISU ŠTAKORA**

**Doktorska disertacija**

**SVEUČILIŠNA KNJIŽNICA  
RIJEKA**



**930040134**

**Rijeka, 1999.**

I AUTOR

ime IVANA MARIĆ  
 mjesto rođenja 10. travnja 1964. Česma  
 fakulteta, odnosno Medicinski fakultet Banja Luka  
 škole za postdiplomski 1987.  
 datum završene nastave Medicinski fakultet Rijeka  
 stupnja 1994.  
 zaposlenje asistent Medicinski fakultet  
Rijeka

II PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA  
 ULOGA MORFOGENIH PROTEINA U EKSPERIMEN  
 TALNOM KOLITISU STAKORA

broj stranica, slika, tabele, 110 str., 17 tab., 24 sl.  
 i drugih podataka 261 ref.,  
 mjesto gdje je Medicinski fakultet Rijeka  
 disertacija izrađena Medicinski fakultet Zagreb  
 disciplina BIOMEDICINA i zdravstvo  
Prof.dr.sc. Slobodan Vukicević  
 fakultet u kojem je Medicinski fakultet u Rijeci  
 disertacija obranjena

III OCJENA I OBRANA

datum obrane teme 12. studeni 1998.  
 mjesto obrane rada 18. svibnja 1999.  
 ime Vijeća na kojoj 18. srpnja 1999.  
 je disertacija odobren prof.dr.sc. Dragica Bobinao,  
 članstva koje Prof.dr.sc. Mladen Persid, doc.  
 odobrilo dr.sc. Ivan Šetkvić i prof.dr.  
sc. Slobodan Vukicević;  
 datum obrane disertacije 19. rujna 1998.  
 članstva pred I s t i  
 disertacijom

ime

**Rad je izrađen na Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta u Rijeci i u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu.**

**Voditelj: prof.dr.sc. Slobodan Vukičević**

**Rad ima 125 stranica, 24 slike i 17 tablica.**

*Mojim roditeljima i sestrama*



*Zahvalnost za savjete i pomoć pri izradi rada dugujem: svom voditelju rada prof.dr.sc. Slobodanu Vukičeviću, predstojnici Zavoda za anatomiju prof.dr.sc. Dragici Bobinac i svojim kolegicama mr.sc. Sanji Zoričić, ing. Snježani Šimac, Mariji Mršić, Mirjani Palčić i Djurđi Car. Osoblju Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta u Rijeci i Laboratorija za mineralizirana tkiva u Zagrebu, dugujem također, veliku zahvalnost.*

# SADRŽAJ

stranica

## SAŽETAK

## SUMMARY

<b>I UVOD</b>	<b>1</b>
1. Koštani morfogogenetski proteini	1
1.1. Građa koštanih morfogogenetskih proteina	3
1.2. BMP/TGF $\beta$ obitelj	5
1.3. Geni za koštane morfogogenetske proteine	9
1.4. Receptori za koštane morfogogenetske proteine	9
1.5. Unutarstanični signal u prijenosu poruke preko serin/treonin kinaza receptora	10
1.6. Koštani morfogogenetski proteini kao pleotropni činitelji	12
1.7. Izražaj koštanih morfogogenetskih proteina i glasničke RNA za koštane morfogogenetske proteine	13
1.8. Izražaj glasničke RNA za receptore koštanih morfogogenetskih proteina	15
2. Crohnova bolest	18
2.1. Etiologija Crohnove bolesti	18
2.1.1. Genetski činitelji	20
2.1.2. Utjecaj okoliša	21
2.2. Patogeneza upalne bolesti crijeva	21
2.2.1. Početni događaji	21
2.2.2. Događaji koji održavaju bolest	22
2.2.3. Imunoregulacijske nepravilnosti	23
2.2.4. Oštećenje tkiva	25
2.2.5. Klinički simptomi	28
2.2.6. Terapija Crohnove bolesti	29
3. Eksperimentalni modeli kolitisa	30
<b>II CILJ RADA</b>	<b>33</b>

<b>III MATERIJAL I METODE RADA</b>	<b>34</b>
1. Materijal	34
1.1. Životinje	34
1.2. Proteinski preparati	34
2. Metode rada	34
2.1. Pokusni model izazivanja Crohnove bolesti	34
2.2. Plan rada	38
2.3. Uzimanje materijala i priprema tkiva za daljnju obradu	41
2.4. Makroskopski indeks oštećenja	42
2.5. Mikroskopski indeks oštećenja	42
2.6. Histomorfometrija i imunohistokemija	43
2.7. Nakupljanje i aktivnost neutrofila	46
2.8. Statistička analiza	46
<b>IV REZULTATI</b>	<b>47</b>
1. Opis modela TNBS/etanol kolitisa	47
2. Pilot pokus	51
2.1. Profilaktička primjena BMP-7	51
2.2. Terapijska primjena BMP-7	51
3. Profilaktičko i terapijsko djelovanje BMP-7 i -6	52
3.1. Opis promjena na crijevima i makroskopski indeks oštećenja	52
3.2. Mikroskopski indeks oštećenja	56
3.3. Morfometrija crijeva	60
3.4. Rezultati imunohistokemijskih analiza	64
3.4.1. Imunohistokemijsko određivanje izražaja BMP-7 i -3	64
3.4.2. Imunohistokemijsko obilježavanje stanica u fazi proliferacije	66
3.4.3. Imunohistokemijsko određivanje $\alpha$ -aktina glatkih mišićnih stanica i vimentina	69
3.4.4. Imunohistokemijsko određivanje izražaja kolagena tipa I i III	72
3.4.5. Histokemijsko određivanje nakupljanja i aktivnosti neutrofila pomoću naftol AS-D kloracetat esteraze	75

<b>V RASPRAVA</b>	<b>77</b>
<b>VI ZAKLJUČCI</b>	<b>85</b>
<b>Prilog 1.</b> Lista preparata koji su rabljeni u liječenju eksperimentalnog kolutisa	86
<b>Prilog 2.</b> Terapija Crohnove bolesti u ljudi	93
<b>VII LITERATURA</b>	<b>103</b>
<b>VIII ŽIVOTOPIS</b>	<b>125</b>

## SAŽETAK

U našem istraživanju smo prikazali učinak morfogenih proteina, koštanih morfogenetskih proteina BMP-7 i -6, od engl. bone morphogenetic protein, na štakorskom modelu upalne bolesti crijeva izazvane jednokratnom intrakoličnom primjenom haptena – trinitrobenzensulfonične kiseline (TNBS) otopljene u etanolu. Oboljenje se karakterizira teškim oštećenjem kolona koje se očituje područjima nekroze okruženih sa upalno promijenjenim tkivom. BMP-7 i -6 smo primijenili prije i nakon izazivanja kolitisa. U skupini u kojoj smo ispitivali profilaktičku primjenu BMP-7 i -6 (doza 100 µg/kg), proteine smo aplicirali i.v. 1,5 sat prije izazivanja kolitisa i nastavili liječiti 24 h, 48 h, 72 h, 5. i 10. dan. U skupini u kojoj smo ispitivali terapijsku primjenu morfogenih proteina, BMP-7 i -6 su aplicirani 24 h nakon izazivanja kolitisa u dozama od 30, 100 i 250 µg/kg za BMP-7, a za BMP-6 30, 100 i 300 µg/kg. Liječenje smo nastavili 48 h, 72 h, 5. i 10. dan. Životinje su žrtvovane dva tjedna nakon izazivanja kolitisa. Veličina ozljede uzoraka tkiva kolona su analizirane makroskopski i mikroskopski, te histomorfometrijski i imunohistokemijski. Primjena BMP-7 i -6 prije i nakon ozljede znatno smanjuje veličinu oštećenja kolona. Makroskopski vidljiva nekroza i mikroskopske ulceracije su smanjene primjenom BMP-7 (doza 250 µg/kg) i BMP-6 (doza 100 µg/kg). Stoga, možemo reći da morfogeni proteini BMP-7 i -6 su značajni u cijeljenju oštećenja u eksperimentalnom kolitisu štakora.



## SUMMARY

In our study we evaluated the effect of morphogenic proteins, bone morphogenetic proteins BMP-7 and -6 in a rat model of inflammatory bowel disease. A single intracolonic administration of haptene – trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) dissolved in ethanol induces severe colonic damage which is characterized by area of necrosis surrounded by areas of inflammation tissue. BMP-7 and -6 was administered before and after induction of colitis. In the first study group, BMP-7 and -6 (100 µg/kg) was administered i.v. 1.5 hour before induction of colitis and continued 24 hr, 48 hr, 72 hr, 5<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> day. In subsequent study group, BMP-7 and -6 was begun 24 hr after induction of colitis at i.v. doses of 30, 100 and 250 µg/kg for BMP-7 and 30, 100 and 300 µg/kg for BMP-6 and continued 48 hr, 72 hr, 5<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> day. Animals were killed 2 weeks after injury. Colonic tissue samples were evaluated macroscopically and microscopically, histomorphometrically and immunohistochemically for mucosal injury. Administration of BMP-7 and -6 before and after induction of colitis significantly ameliorated tissue damage. Macroscopic necrosis and microscopic ulcerations were reduced at BMP-7 dose of 250 µg/kg and at BMP-6 dose of 100 µg/kg. In conclusion, BMP-7 and -6 has a key role in mucosal healing in experimental model of colitis in rats.

# I UVOD

Danas je poznato mnogo toga o Crohnovoj bolesti koju su 1932. godine prvi put opisali Crohn i suradnici (35) i označili kao regionalni enteritis. Od 1966. godine objavljeno je više od 12 000 članaka o ovoj bolesti. Bolje upoznavanje ove bolesti dovelo je do smanjenja mortalita, ali morbiditet je još uvijek ostao visok, a uzrok bolesti nepoznat. Osim toga, liječenje Crohnove bolesti nije zadovoljavajuće za sve bolesnike. Pokusni modeli kolitisa omogućavaju procjenu terapijskog djelovanja lijekova, primjenu novih agensa, procjenu njihovog djelovanja, a potom primjenu u kliničkim istraživanjima.

## 1. Koštani morfogogenetski proteini

Morfogeni proteini, BMPs (od engl. bone morphogenetic proteins) - koštani morfogogenetski proteini, su novi činitelji rasta i diferencijacije. Ime su dobili po tome što su prvotno izolirani iz goveđe kosti na osnovi njihovog svojstva da potiču stvaranje nove kosti *in vivo* (222, 224). Osim toga, BMPs su uključeni u embrionalni razvoj i diferencijaciju brojnih tkiva (90, 91, 114, 116, 245, 246). To su citokini sa mnogostrukim djelovanjem te reguliraju rast, diferencijaciju i apoptozu mnogih stanica (osteoblasti, hondroblasti, živčane i epitelne stanice).

BMPs čine veliku podobitelj unutar nadobitelji preobražavajućeg činitelja rasta tipa  $\beta$  - TGF- $\beta$  (od engl. transforming growth factor -  $\beta$ ). Do danas je izolirano 15 članove BMP-obitelji (tablica 1). Članovi TGF- $\beta$  nadobitelji pokazuju različite biološke aktivnosti i igraju ključnu ulogu u migraciji, proliferaciji i diferencijaciji mezenhimskih stanica tijekom embriogeneze te oporavka i regeneracije tijekom postnatalnog života (93). Osim toga, prisutni su u razlučitim organizmima, od insekata do sisavaca (93, 174). Evolucijska konzervacija ovih gena u različitim vrsta podupire tvrdnju da su ovi proteini značajni za normalni rast i razvoj. BMPs su važni u poticanju stvaranja kosti ali imaju ulogu u razvoju brojnih tkiva i organa koji se stvaraju putem mezenhimsko-epitelijanog međudjelovanja (233).

**Tablica 1.** BMP obitelj u sisavaca (168).

<b>BMP podobitelj</b>	<b>Generičko ime</b>	<b>BMP oznaka</b>
<b>BMP 2/4</b>	BMP-2A	BMP-2
	BMP-2B	BMP-4
<b>BMP 3</b>	Osteogenin	BMP-3
	Činitelj rasta i diferencijacije-10 (GDF-10)	BMP-3A
<b>Op-1/ BMP-7</b>	BMP-5	BMP-5
	Vgr-1 (protein iz <i>Xenopusa</i> iz vegetativnog pola)	BMP-6
	Osteogeni protein-1 (Op-1)	BMP-7
	Osteogeni protein-2 (Op-2)	BMP-8
	Osteogeni protein-3 (Op-3)	BMP-8B
	Činitelj diferencijacije-2 (GDF-2)	BMP-9
	BMP-10	BMP-10
	Činitelj rasta i diferencijacije-11 (GDF-11)	BMP-11
<b>GDF-5,6,7</b>	Činitelj rasta i diferencijacije-7 (GDF-7) ili hrskavični morfogenetski protein-3 (CDMP-3)	BMP-12
	Činitelj rasta i diferencijacije-6 (GDF-6) ili hrskavični morfogenetski protein-2 (CDMP-2)	BMP-13
	Činitelj rasta i diferencijacije-5 (GDF-5) ili hrskavični morfogenetski protein-1 (CDMP-1)	BMP-14
	BMP-15	BMP-15



## 1.1. Građa koštanih morfogenetskih proteina

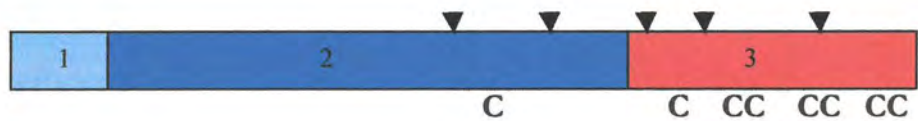
BMPs su otkriveni u goveđim kostima te izolirani iz demineraliziranog koštanog matriksa (25, 144, 249, 250). Na osnovi poznavanja slijeda aminokiselina konstruirane su oligonukleotidne probe koje se upotrijebljene za dobivanje goveđih komplementarnih DNA molekula (cDNA) za BMPs (251). Humane cDNA za BMPs su klonirane pomoću oligonukleotidnih proba zasnovanih na peptidnim sekvencijama goveđih BMPs. Veliki napredak u karakterizaciji BMPs je napravljen kada su 1988. godine Wozney i sur. (249) izolirali 4 različita cDNA klona humanog BMP. Tri klonirana činitelja BMP-2, BMP-2B (BMP-4) i BMP-3 (osteogenin) su pokazala da dijele strukturne osobine sa TGF- $\beta$ 1, dok četvrti činitelj BMP-1 je sličan poznatim proteazama. Nakon toga, klonirani su BMP-5,-6 i -7 (25) te osteogeni protein-1 i protein-2 (Op-1 i Op-2) (144). Klonovi za BMP-6 su dobiveni iz genske banke linije U-2 OS, a potom iz genske banke cDNA humane placente i mozga (25). OP-1 je kloniran i iz genske banke hipokampusu i placente (144).

BMPs su dimerne molekule veličine 30-38 kDa. Njihova struktura je presudna za biološku aktivnost *in vivo*. Ovi proteini se proizvode unutar stanice u obliku velikih prekursorsorskih proteina koji su prije sekrecije podložni proteolizi na RXXR mjestu. Molekula prekursora sadrži hidrofobno sekretorno područje, osnovno propeptičko područje i zrelo područje (slika 1). Zreli dio svake molekule nalazi se na karboksilnom kraju prepropeptida i sadrži sedam visoko konzerviranih cisteinskih domena. Konzervirana 7-Cys domena odgovara prstenastoj strukturi označenoj kao cisteinska petlja (135). Aktivni oblik proteina je dimerna molekula (u obliku homodimera ili heterodimera) koju čine dvije zrele regije povezane i stabilizirane disulfidnim vezama. Svaki od BMPs je glikoliziran i sadrži potencijalna glikolizacijska mjesta. U molekuli BMP-6 postoji 5 glikolizacijskih mjesta, a u molekuli BMP-7, iako postoje 4 moguća mjesta za N-glikolizaciju (3 u zreloj domeni i 1 u prodomeni), samo jedno mjesto u zreloj domeni uz mjesto u prodomeni se glikolizira.

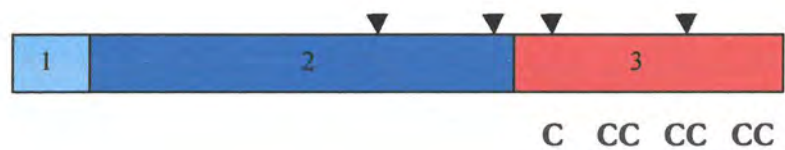


- 1 - vodeće sekretorno mjesto
- 2 - propeptid
- 3 - zrelo područje sa 7 cisteina
- ▼ - potencijalna glikolizacijska mjesta
- C - cisteinski ostaci

**hBMP-6**  
(mVgr-1)



**hBMP-7**



**Slika 1.** Shematski prikaz građe koštanih morfogenetskih proteina. Usporedba građe BMP-6 i BMP-7 (175).

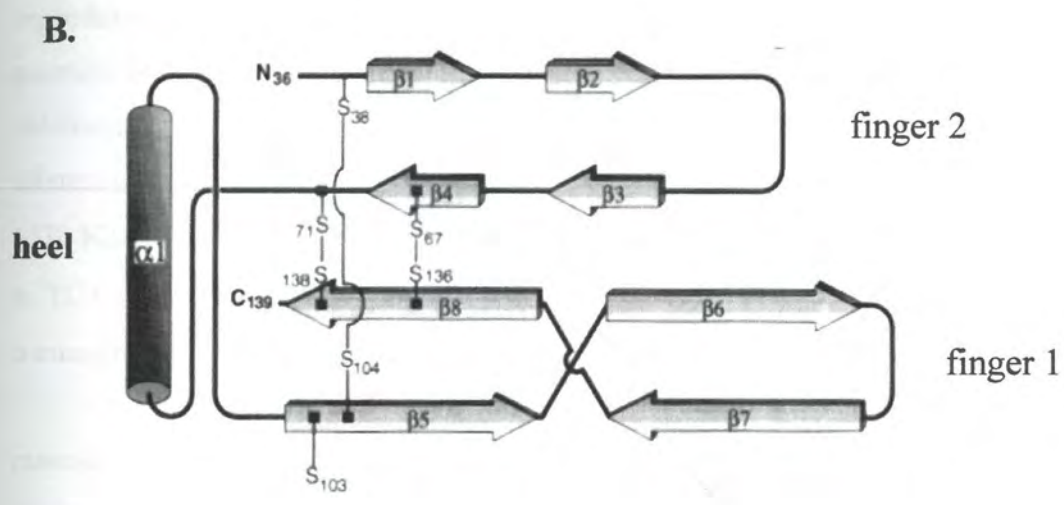
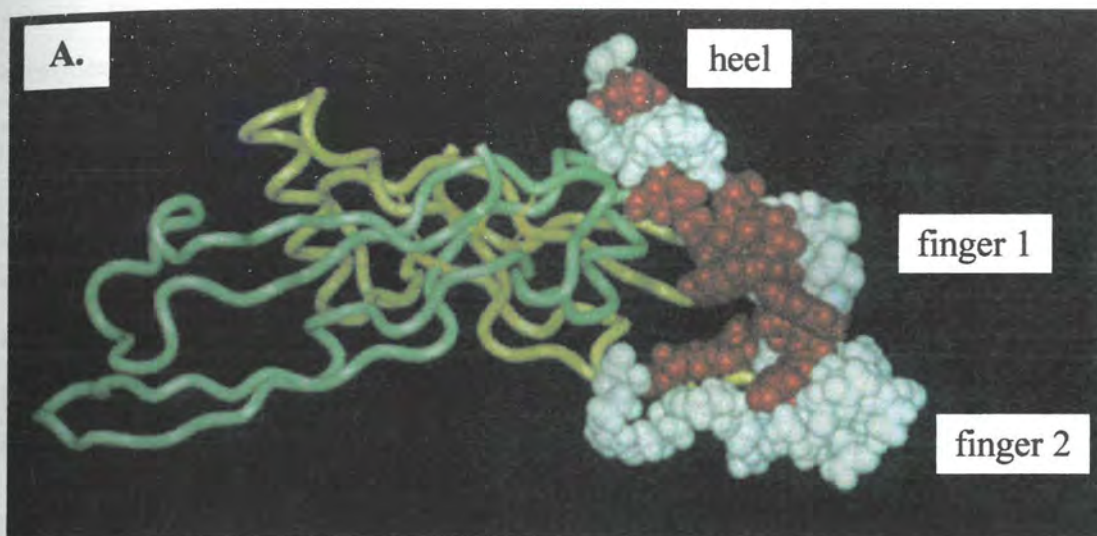
Griffith i sur. (64) su opisali kristalnu strukturu BMP-7 koja predstavlja osnovni model građe BMP obitelji (slika 2A). BMPs su dimerni ligandi koji čine dva monomera građena od po 2  $\beta$  plahte sa cisteinskom petljom u svakom sloju (slika 2B). Na taj način nastaju četiri sloja paralelnih, suprotno usmjerenih  $\beta$  plahti, koje izlaze iz cisteinske petlje. BMP-7 cisteinska petlja se sastoji od jezgre koju čini monomer sa 3 disulfidne veze: dvije Cys-67-Cys-136 i Cys-71-Cys-138, koji čine prsten preko koje prelazi treća Cys-38-Cys-104.  $\alpha$ -heliks je smješten na suprotnom kraju petlje, a N-terminalni kraj nije stabilizirana disulfidnim vezovima kao u TGF- $\beta_2$ . Sekundarnu strukturu  $\beta$  plahti počevši od Gln-36 čine:  $\beta$ 1 (Lys-39 do His-41),  $\beta$ 2 (Tyr-44 do Ser-46),  $\beta$ 3 (Glu-60 do Ala-63) i  $\beta$ 4 (Tyr-65 do Glu-70),  $\beta$ 5 (Cys-103 do Asn-63),  $\beta$ 6 (Ile-112 do Asp-118),  $\beta$ 7 (Asn-122 do Tyr-128) i  $\beta$ 8 (Val-132 do His-139); a  $\alpha$ -heliks (Thr-82 do Ile-94). Ova struktura BMP-liganda slična je šaci tako da svaki monomer predstavlja kažiprst s tim da su u funkcionalnih dimera prsti orijentirani u suprotnim smjerovima (slika 2C).  $\alpha$ -heliks leži okomito na osovinu prstiju čineći na taj način korijen ruke, a N-terminal kraj odgovara palcu.

## 1.2. BMP/TGF- $\beta$ obitelj

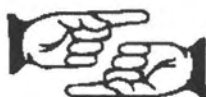
Na osnovi sličnosti u građi BMPs su podijeljeni u nekoliko skupina. Tako, BMP-2 i -4 pokazuju sličnost u slijedu aminokiselina u zreom dijelu molekule od 92% i čine jednu skupinu; BMP-5, -6 i -7 čine drugu i pokazuju sličnost u zreoj regiji prosječno 89%, a u propeptidnoj regiji 52-64%. Ovoj skupini su pridruženi i novootkriveni proteini: BMP-8 (osteogeni protein -2), BMP-8B (osteogeni protein-3), BMP-9 (činitelj rasta i diferencijacije-2/GDF-2), BMP-10 i BMP-11 (GDF-11). BMP-3 čini treću skupinu i u propeptidnoj regiji pokazuje sličnost sa BMP 2-7 od 16-21% (25). Četvrtu skupinu čine činitelji rasta i diferencijacije GDF (od engl. growth/differentiation factor) i to GDF-7 (hrskavični morfogenetski protein-3/CDMP-3 ili BMP-12), GDF-6 (CDMP-2 ili BMP-13), GDF-5 (CDMP-1 ili BMP-14) i BMP-15 (168).

BMPs su članovi TGF- $\beta$  genske nadobitelji (slika 3) i u srodstvu sa molekulama koje su otkrivene u različitim razvojnim sustavima, u intervertebrata i vertebrata, a koji imaju važnu ulogu u određivanju sudbine stanica tijekom razvoja. Tako su BMP-2 i -4 identični *decapentaplegic* (*dpp*) genu *Drosophila melanogaster* u 75%. *dpp* je odgovoran za dorzoventralni





**C.**



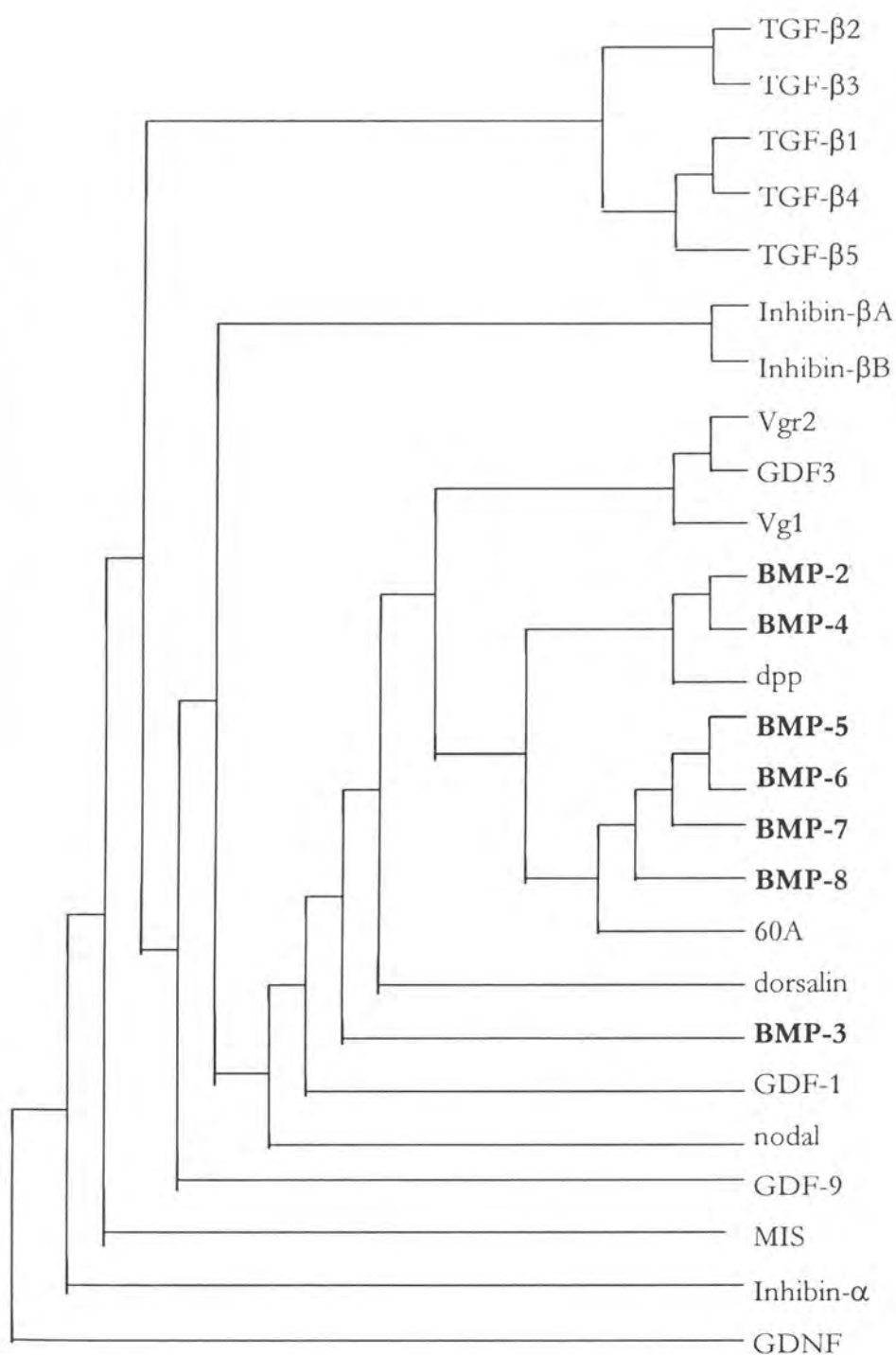
**Slika 2.** Struktura BMP-7 (64).

**A.** Kristalna struktura BMP-7. **B.** Shematski prikaz BMP-7 monomera kojeg čine dvije  $\beta$  plahte označene kao kažiprst 1 i 2 (finger 1 i 2). **C.** Prikaz BMP-7 kao dimeričkog liganda koji nalikuje šaci sa dva suprotno orijentirana kažiprsta.

razvoj *Drosophila melanogaster*, regulira razvoj dorzalnog ektoderma, visceralnog mezoderma, stvaranje zamišljenog diska i morfogenezi crijeva (53, 58, 85, 130, 149). Ova činjenica ukazuje da BMP-2 i -4 možda imaju sličnu ulogu u razvoju vertebrata (148). BMP-5, -6 i -7 su vrlo bliski sa proteinom 60A u *Drosophila* (slijed aminokiselina u zrelih polipeptidnim regijama je identičan u 70%) koji se ispoljava tijekom ranog embrionalnog razvoja *Drosophila* (43, 247). Molekule BMPs su bliske i sa Vg-1, činiteljem rasta porijeklom iz *Xenopus*. Njegova glasnička RNA je lokalizirana na vegetativnom polu oocite i pretpostavlja se da je povezana sa indukcijom mezoderma (246). Ovi odnosi ukazuju na moguću ulogu BMP-2-7 u specijalizaciji mezoderma u viših životinja.

Ostali članovi nadobitelji TGF- $\beta$  su u prilično udaljenom srodstvu sa BMPs ali su također uključeni u embrionalni razvoj. To je činitelj koji inhibira razvoj Müllerovih kanalića (od engl. Müllerian inhibiting substance, MIS), važni morfogeni signal u razvoju reproduktivnog sustava embrija u sisavaca (24), *Nodal*, mišji gen zražen u čvorovima tijekom gastrulacije (258), zatim inhibini i aktivini u sisavaca koji zajednički djeluju te reguliraju oslobađanje FSH iz hipofize i potiču razvoj mezoderma (54, 107, 128) te činitelji rasta i diferencijacije (GDFs) koji su vjerojatno uključeni u diferencijaciju neurona i rast živaca (102, 137). Konačno, BMPs pokazuju prosječnu homologiju od oko 30-40% sa TGF- $\beta$  obitelji. To su TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 i TGF- $\beta$ 3 u ljudi, TGF- $\beta$ 4 u pileta i TGF- $\beta$ 5 u *Xenopus*. Oni su prisutni u mnogim tkivima embrija koja su podvrgnuta sekundarnoj indukciji.

Na osnovi prisustva članova BMP obitelji u različitim organizmima te njihovoj ulozi u razvoju pojedinih organa, predloženo je da se BMP obitelj preimenuje u DVR obitelj (od engl. *decapentaplegic-Vg-related*) na osnovi dva člana koji su prvi otkriveni, *dpp* i *Xenopus Vg*. Naziv DVR obitelj ukazuje na to da ovi polipeptidni činitelji imaju puno šire područje djelovanje nego što je stvaranje kosti. Podatak da su ove signalne molekule konzervirane tijekom razvoja u mnogim organizmima, od insekata do čovjeka, znači preko gotovo 600 milijuna godina, ukazuje da muhe, vodozemcima i ljudi (cijeljenje prijeloma) imaju zajednički motiv za signaliziranje (166).



**Slika 3.** Članovi TGF- $\beta$  nadobitelji i odnos koštanih morfogenetskih proteina prema ovoj nadobitelji. Činitelji su stavljeni u međusobni odnos na osnovi sličnosti u slijedu aminokiselina sa humanim TGF- $\beta$ 1 kao prototipom (26).



### 1.3. Geni za koštane morfogenetske proteine

Geni za BMPs su smješteni na nekoliko kromosama u ljudi. Gen za BMP-6 je smješten na kromosomu 6, a za BMP-7 na kromosomu 20. Položaj gena za pojedini BMPs može ukazivati na moguću povezanost sa određenim oboljenjima. Tako npr. kromosom 20 je povezan sa Holt-Oram sindromom (HOS) (254), koji je karakteriziran poremećajima razvoja srca i skeleta. Oboljenje se manifestira defektom atrioventrikularnog septuma te lomovima i nestabilnošću gornjeg ekstremiteta (136). BMPs su prisutni u drugim patološkim stanjima uključujući myositis ossificans i osteogeni sarkom (223, 255). Prekomjerna ekspresija BMP misli se da doprinosi miozitičnim lezijama (223), a transgenična prekomjerna ekspresija BMP-6 koja je pod kontrolom keratin 10 promotora, uzrokuje psorijazu.

Mutacije gena za BMPs mogu uzrokovati razvojne anomalije (97, 207). Tako, nul-mutacija za BMP-7 u miševa manifestira se razvojnim anomalijama bubrega, oka, lubanje, prsnog koša i stražnjih udova (44, 87, 112). *Bmp7* nul-mutacijski miševi umiru ubrzo nakon rođenja. Bubrezi novorođenih *Bmp7* *-/-* miševa su manji, sa urednom glomerulogenezom, ali slabim razvojem nefrona. Proksimalni zavijeni kanalići su dobro diferencirani dok su distalni deficijentni. U većini miševa sa *Bmp7* *-/-* otkriveni su policistični bubrezi, unilateralno ili bilateralno.

Podaci o građi gena za BMPs su oskudni. Kodirajuće regije nekih gena za BMP obitelj su prisutne samo na dva egsona, dok geni za BMP-6 i -7 sadrže 7 egsona (115, 146).

### 1.4. Receptori za koštane morfogenetske proteine

BMPs su multifunkcionalni citokini koji prenose signal preko različitih heteromeričkih BMP receptora tipa I i II, a koji su ključni u razumijevanju uloge BMPs u različitim morfološkim procesima (252).

BMPs se vežu za BMP receptore tipa I i II (BMPR-I i -II), koji su membranske serin/treonin kinaze. Razlikujemo dvije vrste receptora tipa I. To su BMPR-IA koji se još naziva aktivin receptoru slična kinaza ili ALK-3 i tip IB ili ALK-6. Za BMP receptore tipa I (BMPR-IA i BMPR-IB) vežu se BMP-2, rhBMP-4, BMP-7 i CDMP-1 (GDF-5). Receptori su građeni iz 3 dijela: kratke vanstanične domene sa 10-12 cisteinskih ostataka, membranske domene i unutarstanične domene sa serin/treonin kinaznom regijom (55, 106). Serin/treonin

kinaze u BMPR-I i II pokazuju sličnost u slijedu aminokiselina od 84% (95). BMPR-I posjeduje domenu koja sadrži karakterističan SGSGS motiv (GS domenu). GS domena igra važnu ulogu u prijenosu signala jer razlikuje tip I od tipa II serin/treonin kinaznih receptora. BMP receptori tipa II (BMPR-II) fosforiliraju GS-domenu receptora tipa I, a BMP receptor tipa I fosforilira *Smads* molekule koje predstavljaju unutarstanične glasnike (61).

BMPs se vežu na receptore tipa II u odsutnosti receptora tipa I, ali receptor tipa I može vezati ligand samo u prisutnosti receptora tipa II. Ipak, BMPs se slabo vežu na receptore tipa I i u odsutnosti receptora tipa II, a u prisutnosti posljednjih značajno ubrzava njihovo vezivanje na receptore tipa I (252). Za BMP receptore tipa II se vežu ligandi, ali sa mnogo manjim afinitetom nego u prisutnosti BMP receptora tipa I.

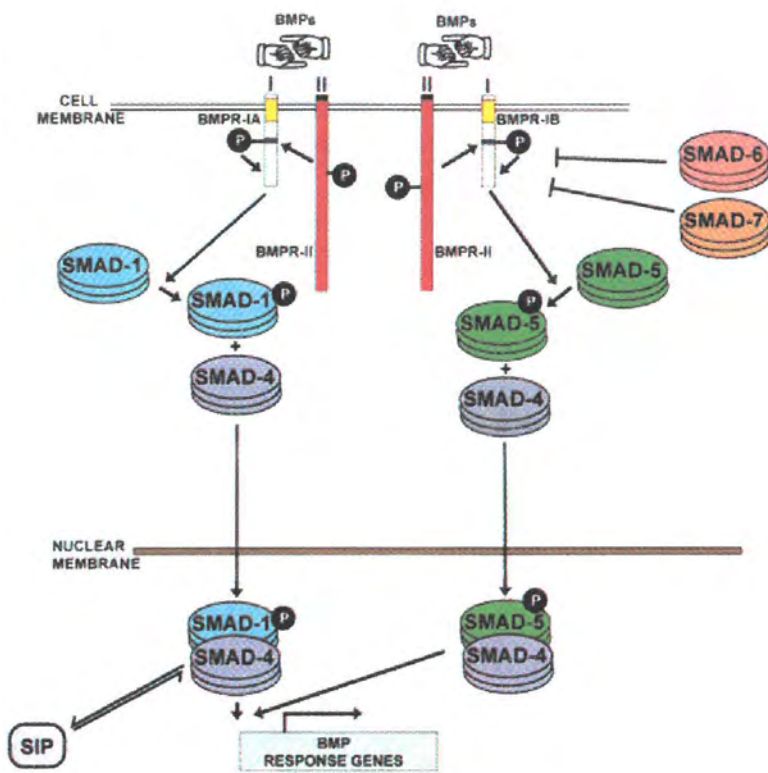
Članovi BMP obitelji imaju različit afinitet vezivanja na različite kombinacije receptora tipa I i II. Tako, BMP-7 se veže sa mnogo većim afinitetom na BMPR-IB nego na BMPR-IA (213). Razlike u afinitetu vezanja na tip I ili tip II receptorskih kompleksa mogle bi biti posljedica preklapajućih, ali strogo različitih funkcionalnih učinaka BMPs (129). U prisutnosti BMPR-II, BMPR-IB veže s većom efikasnošću BMP-4 i BMP-7, dok BMPR-IA s manjom efikasnošću, što ukazuje da bi BMPR-IA mogao tvoriti visoko afinitetne komplekse sa drugim receptorima tipa II *in vivo* (144, 176). Ligandi za BMP receptore tip II su BMP-4 i -7, s tim da BMPR-II veže BMP-7 sa većim afinitetom nego BMP-4.

### 1.5. Unutarstanični signal u prijenosu poruke preko serin/treonin kinaza receptora

Unutarstanični signalni putovi potaknuti aktivacijom serin/treonin kinaza receptora nisu u potpunosti razjašnjeni. Kao mogući unutarstanični prijenosnici predloženi su: gen izoliran iz *Drosophila* *mothers against dpp* (*Mad* molekule), gen otkriven u obliku *C. elegans* (*Sma*), potom u žabe *Xenopus* (*Xmad*) i sisavaca (*MADR 1* i *DPC 4*). Pojam *Sma* i *Mad* su spojeni u jedinstveni *Smad* da bi se pojednostavila nomenklatura. Humani *Smad* protein (*DPC4*), član *Mad* obitelji, kandidat je za supresorske tumorske gene u humanom karcinomu gušterače (121).

*Smads* molekule su slične *Mad* molekulama (od engl. *mother against decapentaplegic*) u *Drosophila*. Oni u nematoda kodiraju tri gena: *Sma* -2, -3 i -4. *Smad* obitelj čini 8 članova (*Smad1* do *Smad8*). Posrednici prijenosa signala za BMP obitelj su fosforilirani *Smad 1* i *5*





Slika 4. BMP receptori i prijenos signala (168).

zajedno sa Smad 4. Smad 2 i 3 su prijenosnici signala za djelovanje TGF- $\beta$  i aktivina, a Smad 6 i 7 djeluju kao antagonisti te inhibiraju prienos signala TGF- $\beta$ /BMP nadobitelji (73, 75). BMP receptor tip I fosforilira Smads, a potom fosforilirani Smad 1 čini heteromerički kompleks sa Smad 4, ulazi u jezgru i aktiviraja transkripciju ranih gena za BMP obitelj (27). Novootkriveni protein SIP (od. engl. Smad interacting protein) djeluje tako da mijenja vezivanje heteromeričkog kompleksa Smad1/Smad4 na DNA (167). Čini se da BMPs reguliraju progresiju staničnog ciklusa i na taj način određuju diferencijaciju mezenhimskih stanica.

### 1.6. Koštani morfogenetski proteini kao pleotoprini činitelji

BMPs (-2,-3,-4,-5,-6,-7,-8) su uključeni u stvaranje hrskavice i kosti in vivo i in vitro (25, 113, 146, 147, 172, 178, 231, 232, 244, 249). Ovi proteini reguliraju svaki ključni korak u koštanoj morfogenezi: kemotaksiju, mitozu i diferencijaciju hrskavice u kost. Njihovo djelovanje je ovisno o koncentraciji. Tako npr. već pri koncentraciji od 100-200 pM zamijetljiva je kemotaksija (za monocite u ljudi), a optimalna pri femtomolarnim koncentracijama BMPs. Mitoza je prisutna pri koncentraciji od 100 pM, a diferencijacija pri nanometarskim koncentracijama. BMPs se vežu za sastojke izvanstaničnog matriksa (kolagen, proteoglikani, fibronektin) koji imaju važnu ulogu u morfogenezi. Vezivanje BMPs na heparin sulfat, heparin i kolagen tipa IV u bazalnoj membrani je važno u usmjeravanju koštanog razvoja (76, 150). Ovo vezivanje BMPs za heparin je moguće objašnjenje za postojanje angiogeneze i prodiranje krvnih žila u hrskavici prije nastanka kosti. (36, 150). In vivo studije sa radioaktivno obilježenim BMP-7 (<sup>125</sup>I-OP-1) su pokazale da se BMP-7 veže za komponente vanstaničnog matriksa i to sa većim afinitetom za kolagen tip IV, a manje za heparin, kolagen tip I i VI. Lietman i sur. (105) su pokazali da 7-10 dana nakon kultiviranja BMP-7 sa usadcima zglobne hrskavice u svinja, BMP-7 povećava sintezu proteoglikana u hondrocitima za 70-120%. BMPs povećava aktivnost alkalne fosfataze i sintezu kolagen u neonatalnim periostalnim stanicama kalvarije, osteoblastima i stanicama strome koštane srži (231).

BMP-7 se stvara u bubrezima (147) i čini se da njegovo stvaranje opada s godinama. Potom se BMP-7 oslobađa u cirkulaciju gdje vjerojatno djeluje kao sistemski regulator. BMP-7 se najviše stvara u bubrezima tijekom razvoja embrija (74) u kome potiče metanefričnu diferencijaciju bubrega (230). Sistemska primjena BMP-7 u modelu akutnog zatajenja bubrega u štakora, pokazala je očuvanje strukture i funkciju bubrega (229). BMP-7 smanjuje tubularnu

nekrozu i infarkt bubrega, reducira upalu i programiranu smrt stanica (apoptozu) te uspostavlja SMS (od engl. smooth muscle cells) vaskularni fenotip. Osim toga, BMP-7 djeluje citoprotektivno što znači da umanjuje promjene uzrokovane upalnim citokinima (smanjuje stvaranje ICAM.1 molekula, nakupljanje neutrofila te mijeloperoksidaznu aktivnost u štakora). Učinkovitost sistemske primjene BMP-7 također zamijećena kod modela ishemičnog oštećenja srca i mozga u štakora. U ovim modelima protektivno djelovanje BMP-7 se ostvaruje sprječavanjem adhezije neutrofila na endotel krvnih žila (103, 153). Sistemska primjena solubilnog BMP-7 (sOP-1) u rahitičnih životinja dovodi do smanjenja količine osteoida i koštanog volumena, a povećava se vrijednosti serumskog kalcija i površina osteoklasta. Na taj način BMP-7 oponaša djelovanje vitamina D u životinja kojima nedostaju metaboliti vitamina D. Ovi činitelji vjerojatno zajednički reguliraju homeostazu minerala, diferencijaciju stanica i održavanje kosti.

BMP-7 inhibira staničnu proliferaciju i inducira diferencijaciju stanica u stanicama osteosarkoma štakora što dovodi do karakterističnog osteoblastičnog fenotipa *in vitro* (123). BMP-7 sam, ili zajedno sa BMP-2, potiče diferencijaciju stanica, inhibira staničnu proliferaciju i potiče preživljavanje astrocita (38).

## **1.7. Izražaj koštanih morfogenetskih proteina i glasničke RNA za koštane morfogenetske proteine**

### **a) u skeletu**

Poznato je da su BMPs osteoinduktivni signali uključeni u stvaranje skeleta embrija. *In situ* hibridizacijom BMP-2, -4 i -6 su otkriveni u mišjem embriju u područjima u kojima se stvara skelet (114, 116). BMP-6 je prisutan i kasnije, tijekom razvoja skeleta što ukazuje da je ovaj protein važan za krajnja zbivanja u stvaranju kostura. BMP-6 se razlikuje od ostalih članova BMP familije u prisutnosti u hrskavici fetusa. BMP-4 i -6 mRNA su prisutne u tkivnim uzorcima prekartilaginoznog mezenhima, hrskavice i kosti (90, 116, 117). Tijekom razvoja, BMP-6/Vgr-1 mRNA je specifično locirana u stanicama hipertrofične hrskavice ali ne i u perihondriju, periostu ili kosti (114). U ljudi, BMP-7 je lokaliziran u hipertrofičnim



chondrocitima, perihondriju embrija, područjima oko intervertebralnih diskusa, osteoblastima, periostu i centrima osifikacije (231).

## **b) u izvanskeletnim tkivima**

Osim što su prisutni u skeletu, BMPs su otkriveni u različitim epitelnim i mezenhimskim tkivima. Istraživanja su pokazala obilje aktivnosti BMPs u drugim organima/tkivima osim kosti.

Izražaj Vgr-1, koji predstavlja mišji homolog za BMP-6, je zamijećen u ovarijalnim oocitama, smanjuje se u oplodjenom jajašcu, a nestaje u 2-4 staničnom stadiju (114). U srednjem dobu gestacije, BMP-6 je prisutan u koži i središnjem živčanom sustavu i to u rombencefalonu, u krovu i neuropeitelu uz dno ploče (90). Potom su napravljene istraživanja sa poliklonskim antitijelima na proregiju BMP-6/Vgr-1 te je uočena neznatno razlika u izražaju proteina u tkivima. Protein je identificiran u mišjem živčanom sustavu i različitim epitelima, ali ne i u oocitama (236). Osim toga, BMP-2,-4 i -6 se nalaze u ekstremitetu u razvoju, miogenom sloju atrioventrikularnih zalistaka srca, folikulima kose i brade, zubnim pupoljcima, nepcu, u mozgu i kraniofacijalnim strukturama (90, 114, 117), a BMP-3,-4 i -6 u plućima novorođenih štakora (146). hBMP-6 je otkriven u genskim bankama placente i mozga te u drugim cDNA bankama. Schluesener i sur. (194) su izučavali izražaj BMP-6 u normalnim i aterosklerotičnim krvnim žilama mozga te su pokazali prisustvo BMP-6 u stanicama glatke muskulature normalnih krvnih žila kao i u aterosklerotski promijenjenim krvnim žilama i to u stanicama glatke muskulature aterosklerotskih plakova smještenih u intimi.

Helder i sur. (74) su promatrali izražaj BMP-7 u raznim tkivima humanog embrija od 12-14 tjedna. Tijekom embrionalnog razvoja mRNA za BMP-7 se sintetizira u bubrezima i srcu, zatim u mozagu, a nešto manje u plućima. U 6 tjednu gestacije BMP-7 je prisutan u velikoj količini u glomerulima te nešto manje u zavijenim i sabirnim kanalčićima. Od ostalih tkiva humanog i mišjeg embrija, mRNA za BMP-7 se ispoljava u citotrofoblastima humane placente (3-12 tj. gestacije) i gastrointestinalnoj mukozi (između 6-14 tj). U mišjem embriju, BMP-7 je izražen 10.5 dana nakon oplodnje u srcu, području njušnog plaka i grebenu n. ophthalmicus. U starijih embrija (12.5-18.5 dana p.c.) prisutan je u kraniofacijalnim strukturama: koža, folikuli kose, epitel nosne sluznice, zubi, kalvaria, moždane ovojnice, horoidni pleksus i žlijezde slinovnice. Vukičević i sur. (231) su mRNA za BMP-7 otkrili u

nadbubrežnoj žlijezdi, u epitelnim stanicama "provizornog korteksa", koji se tijekom 12 tj. diferencira u epitelijalno-staničnu vrpcu, a u bubregu već od 8-14 tj. gestacije i to u epitelu distalnih i proksimalnih zavijenih kanalića. Ranja istraživanja su pokazala da je mRNA za BMP-7 prisutna u mišjim embrijima već od 13. dana postnatalnog života u bubrezima i nadbubrežnoj žlijezdi, koji služe kao mjesta sistemskog stvaranja tijekom razvoja (147). Osim toga, dokazano je prisustvo BMP-7 u bazalnim membrana izvodnih kanala gušterače, u plućima (epitel bronha i pupoljci bronhalnih ogranaka) i koži (ispod epidermisa). Od ostalih tkiva, BMP-7 je prisutan u glatkoj, srčanoj i skeletnoj muskulaturi, moždanim ovojnica i živčanim stanicama telencefalona. Velike količine mRNA za BMP-7 su otkrivene i u uterusu miševa i štakora (74, 147). Tijekom trudnoće razina mRNA za BMP-7 u uterusu naglo pada i misli se da je posredovana visokim razinama estrogene jer se može zaustaviti davanjem  $17\beta$ -estradiola prije trudnoće.

BMPs djeluju na izražaj drugih činitelja rasta koji potom utječu na djelovanje BMPs na stvaranje kosti. Tako npr. BMP-7 povećava izražaj IGF receptora tip 2 (94), smanjuje izražaj IGFBP-4 (od engl. insulin growth factor binding protein), a povećava izražaj IGFBP-3 i -5 u humanim osteoblastima (108) te na taj način potiče proliferaciju osteoblasta. Pored toga, u kulturi humanih citotrofoblasta BMP-7 smanjuje stvaranje horionskog gonadotropina i progesterona za 60% i 36% (126).

Na stvaranje BMPs djeluju različiti hormoni. Rickard i sur. (171) su pokazali da estrogen potiče stvaranje BMP-6 mRNA, a dodavanje estrogena povećava sekreciju BMP-6 proteina in vitro. U kulturi stanica fetalne kalvarije u štakora, glukokortikoidi selekcijski povećavaju stvaranje BMP-6 (12). Ovaj učinak glukokortikoida u ljudi je zamijećen u primarnoj kulturi humanih stanica strome koštane srži.

## **1.8. Izražaj glasničke RNA za receptore koštanih morfogenetskih proteina**

U odraslih miševa glavna mjesta izraženosti mRNA za ALK-3 (BMP-1A) su srce, mozak, pluća, jetra, skeletni mišići i bubreg. Oskudan izražaj mRNA je zamijećen u slezeni i testisima. mRNA za ALK-6 (BMP-1B) je prisutna samo u mozgu i plućima (42).

Tijekom embrionalnog razvoja miša (6.5 - 15.5 dana p.c.) mRNA za ALK-3 je prisutna gotovo u svim tkivima tijekom razvoja, ali znakovito je odsutna u jetri. Nasuprot tome, izražaj mRNA za ALK-6 je mnogo oskudniji. Glasnička RNA za ALK-6 je odsutna u

ranom postimplantacijskom embriju, a otkrivena je 9.5 dana p.c. i prisutna je do 15.5 dana p.c. U srednjem dobu gestacije, mRNA za ALK-6 se nalazi u mezenhimalnoj hrskavičnoj kondenzaciji, premuskularnim masama, krvnim žilama, središnjem živčanom sustavu, dijelovima oka i uha tijekom razvoja te u epitelu. mRNA za ALK-6 je zamijećena i u crijevima i to samo u epitelu crijeva, a mRNA za ALK-3 u mezenhimu i epitelu crijeva (42).

Glasnička RNA za BMPR-II je otkrivena u mnogim embrionalnim tkivima i u odraslom organizmu. U embriju, mRNA je prisutna u mozgu, bubrezima i plućima, a u odraslih u srcu, mozgu, posteljici, plućima, jetri, skeletnim mišićima, bubregu, gušterači, prostati, testisu, jajniku i tankom crijevu. U slezeni, timusu, debelom crijevu i leukocitima je utvrđena mala količina ili odsustvo mRNA za BMPR-II.

Ekspresija ovih gena u raznim mekim tkivima ukazuje na široku funkciju BMPs u embriogenezi.



**Tablica 2.** Izražaj članova BMP obitelji i njihovih receptora u tkivima sisavaca (42, 173, 176).

<b>BMP/ BMPR</b>	<b>Kostur</b>	<b>Ostala tkiva</b>
<b>BMP-6</b>	hipertrofična hrskavica, perihondrij, periost, koštani matriks	<b>Embrij:</b> oocite, moždane ovojnice, srce, posteljica, neuralna cijev, koža, jednjak. <b>Odrasli:</b> pluća, srce, bubreg, mišići, nadbubrežna žlijezda, grlić maternice, rodnica.
<b>BMP-7</b>	sklerotomi, perihondrij, periost, hipertrofični hondrociti, osteoblasti	<b>Embrij:</b> bubreg, nadbubrežna žlijezda, crijevo, bazalne membrane, moždane ovojnice, horoidni pleksus, folikuli brade. <b>Odrasli:</b> mozak, pluće, bubreg, nadbubrežna žlijezda, mokraćni mjehur, posteljica, maternica.
<b>BMPR-IA (ALK-3)</b>	prekartilaginozni kondenzati, hrskavica, kost	<b>Embrij:</b> u svim tkivima osim jetre; srce, uho, oko, ganglioni, mozak, leđna moždina, njušni mozak, mišići, želudac, gušterača, crijevo, metanefros, mezonefros, spolni organi, pluća, <b>Odrasli:</b> srce, mozak, pluća, jetra, skeletni mišići, bubreg te slezena, testis, folikuli vibrisa, dentin, njuška, dijafragma.
<b>BMPR-IB (ALK-6)</b>	prekartilaginozni kondenzati, hrskavica, kost	<b>Embrij:</b> uho, oko, mozak, leđna moždina, njušni mozak, mišići, želudac, crijeva, metanefros, mezonefros, pluća, folikuli vibrisa, njuška.
<b>BMPR-II</b>		<b>Embrij:</b> mozak, bubreg, pluća. <b>Odrasli:</b> srce, mozak, posteljica, pluća, jetra, skeletni mišići, bubreg, gušterača, prostata, testis, ovarij, tanko crijevo.

## 2. Crohnova bolest

Crohnova bolest i ulcerozni kolitis predstavljaju "upalnu bolest crijeva" ili kako se to najčešće u literaturi označava "Inflammatory bowel disease" (IBD). Uzrok im je nepoznat.

Crohnova bolest je kronična upalna bolest crijeva koja može zahvatiti bilo koji dio alimentarnog kanala od usne šupljine do anusa. Prvi su je opisali Crohn i suradnici (35) i nazvali terminalni ileitis. Kasnije je uočeno da patološki proces može zahvatiti bilo koji segment probavnog sustava (usnu šupljinu, ezofagus, želudac, dudenum, tanko i debelo crijevo, apendiks, područje anusa - perianalne ulceracije, anorektalne fistule i dr.). Terminalni ileum je najčešće zahvaćen patološkim procesom (60 do 80% slučajeva), zatim kolon (25%), a najrjeđe su zahvaćeni usna šupljina i jednjak. Upalom su zahvaćeni svi slojevi crijevne stijenke kao i mezenterij te regionalne limfne čvorove. Bolest po pravilu zahvaća jedan segment probavnog sustava ( zdravi dijelovi crijeva se nalaze između oboljelih) - otuda i naziv regionalni enteritis.

Bitna patološkoanatomska svojstva Crohnove bolesti jesu transmuralna upala, zadebljanje stijenke crijeva, duboke ulceracije koje su najčešće longitudinalne, izdignute natekline upalnog tkiva koje uz fisure daju sluznici "kaldrmast izgled", zatim progresivna fibroza koja dovodi do stenoze, fistule između crijevnih vijuga te između zahvaćenog crijeva i organa u okolici te povećani mezenterijski limfni čvorovi.

Oboljenje nastaje kao posljedica snažne aktivacije nespecifičnog upalnog odgovora crijeva. Genetsku osjetljivost, imunološke osobitosti i patološki nalaz daju karakterističnu sliku bolesti.

### 2.1. Etiologija Crohnove bolesti

Morbus Crohn je bolest nepoznate etiologije. Pretpostavlja se da je bolest posljedica bakterijskog ili sličnog oštećenja crijeva. Na tu primarnu leziju kontinuirano se nastavljaju imunološke reakcije.

*Postojanje infektivnog uzročnika.* Smatra se da bolest predstavlja reakciju na perzistentnu infekciju crijeva. Mnogi mikrobiološki agensi su smatrani uzročnikom bolesti, a potom isključeni. Među njima su *Mycobacterium paratuberculosis*, zatim paramyxovirus i



*Listeria monocytogenes* (109, 188, 235). Premda je infekcija sa *M. paratuberculosis* najčešća u bolesnika sa Crohnovom bolesti (181), vjerojatno je riječ o sekundarnoj infekciji ulkusa crijevne mukoze (187). Podaci da su paramyxovirus (235) i *Listeria* uzročnici ove bolesti također, u potpunosti nisu pouzdane, premda su Wakefield i sur. (235) histološki dokazali da virusna infekcija može uzrokovati kronični granulomatozni vaskulitis, koji potom dovodi do fokalne ishemije.

*Manjkava ili oštećena mukozna "barijera" crijeva.* Oštećena mukoza crijeva dozvoljava nesmetan ulaz mnogih antigena i proinflammatoryh molekula. To su bakterije crijevnog lumena i produkti bakterija kao što su *n*-formil-metionil-leucil-fenilalanin (FMLP), peptidoglikan-polisaharidni polimeri i lipopolisaharid (endotoksin) (109, 181, 187, 188, 235). Pretpostavlja se da je povećana propustljivost mukoze primarni defekt u Crohnovoj bolesti. Povećana permeabilnost mukoze je dokazana u oboljelih rodaka koji su pokazivali snažan odgovor na nesteroidne antiinflatatorne lijekove (131). U kimeričnih miševa za koje je svojstvena promijena tzv. bliskih spojevima između epitelnih stanica (tight junction), što predstavlja narušavanje integriteta mukozne "barijere", eksperimentalno je dokazana pojava upale (78). Osim toga, u miševa kod kojih postoji poremećaj u stvaranju činitelja rasta kao što su trefoil činitelj ili TGF- $\beta$  (99, 127) otkrivena je veća osjetljivost na ozljedu kolona, što ukazuje na važnost stvaranja lokalnih činitelja rasta i njihovog utjecaja na homeostazu i cijeljenje mukoze.

*Abnormalni imuni odgovor domaćina na uobičajene antigene.* Bolest može nastati kao rezultat abnormalne imunološke reakcije domaćina na uobičajene antigene kao što su bakterije lumena crijeva, bakterijski produkti i toksini. Poremećaj regulacije lokalnog (mukoznog) i sistemskog imunog sustava dovodi do aktivacije i pojačavanja upale. Pri tome se aktiviraju pojedini ili svi proinflammatory i antiinflammatory medijatori (tablica 3) (187). Poremećaj ravnoteže ovih medijatora pokreće upalni proces. Eksperimentalno je pokazano da u miševa koji ne stvaraju IL-10 ili TGF- $\beta$ 1 (protuupalni medijatori) nastaje kronična upala crijeva (98, 99), a u miševa čije T-stanice ne posjeduju receptore za ove citokine razvija se spontani kolitis (138). Pretpostavka da je Crohnova bolest autoimuna bolest ima slabu imunološku podlogu (197). Osim toga, teško je razumjeti kako imunološka reakcija na jedan antigen može rezultirati tako snažnim transmuralnim upalnim odgovorom koji je prisutan u Crohnovoj bolesti. Za razvoj upale značajna je imunoregulacijska ravnoteža između medijatora upale, kao što su IL-1 (proinflammatory medijator) i IL-1ra. IL-1ra je anticitokin koji inhibira aktivnost IL-1 na taj način što se selektivno veže na IL-1 receptore

bez agonističkog djelovanja. Casini-Raggi i sur. (22) su pokazali da omjer IL-1ra i IL-1 je znatno smanjen u mukozi dobivenoj biopsijom od bolesnika sa Crohovou bolesti u usporedbi sa kontrolama (zdrave ili upalne). Slično tomu, Schreiber i sur. (196) su pokazali da u bolesnika sa upalnom bolesti crijeva monociti pokazuju izrazito smanjen inhibicijski odgovor na IL-4.

**Tablica 3.** Proinflamatorni i anti-inflamatorni medijatori (190).

Proinflamatorni citokini	Anti-inflamatorni citokini
IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$	IL-1ra, TNF-vezni proteini
IL-8, gro, MCAF	TGF- $\beta$
IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ (T <sub>H1</sub> )	IL-4, IL-10, IL-13 (T <sub>H2</sub> )
TxA <sub>2</sub> , LTB <sub>4</sub>	PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub>
Sub P, TSH	VIP, kortizol

### 2.1.1. Genetski činitelji

Klinička i epidemiološka istraživanja te izučavanje na eksperimentalnim modelima su ukazala na važnost genetskih činitelja u razvoju kronične upale crijeva (47, 191). Pretpostavlja se da geni kodiraju produkte koji reguliraju imuni odgovor mukoze ili doprinose integritetu "mukozne barijere" i na taj način preveniraju prodiranje proinflamatornih medijatora iz crijevnog lumena. U 10-20% bolesnika sa Crohovou bolesti utvrđena je obiteljska sklonost sa najvećim rizikom u bliskih srodnika (177). Osim toga, otkrivena je istovjetnost u mjestu nastanka i kliničkom tipu bolesti među rođacima (6, 32). Preliminarni rezultati genetičkog predviđanja bolesti u potomstva ukazuju na prisustvo genomskih trinukleotidnih regija koje se ponavljaju (157). Definiranje genetskih činitelja u upalnoj bolesti crijeva te njihov utjecaj na imunološku reakciju bila je predmet mnogih istraživanja. Tako je pokazano da su genetski određene neke od komponenti imunog sustava, a koje su povezane sa upalnom bolesti crijeva kao što su HLA antigeni (humani leukocitni antigen) (192, 219) i IL-1ra (124), TNF- $\alpha$  (156), adhezijske molekule (253) te



polimorfizam podjedinica komplementa (46). Hugot i sur. (84) su opisali lokuse na kromosomu 16 koji su povezani sa Crohnovom bolešću.

### **2.1.2. Utjecaj okoliša**

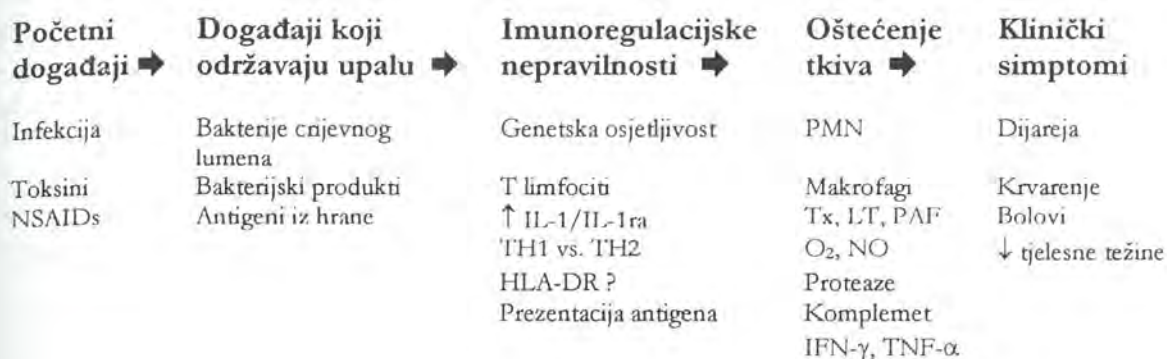
Genetička osjetljivost se može mijenjati pod utjecajem činitelja okoliša. Tako je zamijećeno da je učestalost oboljenja manja nakon preseljenja stanovništva (191), a eksperimentalno je pokazano da se kolitis neće razviti u genetski osjetljivih glodavaca u sterilnim uvjetima (165). Dokazana je povezanost pušenja i Crohnove bolesti, osobe koje puše dva do četiri puta češće oboljevaju. Zadnjih pet decenija kao mogući činitelji okoliša koji su doveli do porasta oboljevanja od Crohnove bolesti u razvijenim zemljama navode se oralni kontraceptivi, rafinirani šećer, nedostatak vlakana u ishrani, perinatalne infekcije, kućna higijena, antibiotici i nesteroidni lijekovi (96).

## **2.2. Patogeneza upalne bolesti crijeva**

Tijek nastanka i razvoja upalnog procesa u upalne bolesti crijeva shematski je prikazan na slici 5. Početna zbivanja su odvojena od trajnih tako da se teoretski može terapijski djelovati zasebno u oba stadija. Pretpostavlja se da abnormalna imunološka reakcija pojačava upalni odgovor tako da jednom pokrenuti upalni proces dovodi do oštećenja tkiva i konačno do simptoma bolesti (187).

### **2.2.1. Početni događaji**

Proces može započeti infektivni i neinfektivni uzročnik. U bolesnika sa IBD teško ustanoviti početni crijevni infekt tako da je vjerojatno da bilo koji infektivni agens ili toksin može oštetiti mukoznu "barijeru" ili potaknuti upalni odgovor i započeti proces u genetski osjetljivih osoba (11, 188).



**Slika 5.** Moguća patogenetska zbivanja tijekom upalne bolesti crijeva predstavljena kao niz zasebnih događaja (187)

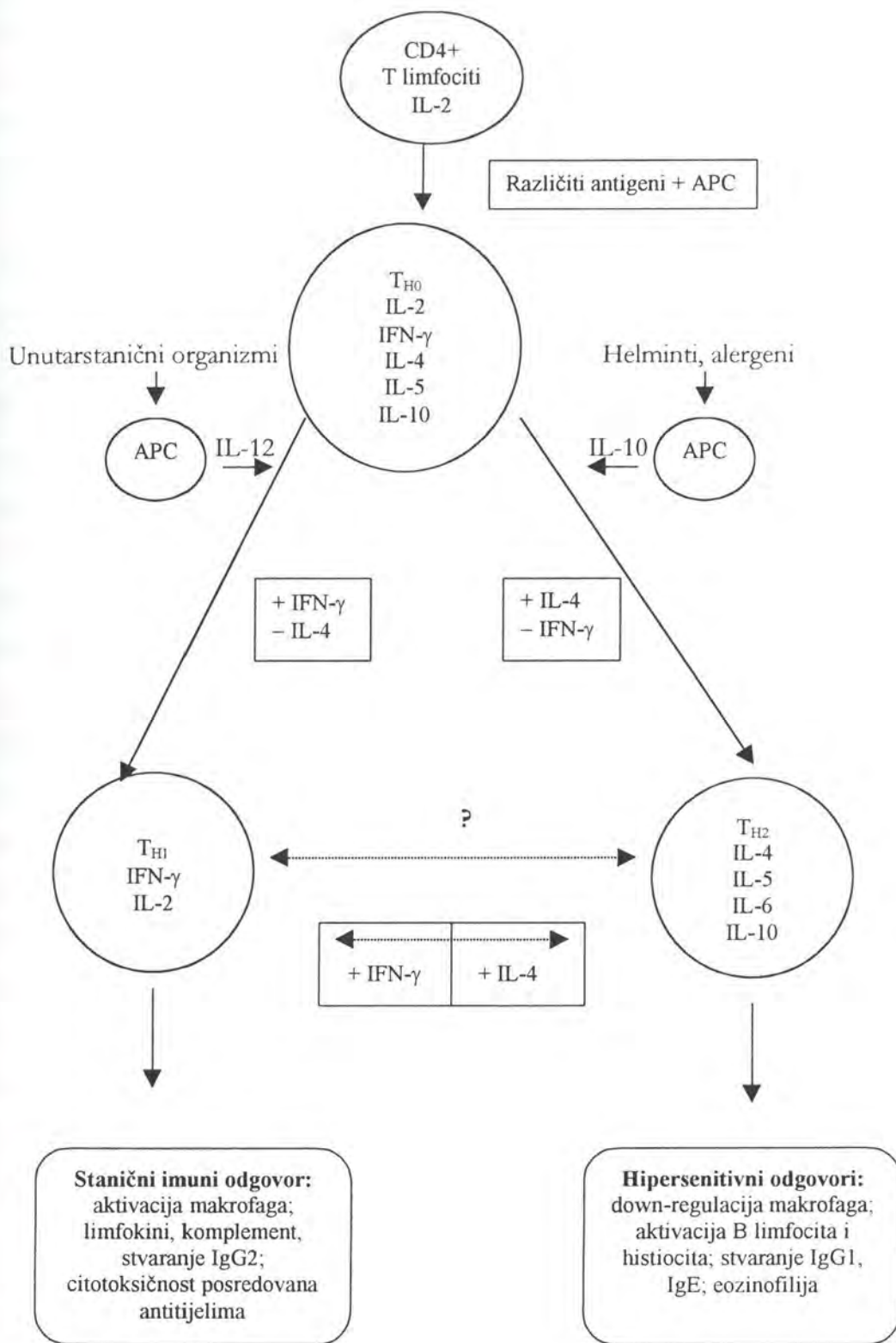
### 2.2.2. Događaji koji održavaju bolest

Jednom započeti upalni proces se može nastaviti na više načina. To se može dogoditi izlaganjem bakterijama koje su naseljene u crijevu, produktima tih bakterija ili antigenima iz hrane koji su prisutni u visokim koncentracijama u distalnom ileumu ili kolonu (196) kao i izlaganjem vlastitim autoantigenima. Mikobakterijski agensi iz lumena ulaze u mukozu tako da slome "mukoznu barijeru" npr. stvaranje ulceracija ili ulaze u sistemsku cirkulaciju i aktiviraju upalne stanice crijeva. Ove stanice potom stvaraju citokine, metabolite arahidonske kiseline, proteaze, dušični oksid i toksične radikale kisika i na taj način trajno održavaju upalu (187). Ulazak bakterijskih produkata i toksina u cirkulaciju uzrokuje izvancrijevne manifestacije Crohnove bolesti kao što su upale jetre, zglobova, kože, očiju i koštane srži (184). U ovoj fazi upalni proces se može zaustaviti reduciranjem bakterija u lumenu crijeva i antigena u hrani primjenom antibiotika, mirovanjem crijeva i lavažom (186). Važnost luminalnih bakterija u poticanju i održavanju crijevne i sistemske upale opisana je u HLA-B27 transgeničnih štakora. Rast ovih životinja u sterilnim uvjetima doveo je do izostanka upale kolona, želuca i zglobova, dok u prisustvu specifične nepatogene bakterije luminalna crijeva, *Bacteroides*, razvijaju se progresivni kolitis, gastritis i artritis (165). Za *Lactobacillus*, koji je također stanovnik lumena crijeva, pokazano je da djeluju zaštitno (120).



### 2.2.3. Imunoregulacijske nepravilnosti

Eksperimentalni kolitis je kao i upalna bolest crijeva karakterizirana prekomjernom, neobuzdanom aktivacijom imunološkog odgovora mukoze (89, 197). Istraživanja su pokazala da u kroničnoj upali crijeva dolazi do poremećaja ravnoteže pro- i anti-inflamatornih regulacijskih citokina i T pomoćničkih limfocita ( $T_H$ ). Ključni agresivni regulacijski citokini su IL-1,  $TNF\alpha$ , IL-12 i  $IFN-\gamma$ , dok su najvažnije imunosupresijske regulacijske molekule IL-4, IL-10 i  $TGF-\beta$  (89, 158, 185, 187, 189). IL-1 i  $TNF-\alpha$  stvaraju aktivirani makrofagi, a potiču stvaranje mnogih medijatora upalnog procesa kao što su citokini, metabolita arahidonske kiseline i proteaze. IL-1, ali ne i  $TNF-\alpha$  aktivira T limfocite na kojima potiče izražaj IL-2 receptora i stvaranje IL-2. Osim toga, već je spomenuto da nesrazmjer IL-1 i IL-1ra je povezan sa pojavom IBD (22, 86). Promjene stvaranja IL-1ra je genetski određena (155), a otkrivena je u bolesnika sa neaktivnom i aktivnom Crohnovom bolesti (22, 86). Delecija gena za imunosupresijske citokine, IL-10 ili  $TGF-\beta$  uzrokuje razvoj spontanog kolitisa u knockout miševa (98, 99). Sljedeća abnormalnost imunog odgovora zamijećena u humanoj IBD i kroničnom eksperimentalnom kolitisu je poremećena aktivnost subpopulacija  $T_H$  limfocita,  $T_{H1}$  i  $T_{H2}$  (slika 6) (89, 158, 185, 189).  $T_{H1}$  stanice (stvaraju IL-2 i  $IFN\gamma$ ) su odgovorne za imuni odgovor posredovan stanicama, dok  $T_{H2}$  stanice (stvaraju IL-4, IL-5, IL-10) potiču humoralni imuni odgovor potičući reakciju preosjetljivosti. Reakcije su posredovane protutijelima tako da je povećana sinteza imunoglobulina (IgG1, IgA, IgE) i aktivacija eozinofila.  $IFN-\gamma$  koji stvaraju aktivirani  $T_{H0}$  i  $T_{H1}$  limfociti snažno djeluje na crijevo u eksperimentalnom kolitisu (158, 189). Osim toga, tijekom kronične faze eksperimentalnog kolitisa, u izoliranim mononuklearnim stanicama laminae propriae kolona povećana je spontana i stimulirana sekrecija  $IFN-\gamma$ . Blokiranjem  $IFN-\gamma$  može se prevenirati oboljenje.  $IFN-\gamma$  povećava izražaj antigena MHC skupine II na makrofagima, B limfocitima kao i dendritičkih, endotelnih, mezenhimskih i epitelnih stanica te na taj način utiče na djelovanje ovih stanica kao antigen-prezentirajućih stanica. Ovi nalazi ukazuju na važnu ulogu T limfocita u kroničnom kolitisu (158, 189). Pregledom mukoze crijeva pokazano je da bolesnici sa Crohnovom bolesti imaju selektivno aktivirane  $T_{H1}$  limfocite, koji stvaraju proinflamatorne medijatore IL-2 i  $IFN-\gamma$  (17, 142). Zanimljiv, ali još uvijek nije u potpunosti dokazan podatak o postojanju različitog limfocitnog profila  $T_{H1}$  i  $T_{H2}$  limfocita kod pojedinih oblika Crohnove bolesti (agresivni fistulizirajući i stenotični



Slika 6.  $T_{H1}$  i  $T_{H2}$  CD4+ T limfociti. Ravnoteža proinflamatornih i anti-inflamatornih medijatora možda je poremećena sa IBD (190).

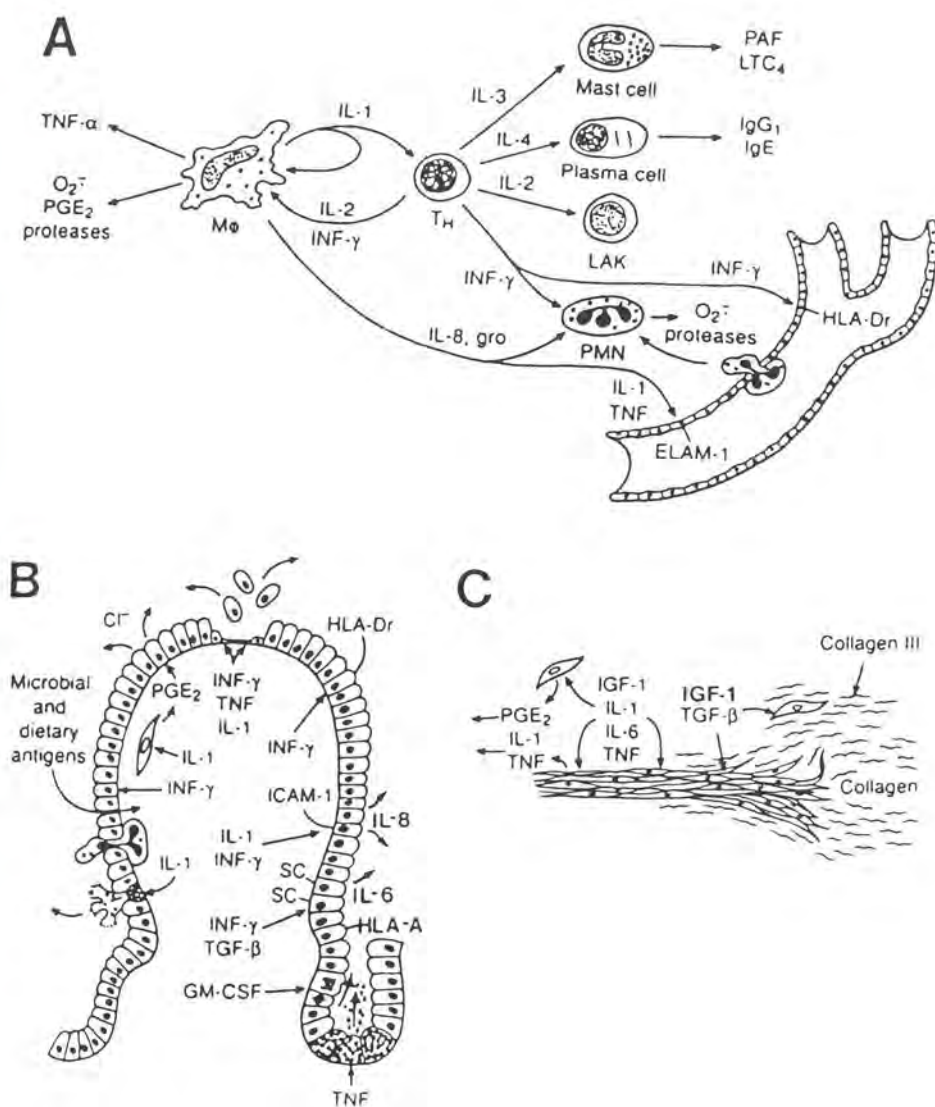


oblik). Bolesnici sa upalnom bolesti crijeva pokazuju nepravilnosti u prezentaciji antigena u epitelu (132). IBD je povezana sa prisustvom izvjesnih HLA haplotipova klase II (192, 219) što bi se moglo odnositi na nepravilnosti u aktivaciji T limfocita zamijećenoj u Crohnovoj bolesti.

#### 2.2.4. Oštećenje tkiva

Aktivacija makrofaga i T limfocita dovodi do oslobađanja citokina (IL-1, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ ) koji potom novače druge upalne stanice (neutrofil, monociti, limfociti), usmjeravaju ih ka mjestu upale i pojačavaju upalni odgovor (slika 7A) (89, 189, 225). Djelovanjem ovih citokina povećava se izražaj adhezijskih molekula i njihovih liganada na endotelnim i imunim stanicama što omogućava adheziju neutrofila, monocita i limfocita na krvne žile koji potom ulaze u cirkulaciju i intersticijski matriks (187). Migracija upalnih stanica ka mjestu upale je potaknuta kemotaktičkim molekulama koje pod utjecajem IL-1 i TNF- $\alpha$  stvaraju imune stanice lamine propriae i mezenhimske stanice. Kemotaktičke molekule su: obitelj kemokina (IL-8, gr, monocitni kemotaktički i aktivirajući činitelj i dr.), TGF- $\beta$ , leukotrien B<sub>4</sub>, činitelj aktivacije trombocita (PAF- od engl. platelet-activating factor) i aktivirani fragment komplementa i FLMP koji stvaraju bakterije lumena crijeva (187, 188). Upalni odgovor je pojačan i povećanjem broja potaknutih efektorskih stanica, epitelijalnih i mezenhimskih stanica. Tako, aktivirani makrofagi stvaraju IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  koji potom aktiviraju niz stanica imunog sustava (185, 225). IL-1 aktivira T-staničnu kaskadu koja vodi do sekrecije IL-3, IL-4, IL-2 i IFN- $\gamma$ ; ovi citokini aktiviraju histiocite, plazma stanice, killer-stanice aktivirane limfokinima, polimorfonuklearne leukocite koji potom stvaraju inflamatorne agense i novače nove efektorne stanice (89, 185). Ovi citokini pored toga što pojačavaju upalu, djeluju i imunosupresijski i na taj način mijenjaju upalni odgovor. IL-1 i TNF- $\alpha$  potiču stvaranje zaštitinih prostaglandina i kortizola. TGF- $\beta$  suprimira proliferaciju limfocita, IL-4 smanjuje djelovanje makrofaga, a IL-4 i IL-10 inhibiraju proliferaciju TH<sub>1</sub> limfocita i stvaranje citokina. Osim toga, IL-1, TGF- $\beta$  i IL-4 potiču stvaranje agonista IL-1 receptora koji potom inhibira djelovanje IL-1.

Citokini su posrednici u održavanju ravnoteže epitelnih stanica crijeva i susjednih imunih i mezenhimskih stanica (slika 7B). Kada su stanice aktivirane, stvaraju topive produkte koji potom potiču oštećenje tkiva. Tako, IFN- $\gamma$  povećava propustljivost mukoze



**Slika 7.** Učinak citokina koje stvaraju aktivirane imune stanice tijekom upale crijeva. **A.** Imune stanice se aktiviraju i diferenciraju te odlaze i djeluju na mjestu upale. **B.** Citokini koje oslobađaju susjedne upalne i mezenhimske stanice oštećuju epitelne stanice i potiču izražaj citokina, adhezijskih molekula i glavnih antigena tkivne podudarnosti klase I i II. **C.** Fibroza. Citokini i činitelji rasta potiču aktivaciju i proliferaciju mezenhimskih stanica i sintezu kolagena (185). ELAM-1, endotelne leukocitne adhezijske molekule; GM-CSF, granulocitni/monocitni činitelj koji stimulira kolonije; ICAM-1, intercelulama adhezijska molekula; LTC<sub>4</sub>, leukotrien C<sub>4</sub>; Mφ, makrofag; PAF, činitelj koji aktivira trombocite; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>; PMN, polimorfonuklearni leukocit; SC, sekretorna komponenta.



jer narušava bliske spojeve među stanicama tzv. tight-junction (119) i potiče intracelularne adhezijske molekule te na taj način povećava transport neutrofila kroz epitelni sloj stanica (31). Pokazalo se da IFN- $\gamma$  umanjuje sekreciju klorida u epitelu i važan je medijator atrofija vila i hiperplazije kripti (118). IL-1 potiče djelovanje i sintezu prostaglandina (ciklooksigenaza) u subepitelnim mezenhimskim stanicama te na taj način neizravno potiče sekreciju aniona u epitelnim stanicama. Osim toga, IL-1 povećava sekreciju klorida u epitelu koja je potaknuta vodikovim peroksidom, bradikininom i histaminom. Pretpostavlja se da je IL-1 citokin koji potiče dijareju, jedan od glavnih simptoma upale crijeva. Citokini potiču izražaj mnogih proteina kao što su IL-6, IL-8, kemokini, TGF- $\beta$ , glavne antigene tkivne podudarnosti klase I i II, manganaza-ovisnu superoksid dizmutazu, sekretorne komponente te reaktante akutne faze upale (70). TGF- $\beta$  djeluje na staničnu diferencijaciju tako što inhibira proliferaciju epitelnih stanica, potiče aktivnost sukroze te migraciju epitelnih stanica iz kripti prema vrhu resice. Uz svoju fiziološku ulogu, čini se da je TGF- $\beta$  ključni medijator u oporavku epitelnih stanica nakon in vitro ozljede. Stoga, smatra se da citokini koje stvaraju makrofagi laminae propriae, limfociti i mezenhimske stanice mogu temeljito utjecati na fenotip i funkciju epitelnih stanica crijeva. Kao odgovor na bakterijske produkte (FLMP, lipopolisaharidi, peptidoglikan-polisaharidi) aktivirani neutrofil i makrofagi stvaraju reaktivne metabolite kisika a to su: 1) esencijalni oksidaza sulfidri, 2) degradirani proteini, ugljikohidrati, hijaluronska kiselina i mucin, 3) neaktivni NADPH i NADH, 4) peroksidazni membranski lipidi i 5) pospješuju cijepanje DNA (34). Oštećenja krvnih žila može biti uzrokovano izravnim toksičnim djelovanjem metabolita kisika na krvne žile, vazokonstriksijskim djelovanjem tromboksana A<sub>2</sub> i odlaganjem fibrina zbog aktivacije procesa zgrušavanja (187).

Fibroza je česta komplikacija Crohnove bolesti koja dovodi suženja crijevnog lumena i obstrukcije (187). Pretpostavlja se da citokini i činitelji rasta koje stvaraju imune stanice crijeva uzrokuju aktivaciju mezenhimskih stanica te pojačavaju upalu i dovode do fibroze (slika 7C). IL-1 (208), TNF- $\alpha$  (208) i IGF-1 (od engl. insulin growth factor) (259) potiču proliferaciju glatkih mišićnih stanica crijeva i fibroblasta kao i sintezu IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  i prostaglandina E<sub>2</sub> u ovim stanicama. IGF-1 i TGF- $\beta$  potiču proliferaciju fibroblasta i sintezu kolagena u fibroblastima i glatkim mišićnim stanicama (205). Značajno je istaknuti da pod utjecajem TGF- $\beta$  fibroblasti suženih segmenata crijeva

u bolesnika sa Crohnovom bolesti stvaraju više kolagena tipa III nego fibroblasti nestimuliranih ili normalnih segmenata crijeva (205).

### **2.2.5. Klinički simptomi**

Kliničke manifestacije IBD (dijareja, krvarenje, bol i gubitak tjelesne težine) su rezultat patogeničnih procesa uzrokovanih solubilnim, upalnim medijatorima koje stvaraju aktivirane imune i mezenhimske stanice. Osim toga, ovi medijatori uzrokuju povećanje sekrecije klorida u epitelijalnim stanicama i promjenom kontrakcije glatkih mišića crijeva (187).

## 2.2.6. Terapija Crohnove bolesti

Kako je etiologija IBD nepoznata, nije iznenađujuće da postoje poteškoće u odabiru uspješne terapije. Osim toga, razumijevanje patogeneze IBD je važna u odabiru terapije kao i razvoju novih terapijskih pristupa. Saznanja o događajima tijekom upalnog procesa u IBD omogućava ciljanu terapiju na neka od neželjenih djelovanja sadašnjih nespecifičnih agensa, osobito u početku bolesti. Jedan od ciljeva terapije je i blokiranje proinflammatoryh medijatora kao što su IL1, IL12, TNF- $\alpha$  ili IFN- $\gamma$  te konzerviranje ili čak povećanje zaštitnih citokina uključujući IL-4, IL-10, IL-13 i IL-1ra. Vjerojatno je da su kod liječenja Crohnove bolesti potrebni različiti terapijski pristupi za različite tipove Crohnove bolesti, a koji će se utvrditi genetskom analizom i/ili pomoću seroloških markera (156).

Procjena uspješnosti terapije IBD praćena je zaprekama kao što su nesuglasice u definiranju aktivnosti bolesti i objektivnog mjerenja uspjeha terapije. Poteškoće postoje i u postavljanju točne dijagnoze bolesti sa točnom lokalizacijom. U uobičajenu terapiju Crohnove bolesti uključeni su kortikosteroidi, aminosalicilati, imunomodulacijski agensi (azatioprin, 6-merkaptopurin 6-MP, metotreksat, ciklosporin i dr.), antibiotici i novi agensi. Iako su kortikosteroidi i aminosalicilati te nedavno pridruženi azatioprin, 6-MP i metotreksat provjereni lijekovi sa pozitivnim učinkom na bolest, niti jedan tretman nije idealan i ne daje podjednake rezultate. Zbog toga je potrebno provesti što više istraživanja da bi se što detaljnije upozнала uloga novih agensa u liječenju IBD.

U istraživanjima, jedan od izazova će biti utvrđivanje relativnih prioriteta usmjerenih na različite nove agense kao moguću terapiju IBD. Cilj bi po tome bili mnogi citokini, neuropeptidi, adhezijske molekule, reaktivni metaboliti kisika, lipoksigenaza i drugi antagonisti arahidonske kiseline. Ovakva istraživanja osiguravaju potpuni novi uvid u liječenju IBD u usporedbi sa mogućnostima koje su postojale prije nekoliko godina kada su istraživanja novih terapijskih agensa bila ograničeni samo na promjenu nekih nespecifičnih antiinflamacijskih agensa.

U prilogu 1 i 2 su navedeni lijekovi i terapijski agensi koji se proteklih godina rabili u istraživanjima liječenja Crohnove bolesti u ljudi i životinja.



### 3. Eksperimentalni modeli kolitisa

Unatoč opsežnim istraživanjima imunoloških, biokemijskih, mikrobioloških i epidemioloških aspekata "upalne bolesti crijeva", odnosno Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa, etiologija i patogeneza ovih oboljenja nije u potpunosti poznata. Pretpostavlja se da pojava ove bolesti je posljedica međudjelovanja imunog sustava, genetske osjetljivosti te utjecaja okoliša, osobito bakterijske flore crijevnog lumena. Mnogostruki čimbenici koji doprinose pojavi bolesti su umjetno podijeljeni u šest skupina i označeni kao: genetska osjetljivost, činitelji okoliša, stečena imunost, urođena imunost, nespecifična imunost i cijeljenje ozljede (tablica 4). Genetska osjetljivost, činitelji okoliša i stečena imunost predstavljaju rana zbivanja tijekom ove bolesti a urođena imunost, nespecifična upala i cijeljenje ozljede predstavljaju završne događaje, odnosno razvitak upale i pojava oporavka.

Pokusni modeli kolitisa omogućavaju izučavanje ranih događaja IBD, analizu međudjelovanja različitih komponenti te utvrđivanje imunoloških procesa i gena koji određuju prijemčljivost. Pretpostavka je da nema dobrog ili lošeg modela IBD ali različiti modeli izučavaju određeni događaj tijekom IBD. Cilj istraživanja IBD je prikladan odabir eksperimentalnog modela na osnovi segmenta bolesti koji želimo istražiti (tablica 5).

Što bi bio idealan pokusni model kolitisa? To bi bio životinjski model u kojem se bolest spontano događa ili potaknuta bolest koja je identična sa humanim modelom. Osim toga, idealan model trebao bi biti praktičan za izvođenje što podrazumijeva laku eksperimentalnu manipulaciju i relativno jeftin model.

Postojanje različitih novih model utječe na istraživanje IBD, direktno ili indirektno, te je napravljen značajan napredak u pristupu u kliničkim istraživanjima kod bolesnika sa IBD i razvoju novih terapijskih pristupa. Upoznavanje animalnih modela i kompleksa upalnih medijatora služi kao putokaz za razvoj novih fundamentalnih terapijskih strategija (206).


**Tablica 4.** Čimbenici koji doprinose pojavi IBD (47).

Geni	Okoliš	Specifična imunost	Urođena imunost	Nespecifična imunost	Cijeljenje ozljede
MHC	Bakterijska flora	Efektorske T stanice	Makrofagi	Citokini	Citokini
Geni povezani sa imunošću Epitelijalni geni	Infekcija Stres Toksini/lijekovi	Regulacijske T stanice T-stanični citokini B stanice	Neutrofili NK stanice Histiociti	Eikosanoidi Fagociti Mezenhimske stanice	Oporavak matriksa Fibroza Cijeljenje i oporavak epitela
"Prijemčljivost"	Pušenje	Imunoglobulini	Komplement		



**Tablica 5.** Poznati modeli kolitisa koji se rabe u izučavanju činitelja koji doprinose pojavi IBD (47).

Modeli kolitisa	Geni	Činitelji okoliša	Specifična imunost	Urođena imunost	Nespecifična imunost	Cijeljenje ozljede
Octena kiselina				██████████	██████████	██████████
Imuni kompleks/formalin				██████████	██████████	██████████
TNBS/etanol klizma	██████████		██████████	██████████	██████████	██████████
Indometacin	██████████	██████████		██████████	██████████	██████████
Poligeenan (Carageenan)		██████████		██████████	██████████	██████████
DSS		██████████		██████████	██████████	██████████
PG-PS	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
Limfogranuloma venerum		██████████	██████████	██████████	██████████	
Ciklosporin A kolitis			██████████	██████████	██████████	██████████
HLA-B27/β2m transgenični štakori	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
"Cotton-top tamarin"	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████	
C3H/HeJBir miševi	██████████	██████████	██████████	██████████		
Interleukin 2 knockout miševi	██████████	██████████	██████████	██████████		
Interleukin 10 knockout miševi	██████████	██████████	██████████	██████████		
T-stanični receptor knockout miševi	██████████	██████████	██████████	██████████		
Gai2 knockout	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████	
CD45RB→SCID transfer	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████	


 idealan model  
 može se primijeniti

## II CILJ RADA

Poznato je da su članovi BMP obitelji prisutni na mjestima mezenhimsko-epitelijalnog međudjelovanja tijekom razvoja i da potiču migraciju, rast i diferencijaciju stanica. Nalaz izraženosti mRNA za BMP-7 u gastrointestinalnoj mukozi humanog (6 i 14 tjedan) i mišjeg embrija te receptora za BMP-7 ukazuje na moguću ulogu BMP obitelji u regulaciji morfogeneze i/ili funkcije tankog crijeva tijekom razvoja. Osim toga, glavno mjesto sinteze BMP-7 je u bubregu, odkud se BMP-7 oslobađa u cirkulaciju te djeluje kao sistemski regulator. In vitro studije su pokazale da BMP-7 potiče sintezu izvanstaničnog matriksa koji ne sadrži kolagen tipa I što bi moglo imati značaj u neožiljkastom cijeljenju mukoze.

Stoga, ciljevi našeg istraživanja su sljedeći:

- 1) Utvrđivanje pokusnog modela kolitisa uzrokovanog TNBS/etanolom. Opis makroskopskih i mikroskopskih promjena 2, 5, 10, 14 i 30-tog dana nakon izazivanja kolitisa te utvrđivanje istovremenog prisustva akutnih i kroničnih promjena tijekom upale crijeva.
- 2) Učiniti pilot pokus profilaktičke i terapijske primjene BMP-7. Na osnovi makroskopskog pregleda crijeva i makroskopskog indexa oštećenja procijeniti uspješnost sistemske primjene BMP-7.
- 3) Ispitati profilaktičko djelovanje BMP-7 u pokusnom modelu TNBS/etanol kolitisa.
- 4) Ispitati terapijsko djelovanje BMP-7 i definirati najučinkovitiju dozu.
- 5) Ispitati profilaktičko i terapijsko djelovanje proteina BMP-6, koji pripada istoj skupini morfogenih proteina, te usporediti njegovo djelovanje sa BMP-7.

Djelovanje BMP-6 i -7 smo procijenili na osnovi veličine makroskopskog i mikroskopskog oštećenja tkiva, morfometrijskom i imunohistokemijskom analizom. Na taj način željeli smo definirati profilaktički i terapijski učinak morfogenih proteina u zaštiti i regeneraciji crijeva te specifičnosti mehanizama njihovog djelovanja u navedenim procesima. Rezulati ovog istraživanja pridonijeti će otkrivanju složenih mehanizama zaštite i regeneracije crijeva tijekom upalne bolesti crijeva.



# III MATERIJAL I METODE RADA

## 1. Materijal

### 1.1. Životinje

U istraživanju su korišteni štakori Wistar soja muškog spola tjelesne težine 220-300 grama. Životinje su hranjene standardnom laboratorijskom hranom i vodom ad libidum, osim 24h prije izazivanja kolitisa i žrtvovanja, kada je hrana bila uskraćena.

### 1.2. Proteinski preparati

Proteinski preparati, BMP-6 i BMP-7 su dobiveni ljubaznošću Creative BioMolecules, Hopkinton, USA. BMP-6 je dobiven u liofiliziranom obliku (1 mg), a BMP-7 kao otopina u 20 mM acetatnom puferu, pH 4,5 u koncentraciji od 0,5 mg/ml. Preparati su čuvani na temperaturi od -70°C. Neposredno prije primjene, početne otopine su razrijeđene sa acetatnim puferom da bi se postigla koncentracija od 30 µg/kg, 100 µg/kg, 250 µg/kg i 300 µg/kg. Preparati su primijenjeni sistemski, kao i.v. injekcija u repnu venu životinje.

## 2. Metode rada

### 2.1. Pokusni model izazivanja Crohnove bolesti

Ulogu BMP-6 i -7 u postnatalnoj funkciji crijeva izučavali smo primjenom utemeljenog životinjskog modela upalne bolesti crijeva u štakora (138). Ovaj model se ubraja u skupinu T-staničnih modela gdje se senzibilizacijom pomoću haptena djeluje na imuni sustav životinje, odnosno potiče se imuni odgovor posredovan stanicama. Glavna svojstva ovog modela su prikazana u tablici 6.

Eksperimentalni kolitis je potaknut, pod eterskom anestezijom, primjenom klizme koja sadrži etanol (uzrokuje akutno oštećenje mukoze kolona - "barrier breaker") i kontaktni, senzibilizirajući alergen - trinitrobenzensulfoničnu kiselinu (TNBS). Klizma sadržava 30 mg 2,4,6-trinitrobenzensulfonične kiseline (Sigma) i 0,25 ml 30% etanola. TNBS je hapten koji se veže za tvari velike molekulske težine (npr. tkivni proteini) i izaziva imunološki odgovor. On se kovalentno veže na E-amino grupu lizina i na taj način mijenja proteine na površini stanica.



**Tablica 6.** Osobitosti TNBS/etanol kolitisa (47).

<b>SVOJSTVA</b>	
<u>Životinje</u>	Štakori, miševi, kunići
<u>Mjesto bolesti</u>	Distalni kolon (klizma) Ileum (laparotomija)
<u>Vremeski tijek bolesti</u>	
Vrhunac pojave bolesti	2-3 dana (štakori)    2-3 tjedna (miševi)
Trajanje	8 tjedana            nepoznato
<u>Spontani relaps</u>	Nije poznat
<u>Patološke promjene</u>	
Akute/kronične	Prisutna je akutna i kronična faza
Granulomi	Povremeno prisutni
Distribucija	Kontinuirane, fokalne ulceracije
Dubina upale	Transmuralna
<u>Patogeni mehanizmi</u>	? Reakcija hipersenzibilnosti odgođenog tipa na haptent-promijenjeno tkivo ili izravno, toksično oštećenje
<u>Utjecaj bakterija ili njihovih produkata</u>	Nije potrebno za indukciju kolitisa
<u>Imunološke nepravilnosti</u>	Štakori: nisu opisane Miševi: povećanje IgA i IgG, plazma stanica i CD4+ limfocita u lamini propiriji i kaudalnim limfnim čvorovima
<u>Nepravilnosti citokina/upalnih medijatora</u>	Povećanje PGE2, LTB4, IL-1, IL-6, IL-3/GM-CSF
<u>Reproducibilnost modela (%)</u>	Štakori: 90-100 C3H/HeJ miševi > 80 Balb/c miševi 60-65

Osim toga, TNBS se može metabolizirati (enzimatski ili neenzimatski) te nastaju  $O_2$  i  $H_2O_2$  kao posljedica međudjelovanja askorbata i TNBS (65), što ukazuje da kolitis potaknut TNBS je djelomično posredovan citotoksičnim, reaktivnim metabolitima kisika koji se stvaraju oksidativnim metabolizmom TNBS. Primjena TNBS/etanola rezultira razvojem teške, transmuralne, granulomatozne upale distalnog kolona. Histopatološki se uočavaju odijeljena

žarišta akutne nekroze i upale (tvz. lezija koja "preskakuje"), nakon koje slijedi kronična upala sa mononuklearnim infiltratom. Ulceracije perzistiraju najmanje 8 tjedana.

Početni događaj je transmuralna nekroza, akutni upalni odgovor i površne erozije. 1. dan po izazivanju kolitisa uočava se opsežno oštećenje mukoze sa pojavom edema, hemoragije, eksfolijacijom epitela i infiltracije polimorfonuklearnim leukocitima. Tijekom 1. i 2. tjedna upala zahvaća mukozu i submukozu, a često je uključena i tunica muscularis externa. Prisutna je opsežna infiltracija polimorfonuklearnim leukocitima, makrofagima, eozinofilima, fibroblastima, histiocitima vezivnog tkiva i limfocitima. Žlijezde u mukози uz ulkus pokazuju poremećaj građe kripta. Granulomi, koji se obično nalaze u submukози i serozi, se najčešće javljaju od 1. do 3. tjedna nakon izazivanja kolitisa. Gigantske stanice tipa stranog tijela su obično prisutne na površini mase upalnih stanica i to na luminalnoj površini. 3. tjedna nakon TNBS/etanol kolitisa histologija kolona pokazuje povlačenje akutnog upalnog odgovora i nazočnost nešto kroničnog upalnog infiltrata u mukози i submukози. Kronična upala se karakterizira transmuralnom infiltracijom sa fokalnom nekrozom, infiltracija neutrofilima, opsežnom fibrozom i zadebljanjem stijenke. 3. do 5. tjedna dolazi do progresivnog povećanja upalne aktivnosti u tunici muscularis, a zahvaćena je i seroza. U pojedinim područjima tunica muskularis je obliterirana sa masom upalnih stanica. 3 tjedna nakon TNBS/etanol kolitisa polimorfonuklearni leukociti su primarno smješteni u površnim regijama ulkusa. Histiociti vezivnog tkiva prevladavaju tijekom 3. i 4. tjedna (kronična faza upale) i smješteni su u serozi i submukози okruženi masom upalnih stanica. Histiociti vezivnog tkiva i makrofagi koji sadrže hematin su često smješteni na periferiji granuloma. Lezije su fokalnog karaktera i sadrže nekrotična područja sa velikom količinom granulocita. U kroničnom upalnom infiltratu se nalaze limfocite, plazma stanice, eozinofile, pjenušave makrofage oko apscesa i u nekim slučajevima male granulomi u serozi. Kronični upalni odgovor je obilježen sa vaskularnom proliferacijom i tkivnom disorganizacijom u području muskularis mukoze. 3. tjedna nakon primjena TNBS/etanol glavne patološke promjene su pojava naizmjeničnih segmenata dilatiranog i suženog kolona sa zadebljanjem lamine muskularis mukoze. U ovim segmentima kolona nalazimo područja kronične upale, a sužena područja pokazuju hipertrofiju glatkih mišića u lamine muskularis mukose. Bojanje laminae muskularis mukose na kolagen je pokazalo osustvo kolagena pa se pretpostavlja da je hipertrofija posljedica hiperplazija glatkih mišićnih stanica (1).

Upala tijekom TNBS/etanol kolitisa se odlikuje visokom aktivnosti mijeloperoksidaze i smanjenjem razine glutaciona (138, 151). Smatra se da različiti upalni medijatori kao što su



PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, prostaciklin, LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, PAF i IL su uključeni u nastanak i razvoj TNBS kolitisa, kao i u humanoj IBD (197). Od metabolita arahidonske kiseline prevladaju LTB<sub>4</sub> i monohidroksilne masne kiseline 5-HETE, 12-HETE i 15-HETE. LTB<sub>4</sub> vjerojatno stvaraju neutrofili (237, 239). Prema Wallacu i suradnicima (237) sinteza LTB<sub>4</sub> je povećana već unutar 4 sata nakon primjene TNBS i dostiže vrhunac 24-72 sata. Ovo povećanje je u skladu sa aktivnosti mijeloperoksidaze. In vivo određivanje oslobađanja eikosanoida u lumen pokazalo je povećanje PGE<sub>2</sub>, 6-ketoPGF<sub>1</sub>-alfa, TXB<sub>2</sub> i LTB<sub>4</sub> 3. dana poslije intrakolične primjene TNBS (228). Potrebno je istaknuti da se oslobađanje TXB<sub>2</sub> povećava tijekom kronične faze upale (do 21. dana) dok razine drugih eikosanoida se smanjuju. Ovi nalazi ukazuju da eikosanoidi (prostaglandini, leukotrieni, tromboksan) imaju važnu ulogu u patogenezi TNBS kolitisa. PAF od engl. platelet-activating factor također ima važnu ulogu tijekom kolitisa. Wallace i sur. (243) su otkrili da stvaranje PAF-acetera u kolonu povećava 16 puta u odnosu na kontrolnu. Ovakvo povećano stvaranje PAF-acetera nije viđeno tijekom maksimalne infiltracije neutrofila (1-4 dan nakon TNBS), ali je uočeno nakon 1-3 tjedna. PAF-aceter, najvjerojatnije, ima važnu ulogu u akutnom upalnom odgovoru ali isto tako je odgovoran za održavanje upale. Osim toga, tretman sa specifičnim PAF-aceter agonistom 4-7 dana nakon primjene TNBS dovodi do ubrzanog cijeljenja. Među različitim upalnim medijatorima u TNBS- kolitisu smatra se da je IL-1 možda najznačajniji pokazatelj upale mukoze jer nivo ovog citokina je u skladu sa mijeloperoksidaznom aktivnosti (161). Tijekom kronične faze TNBS kolitisa razina mukoznog histamina se povećava u skladu sa povećanjem makroskopskog indexa oštećenja (4).

Model TNBS/etanol kolitisa ima nekoliko prednosti:

- 1) Upala je potaknuta jednokratnom intraluminalnom promjenom TNBS, a oštećenja se može reproducirati.
- 2) Eksperimentalne životinje su štakori koji su relativno jeftini.
- 3) Upala se odlikuje zadebljanjem stijenke crijeva koja je povezana sa staničnom infiltracijom i ulkusima koji perzistiraju najmanje 8 tjedana. Ovakvo dugo trajanje upale omogućava kvalitetniju procjenu uspješnosti pojedinih lijekova i agensa.
- 4) Ovaj model je histološki relevantan i pokazuje neka svostva humane IBD, osobito Crohnove bolesti. To su transmuralna upala sa granulomima i gigantskim stanicama Langhansovog tipa, upala i ulkusi koji preskakuju i pojava "kaldrmi" sličnih promjena na mukozi. Morfologija ulkusa, infiltracija histiocitima i limfocitima te iskrivljenost kripte su osobitosti Crohnove bolesti koje su zamijećene u ovom modelu.



Sličnost TNBS/etanol modela sa Crohnovom bolesti u ljudi (histopatološka, klinička, način ekspresije citokina i upalnih medijatora) omogućava izučavanje etiopatogeneze kronične upale crijeva kao i evaluaciju potencijalnih terapijskih agensa.

## 2.2. Plan rada

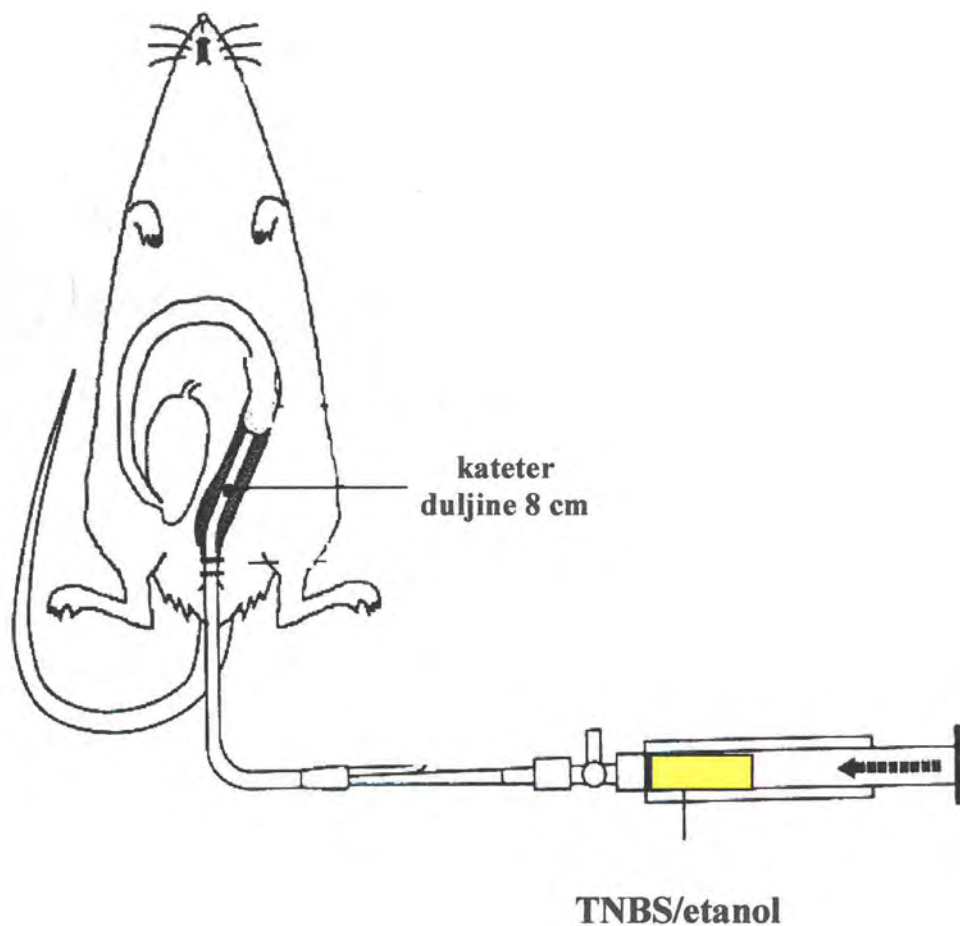
Istraživanje smo podijelili u četiri skupine pokusa kojima smo željeli odrediti učinak BMP-7 i -6 na eksperimentalni kolitis.

*Indukcija TNBS/etanol kolitisa.* Kolitis je izazvan u životinja primjenom 30 mg trinitrobenzensulfonične kiseline (TNBS) u obliku klizme. 30 mg TNBS je otopljeno u 0,25 ml 30% etanola te pomoću katetera duljine 8 cm uvedeno u kolon (slika 8). Ovaj postupak je proveden pod anestezijom. U skupini životinja koju smo označili kao zdrava kontrola, pomoću katetera smo u kolon uveli 0,5 ml 0,9% fiziološke otopine. Potom smo životinje podijelili u nekoliko skupina u ovisnosti od primjene morfogenih proteina (tablica 7).

Da bi se opisale promijene na crijevima koje se zbivaju tijekom nastanka, razvoja i cijeljenja kolitisa, životinje su žrtvovane u različitim vremenskim intervalima i to 2, 5, 10, 14 i 30-tog dan nakon primjene TNBS/etanol. Na taj način smo mogli pratiti makroskopske i mikroskopske promijene tijekom eksperimentalnog kolitisa štakora.

*Pilot pokus: utvrđivanje preventivnog i terapijskog djelovanja BMP-7.* Da bi se odredilo preventivno djelovanje BMP-7, u 10 životinja je 1,5 sat prije izazivanja kolitisa aplicirano 250 µg/kg BMP-7 u obliku i.v. injekcije. Ponovne injekcije su slijedile 1, 2, 3, 5, 7, i 10-ti dan. Za procjenu terapijskog učinka BMP-7, 24h nakon izazivanja kolitisa u 10 životinja je ubrizgana injekcija BMP-7 u dozi od 250 µg/kg. Terapiju sa istom dozom smo nastavili 2, 3, 5, 7 i 10-tog dana. Životinje su žrtvovane 14. dan.

*Terapijska primjena BMP-6 i BMP-7 i utvrđivanje najučinkovitije doze.* U terapijskom modelu željeli smo ispitati djelovanje morfogenih proteina, BMP-7 i -6 nakon izazivanja kolitisa. Dan kada smo izazvali kolitis obilježili smo kao 0. dan. Životinje su potom primile 6 injekcija BMP-6 i -7 počevši od dana 1. Sljedeće injekcije su bile 2, 3, 5, 7 i 10 dana. Primijenili smo 3 doze BMP-7 (30, 100 i 250 µg/kg) i BMP-6 (30, 100 i 300 µg/kg). BMP-6 i -7 su ubrizgani u obliku i. v. injekcija u repnu venu u trajanju od 15 sekundi. Životinje su žrtvovanje 14. dan.

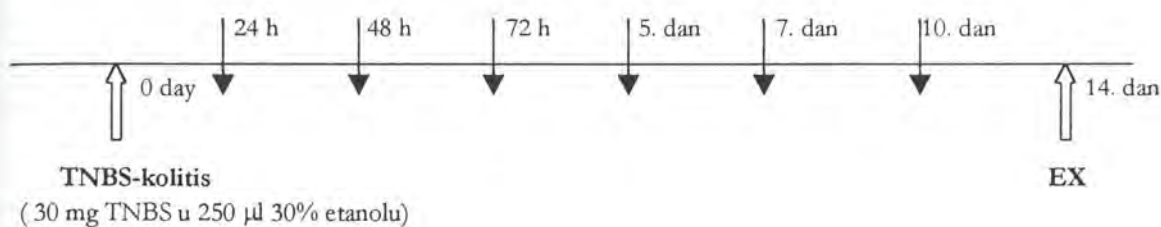


**Slika 8.** Shematski prikaz izazivanja eksperimentalnog kolitisa. Kateter duljine 8 cm je kroz rektum uveden u kolon i ubrizgana je otopina 30 mg TNBS u 250 $\mu$ l 30% etanola.

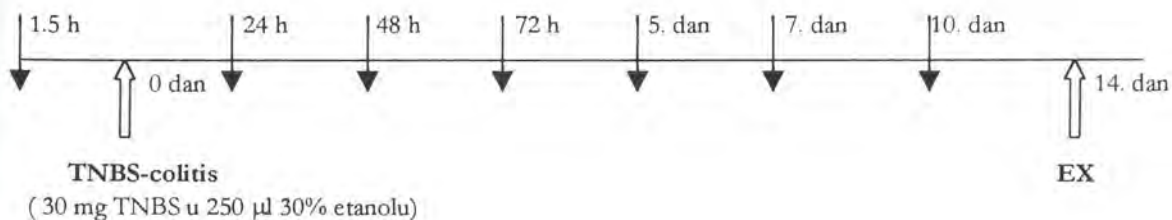
*Profilaktička primjena BMP-6 i BMP-7.* Da bi se odredilo preventivno djelovanje BMP-7 i -6 u ublažavanju posljedica kolitisa, određena doze BMP-7 (250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) i BMP-6 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) su ubrizgane u repnu venu štakora 1,5h prije izazivanja kolitisa, a potom se liječenje nastavilo 1, 2, 3, 5, 7 i 10-ti dan. Životinje su žrtvovanje 14. dan.

Volumen u kojem su BMP-7 i -6 otopljeni i ubrizgani i.v. je bio stalan (250  $\mu\text{l}$ ), a koncentracija BMP-7 i -6 se mijenjala. Kontrolnim životinjama ubrizgali smo 250  $\mu\text{l}$  otapala (acetatni pufer pH=4,5).

Shematski prikaz rasporeda injiciranja BMP-6 i BMP-7 u terapijskom modelu:



Shematski prikaz rasporeda i.v. injekcija BMP-6 i BMP-7u profilaktičkom modelu:





**Tablica 7.** Skupine pokusnih životinja.

<b>Skupina</b>	<b>Naziv skupine</b>	<b>TNBS/etanol</b>	<b>BMP-6 doza</b>	<b>BMP-7 doza</b>	<b>Broj životinja</b>
1	Zdrava-kontrola	vehikl	/	/	10
2	Kontrola	TNBS/etanol	vehikl	/	10
3	Tretman BMP-6	TNBS/etanol	30 µg/kg	/	10
4	Tretman BMP-6	TNBS/etanol	100 µg/kg	/	10
5	Tretman BMP-6	TNBS/etanol	300 µg/kg	/	10
6	Tretman BMP-7	TNBS/etanol	/	30 µg/kg	10
7	Tretman BMP-7	TNBS/etanol	/	100 µg/kg	10
8	Tretman BMP-7	TNBS/etanol	/	250 µg/kg	10
9	Pretretman BMP-6	TNBS/etanol	100 µg/kg	/	10
10	Pretretman BMP-7	TNBS/etanol	/	100 µg/kg	10

### 2.3. Uzimanje materijala i priprema tkiva za daljnju obradu

Za izolaciju kolona koristili smo pristup preko trbušne stijenke (laparotomija). Nakon orijentacijskog pregleda struktura unutar trbušne stijenke (postojanje adhezija), mikrokirurškom pincetom smo otklonili tkivo koje onemogućava izravan pristup kolonu. Izolirali smo distalni dio kolona (~8 cm), potom ga otvorili uzdužnom incizijom, isprali fiziološkom otopinom i fotografirali. Od svakog kolona uzeli smo 3 uzorka na promijenjenim dijelovima kolona, a ukoliko nisu zamijećene promijene uzeli su se uzorci ~ 1, 3 i 7 cm proksimalno od anusa. Tkivo se fiksiralo u 4% paraformaldehidu i uklopilo u parafinske blokove. Napravljeni su serijski rezovi debljine 7 µ. Tkivni rezovi su bojani hemalaun eozinom i pregledani uporabom mikroskopa.

## 2.4. Makroskopski indeks oštećenja

Veličinu oštećenja mukoze odredili smo na osnovi makroskopskog indeksa oštećenja prema kriterijima navedenim u tablici 8 (241) od dva neovisna promatrača.

Tablica 8. Kriteriji za određivanje makroskopskog indeksa oštećenja.

Kriteriji	Bodovi
<b>Ulceracije</b>	
Normalno crijevo.	0
Hiperemija, bez ulkusa.	1
Ulkus bez hiperemije ili zadebljanja crijevne stijenke.	2
Ulkus sa upalom na jednom mjestu.	3
Ulkus/upala na dva ili više mjesta.	4
Oštećenje kolona > 1 cm.	5
Oštećenje kolona > 2 cm. Za svaki 1 cm povećanja oštećenja pridodat je 1 bod.	6-10 plus
<b>Dijareja</b>	
Nije prisutna.	0
Prisutna.	1
<b>Adhezije</b>	
Osustvo adhezija.	0
Male adhezije (kolon se lako može odvojiti od susjednog tkiva)	1
Velike adhezije.	2

"Upala" se definira kao hiperemija i zadebljanje crijevne stijenke.

## 2.5. Mikroskopski indeks oštećenja

Mikroskopski indeks oštećenja na parafinskim rezovima (3 ili više rezova po svakom kolonu) odredili smo prema prethodno utvrđenim kriterijima navedenim u tablici 9 (211). Histološka procjena oštećenja napravljena je pomoću svjetlosnog mikroskopa na šifriranim staklima.

**Tablica 9.** Kriteriji za određivanje mikroskopskog indeksa oštećenja.

Kriteriji	Bodovi
Nema promjena.	0
Oštećenje ograničeno na epitel.	1
Žarišna ulceracija mukoze	2
Žarišna, transmuralna upala i ulceracije.	3
Opsežne transmuralne ulceracije i upala ograničena sa normalnom mukozom.	4
Opsežna transmuralna ulceracija i upala koja zahvaća sve slojeve crijeva.	5

## 2.6. Histomorfometrija i imunohistokemija

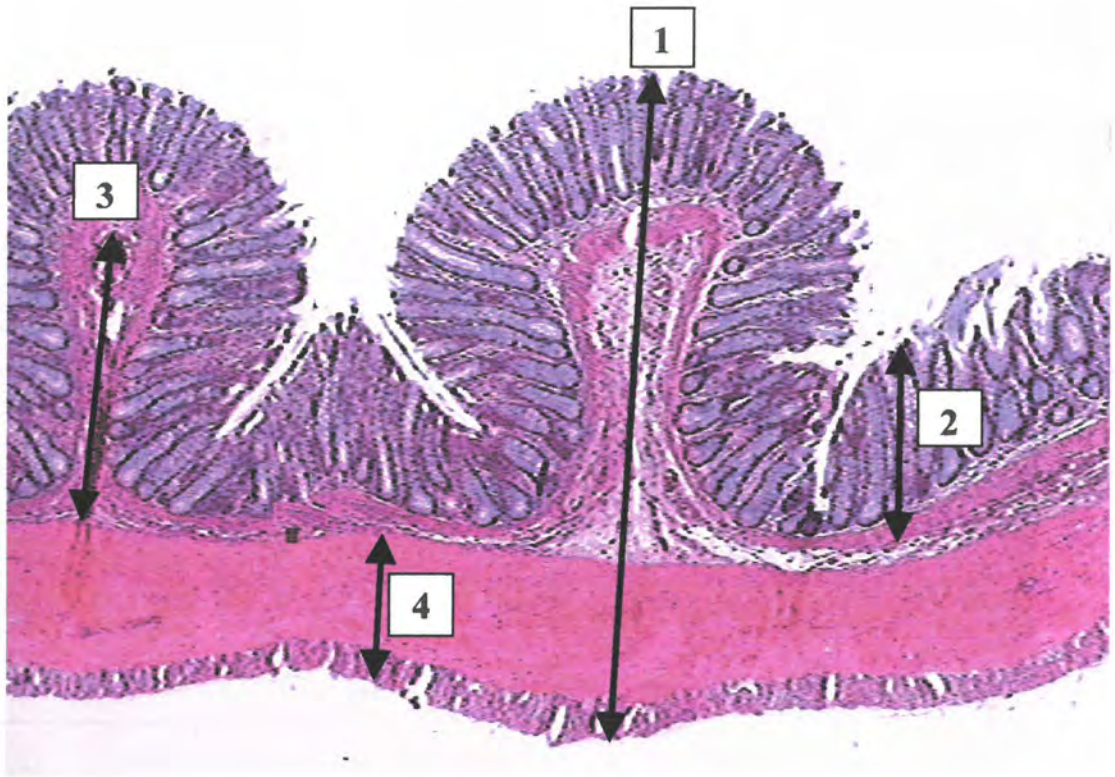
Na rezovima obojanim hemalaun eozinom određivali smo sljedeće histomorfometrijske parametre crijeva: ukupnu debljinu i debljinu pojedinih slojeva stijenke kolona (tunica mucosa, lamina submucosa i tunica muscularis) (slika 9). Sva mjerenja su izvršena sa povećanjem na objektivu 4x. Debljina kolona je određena mjerenjem udaljenosti serozne od mukozne površine kolona. Mjerenja su napravljena na udaljenosti od 1 mm na cijeloj duljini svakog reza (najmanje 2 reza po životinji) i ograničeni na područja gdje su žlijezde prisutne cijelom duljinom reza. Analizu smo proveli pomoću kompjuterskog programa za kvantitativnu obradu mikroslike (Sform, VAMS Zagreb) adaptiranog na Olympus BX50 mikroskop.

Za imunohistokemijsko određivanje tkivnih antigena upotrijebili smo standardni postupak imunodetekcije imunoperoksidaze tehniku (Zymed, San Francisco, CA). Nakon blokiranja nespecifičnih veznih mjesta, rezovi debljine 7  $\mu\text{m}$  su inkubirani sa monoklonskim antitijelima. Na rezove smo nakapali sekundarno biotinizirajuće antitijelo, a potom je dodana streptavidin-peroksidaza. Prisustvo peroksidaze je otkriveno pomoću kromogena (AEC) a kontrastno bojenje je bilo sa hematoksilinom.

Za detekciju morfogenih proteina koristili smo sljedeća monoklonska i poliklonska protutijela: antiBMP-7 antitijelo (3330, 718, ser 17, B12), antiBMP-3 i anti-BMP-4 antitijelo.

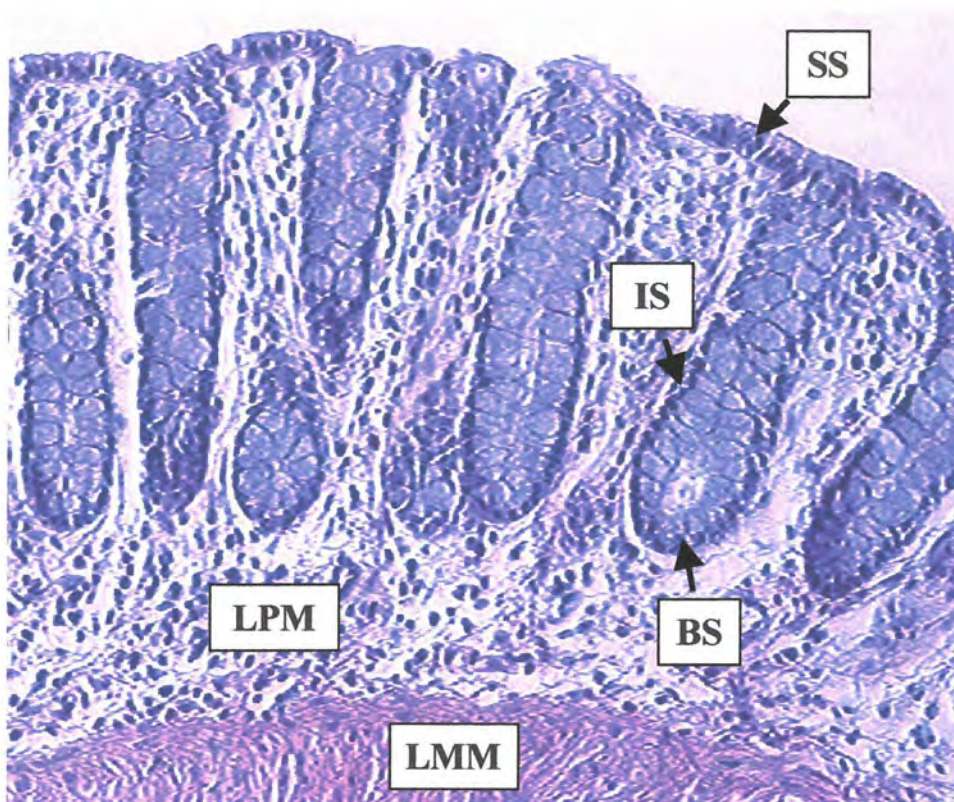
Imunohistokemijski smo ispitali broj stanica obilježenih monoklonskim protutijelom za PCNA (od engl. Proliferatinf Cell Nuclear Antigen) u kriptama mukoze kolona te u submukozi. Svaku kriptu kolona smo podijelili u 3 dijela: površni, srednji ili intermedijarni i bazalni (slika 10). U površnom segmentu kripe se nalaze epitelne stanice koje pokrivaju lumen kripe i susjednu laminu propriu mucosae. Srednji (intermedijarni) segment predstavlja dio





**Slika 9.** Shematski prikaz mjerenih histomorfometrijskih parametra stijenke crijeva.

1. Debljina stijenke kolana (od tunicae mucosae do tunicae serose)
2. Debljina tunicae mucosae
3. Debljina laminae submucosae
4. Debljina tunicae muscularis



**Slika 10.** Tunica mucosa kolona sa kriptama na kojima opisujemo tri segmenta (pov. 100x). SS- površni dio kriptе; IS- intermedijarni ili srednji dio kriptе; BS- bazalni dio kriptе crijeva. Kriptе su okružene sa laminom propriom mucosae (LPM), a ispod laminae propriae je lamina muscularis mucosae (LMM).



kripte između površnog i bazalnog segmenta, a bazalni segment se opisuje kao najniži dio lumena kripte, odnosno dio kripte koji je najbliži lamini muscularis mucosa. Izbrojali smo najmanje 3000 stanica po rezu crijeva obojanih sa PCNA u srednjem i bazalnom segmentu kripte te u submukozi. Broj pozitivnih stanica u mukozi smo izrazili kao postotak od ukupno izbrojanih stanica u srednjem i bazalnom dijelu kripte, a u submukozi kao ukupan broj pozitivnih stanica. Protutijelo za PCNA obilježava proliferirajući nuklearni antigen i pokazatelj je staničnog umnažanja.

Jedna od komplikacija Crohnove bolesti je suženje kolona i pretpostavlja se je posljedica poremećaja izražaja intestinalnih kolagena tipa I i III. Uz pomoć monoklonskih protutijela na kolagen tip I i III (Birmingham, USA) smo odredili njihov prostorni izražaj i međusobni omjer.

Protutijela za obilježavanje vimentina i  $\alpha$ -aktin glatkih mišićnih stanica, SMA (engl. Smooth Muscle  $\alpha$ -Actin) (DAKO) koristili smo za utvrđivanje prostorne izraženosti i da li dolazi do promjene u ispoljavanju ovih proteina nakon profilaktičkog i terapijskog davanja BMP-7 i -6.

## 2.7. Nakupljanje i aktivnost neutrofila

Nakupljanje neutrofila odredili smo korištenjem boje koja sadrži naftol AS-D kloroacetat (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) za prikaz estera na histološkim preparatima. Neutrofile smo izbrojali u tunici mucosae i lamini submucosae pomoću kompjuterskog programa za kvantitativnu obradu mikroslike (Sform, VAMS, Zagreb) adaptiranog na Olympus BX50 mikroskop. Rezultati su izraženi kao broj neutrofila po  $\text{mm}^2$ .

## 2.8. Statistička analiza

Podaci su prikazani kao medijan te srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Parametrijski podaci su analizirani sa Studentov t-testom, a neparametrijski sa Wilcoxon Mann-Whitney U-testom i F-testom (jednosmjerna ANOVA, analiza varijance). Pri tom je značajnost razlika potvrđivana na razini vjerojatnosti od  $p < 0,05$ .



## IV REZULTATI

### 1. Opis modela TNBS/etanol kolitisa

Životinjama je intrarektalno uveden kateter kroz koji je aplicirano 30 mg TNBS u 30% etanolu. Životinje su žrtvovane 2, 5, 10, 14 i 30 dan nakon izazivanja kolitisa. Dijareja je zamijećena u svih životinja. Gubitak tjelesne težine zabilježen je u životinja koje su žrtvovane 2. dan ( $27 \pm 3,96$  g;  $p < 0,01$ ), 5. dan ( $24 \pm 4,52$  g;  $p < 0,01$ ), 10. dan ( $32 \pm 9,87$  g) i 14. dan ( $22 \pm 5,53$  g;  $p < 0,01$ ), a životinje koje su žrtvovane 30. dan su dobile na tjelesnoj težini ( $15 \pm 5,43$ ;  $p < 0,05$ ). Pregledom peritonealne šupljine zamijećene su adhezije u skupini koja je žrtvovana 10. i 14. dana.

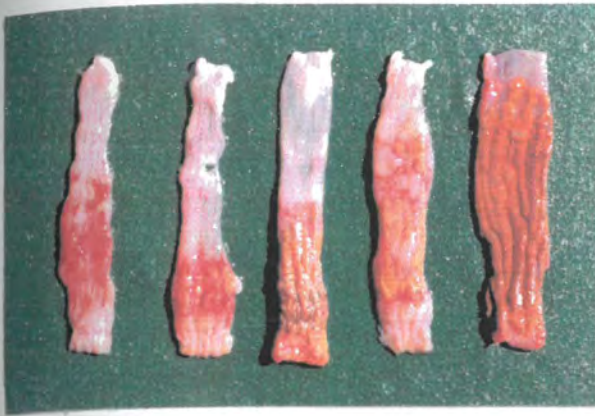
Drugoga dana nakon primjene TNBS/etanola makroskopski je uočljivo opsežno oštećenje kolona. Na crijevima se ističu tamna, nekrotična područja koja su okružena sa hiperemičnim područjima upalnog tkiva. Stijenka kolona je zadebljana, a vidljive su longitudinalne, izdignute otekline upalnog tkiva koje sluznici daju "kaldrmasti" izgled (slika 11A.). Oboljeli segment crijeva je oštro ograničen od susjednog normalnog tkiva. Histološkim pregledom uočava se opsežno oštećenje sluznice koje se karakterizira hemoragijom, edemom, eksfolijacijom epitela i infiltracijom polimorfonuklearnim leukocitima (slika 12A). Lamina muscularis mucosae je očuvana.

Petoga dana su vidljiva zasebna, jasno ograničena područja ulceracije i upale odvojena sa normalnim područjima mukoze (slika 11B). Prisutna je transmuralna upala, površne ulceracije te akutni upalni infiltrat. Nema zadebljanja lamine muscularis mucosae (slika 12B).

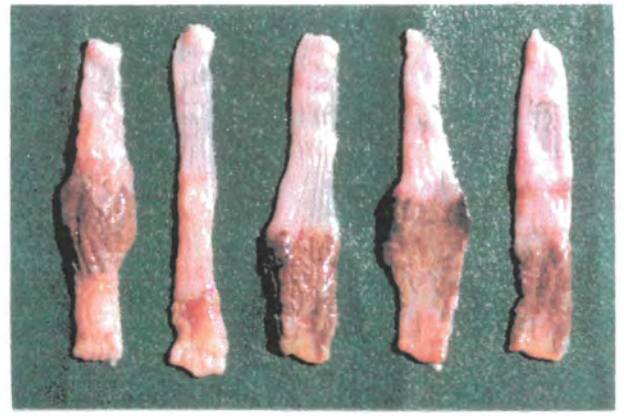
Desetoga dana ulceracije su fokalnog karaktera, a okolna sluznica je normalna (slika 11C). Histološki su zamijećeni opsežni ulkusi sa nekrozom mukoze i submukoze (slika 12C). Uočava se prisustvo upalnog infiltrata kojeg čine polimorfonuklearni leukociti, makrofagi, eozinofili, fibroblasti i limfociti. Prisutna su zadebljanja laminae muscularis mucosae.

Četrnaesti dan ulceracije su fokalnog karaktera (slika 11D). Nekrotična područja mukoze i submukoze su zamijenjena sa obilim granulacijskim tkivom (slika 12D). Mukoza uz ulkus pokazuje iskrivljenost kripte, smanjenje broja vrčastih stanica te cistično dilatirane kripte. Vidljivo je cijeljenje ulkusa i razvoj kroničnog upalnog infiltrata. U ulkusima je prisutan i akutni upalni stanični infiltrat koji većinom čine polimorfonuklearni leukociti.

Tridesetoga dana dolazi do oporavka. Prisutna je fibroza, a ulkusi su transversalnog karaktera (slika 11E). Kronični upalni infiltrat je prisutan u mukози i submukози, vidljiva je vaskularna proliferacija i tkivna dezorganizacija u području laminae muscularis mucosae (slika 12E). Uočava se postojanje suženih i dilatiranih segmenata crijeva.



A



B



C



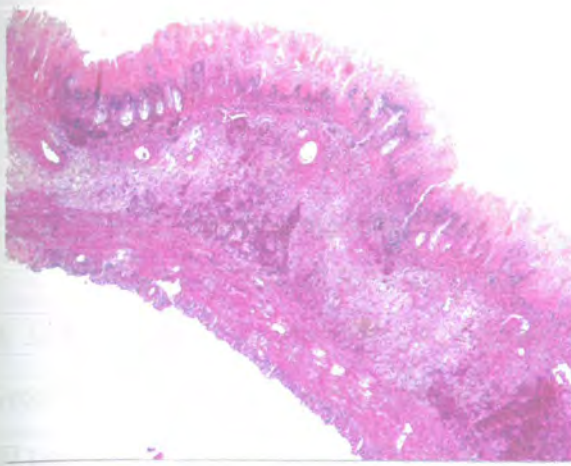
D



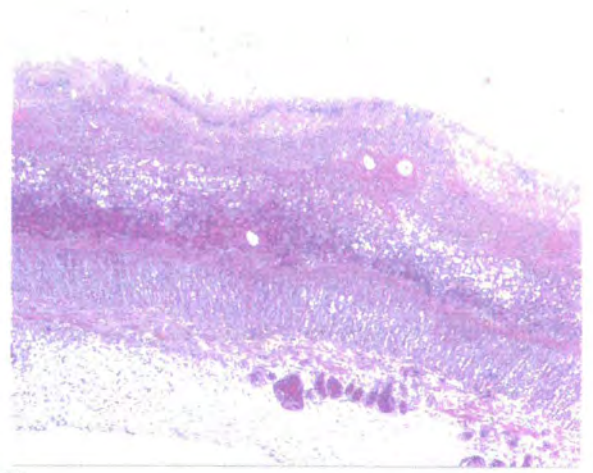
E

**Slika 11.** Distalni segmenti kolona pokusnih životinja u kojih je kolitis izazvan sa TNBS/etanolom. Životinje su žrtvovane: **A.** 2. dan; **B.** 5. dan; **C.** 10. dan; **D.** 14. dan; **E.** 30. dan.

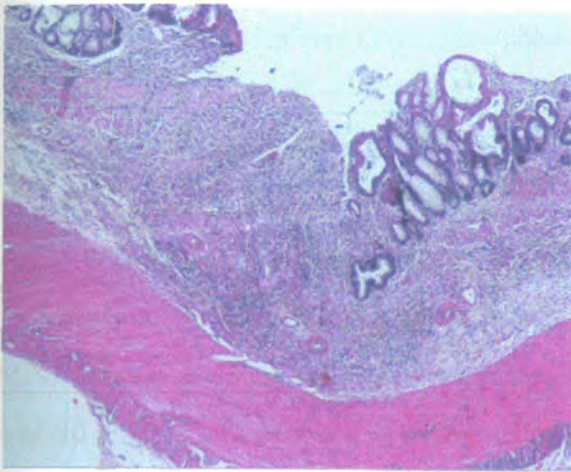




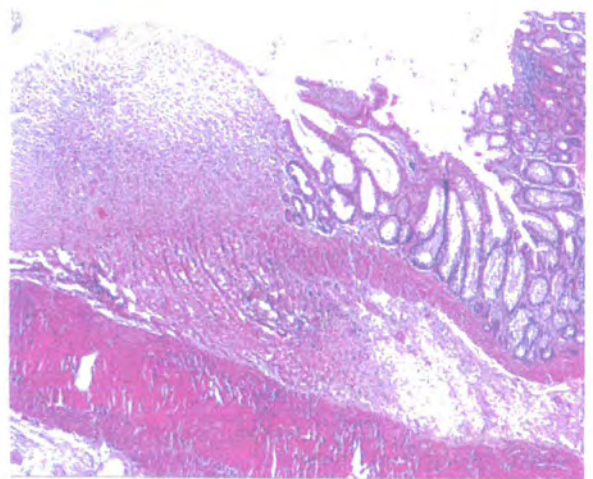
**A**



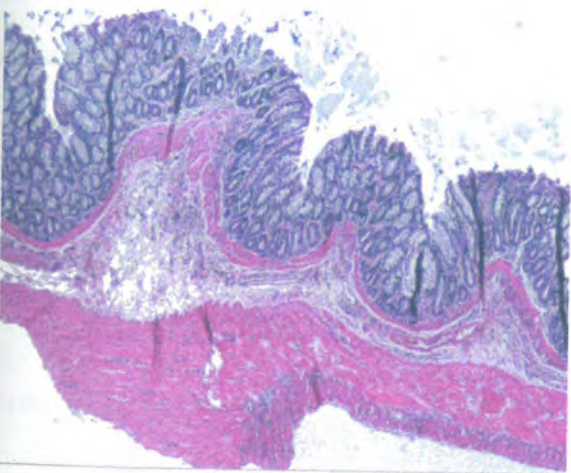
**B**



**C**



**D**



**E**

**Slika 12.** Mikroskopske promjene crijeva nakon izazivanja kolitisa sa TNBS/etanolom. **A.** 2. dan; **B.** 5. dan; **C.** 10. dan; **D.** 14. dan; **E.** 30. dan.

## 2. Pilot pokus

### 2.2. Profilaktička primjena BMP-7

U kontrolnoj skupini životinja pojava ulceracija je zamijećena u 7 životinja od ukupno 10, hiperemija u 2 životinje, a 1 je uginula 10-tog dana pokusa zbog perforacije crijeva. Životinje su izgubile na tjelesnoj težini  $38,89 \pm 10,2$  g ( $p < 0,01$ ). U životinja koje su dobivale  $250 \mu\text{g/kg}$  BMP-7 i.v. ulkusi su zamijećeni u 1 životinje, a u 2 hiperemija. Ostale životinje nisu pokazivale promjene na crijevima. Gubitak na tjelesnoj težini je bio  $22,22 \pm 8,56$  ( $p < 0,01$ ). Makroskopski index oštećenja kontrolne i pokusne skupine je prikazan u tablici 10.

### 2.3. Terapijska primjena BMP-7

U kontrolnoj skupini životinja prisutnost ulkusa i upale utvrđen je u 7 od 10 životinja. 5 životinja je izgubilo na tjelesnoj težini, 3 životinje su dobile, a u 2 nije zamijećena promjena tjelesne težine. Porast tjelesne težine je iznosio  $7,25 \pm 4,85$  g. U životinja koje su dobivale BMP-7 promjene na crijevima su zamijećene u 2 životinje. Životinje su dobile na tjelesnoj težini ( $10 \pm 3,27$  g). Makroskopski indeks oštećenja je prikazan u tablici 10.

**Tablica 10.** Makroskopski indeks oštećenja crijeva u pilot pokusu.

Primjena BMP-7	Skupina	Medijan (raspon)
Profilaktička primjena	Kontrola	4 (2-6)
	BMP-7	1 (1-3)
	p	< 0,001*
Terapijska primjena	Kontrola	3 (1-6)
	BMP-7	1 (1-7)
	p	< 0,05*

### 3. Profilaktičko i terapijsko djelovanje BMP-7 i BMP-6

#### 3.1. Opis promijena na crijevima i makroskopski indeks oštećenja

U životinja kojima je intrarektalno pomoću katetera uveden TNBS/etanol razvio se kolitis koji se očitovao dijarejom i krvavim stolicama u > 90% životinja. Početna tjelesna težina kontrolne i pokusne skupine se nije razlikovala. Tijekom prvog tjedna došlo je do 8-10% smanjenja tjelesne težine, ali krajem drugog tjedna u većine životinja je registrirano povećanje težine. Izuzetak je kontrolna skupina i skupina koja je primala 30 µg/kg BMP-6 kod kojih je došlo do smanjenja tjelesne težine. Promjene tjelesne težine su prikazane u tablici 11.

**Tablica 11.** Promjene u tjelesnoj težini tijekom profilaktičkog i terapijskog davanja BMP-6 i BMP-7.

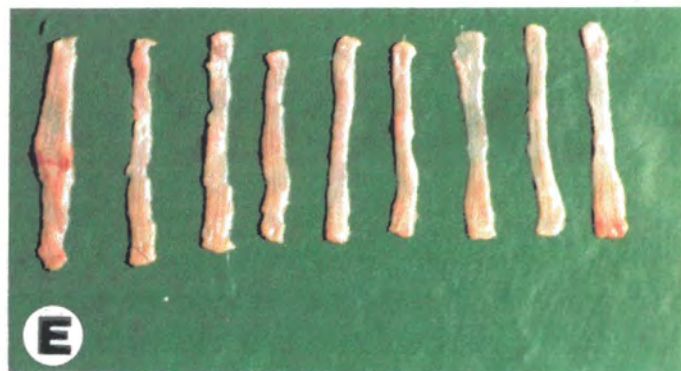
Skupina	Porast ili pad	Razlika u tjelesnoj težini	p vrijednost
Kontrola	↓	5 ± 3,73	
BMP-7 30 µg/kg	↑	28 ± 10,64	< 0,01*
BMP-7 100 µg/kg	↑	18 ± 5,12	< 0,01*
BMP-7 250 µg/kg	↑	44 ± 6,68	< 0,001*
BMP-7 profilaktički	↑	3 ± 2,1	
BMP-6 30 µg/kg	↓	8 ± 2,58	< 0,05*
BMP-6 100 µg/kg	↑	8 ± 5,53	
BMP-6 300 µg/kg	↑	23 ± 10,54	
BMP-6 profilaktički	↑	2 ± 1,85	



Četrnaestoga dana nakon intrakolične promjene TNBS/etanola promjene na distalnom kolonu su fokalnog karaktera. Na promijenjenim dijelovima kolona vidljivo je zadebljanje stijenke, prisustvo upale i ulkusa. Mjesta upale i ulkusa variraju u položaju od perirektalnog područja do 7 cm proksimalno od anusa. Promjene nisu zamijećene proksimalno od flexurae coli sinistreae. Uz postojanje transmuralne upale, zamijećeno je segmentalno, perikolično nakupljanje mezenteričkog masnog tkiva te fibrozne adhezije na tankom crijevu. Ulkusi su vidljivi kao bijele točke (fokusi) ili linije koje su okružene sa zadebljalom, upaljenom mukozom. Linearni ulkusi su veličine do 3 mm širine i 1 cm debljine, dok opsežni ulkusi zahvaćaju cijelu širinu kolona i više od 3 cm duljine crijeva. Najizrazitije makroskopske promjene na crijevima su zabilježene u kontrolnoj skupini. U 20% slučajeva uočljive su ulceracije veličine 2 cm sa "kaldrmastim" izgledom mukoze i zadebljanjem stijenke kolona. Također u 20% životinja se ističu se transverzalne ulceracije. Najbolji oporavak je zabilježen u životinja koje su dobivale BMP-7 terapijski u dozi od 250 μg/kg u kojih u 70% slučajeva nisu zamijećene promjene na crijevima. Također i kod preventivne primjene BMP-7 je uočen dobar oporavak, jer u 80% slučajeva životinje nisu pokazivale promjene na crijevima. Za BMP-6, najučinkovitije doze su se pokazale doza od 100 μg/kg (80% životinja bez promjena) i 300 μg/kg (70%). Profilaktičkom primjenom BMP-6 promjene nisu zamijećene u polovice životinja. Makroskopske promjene na crijevima kontrolne i pokusnih skupina su prikazane na slikama 13 i 14. Nisu zamijećene promjene na jetri, slezeni, bubrezima i tankom crijevu. Makroskopski indeks oštećenja je prokazan u tablici 12.

**Tablica 12.** Makroskopski indeks oštećenja kontrolne i pokusnih skupina.

Skupina	medijan	raspon	p-vrijednost
Kontrola	2	1-7	
BMP-7 30 μg/kg	1,5	1-3	
BMP-7 100 μg/kg	2	1-4	
BMP-7 250 μg/kg	1	1-4	< 0,05*
BMP-7 profilaktički	1	1-4	< 0,05*
BMP-6 30 μg/kg	2,5	1-6	
BMP-6 100 μg/kg	1	1-4	< 0,01*
BMP-6 300 μg/kg	1	1-6	< 0,05*
BMP-6 profilaktički	1,5	1-5	

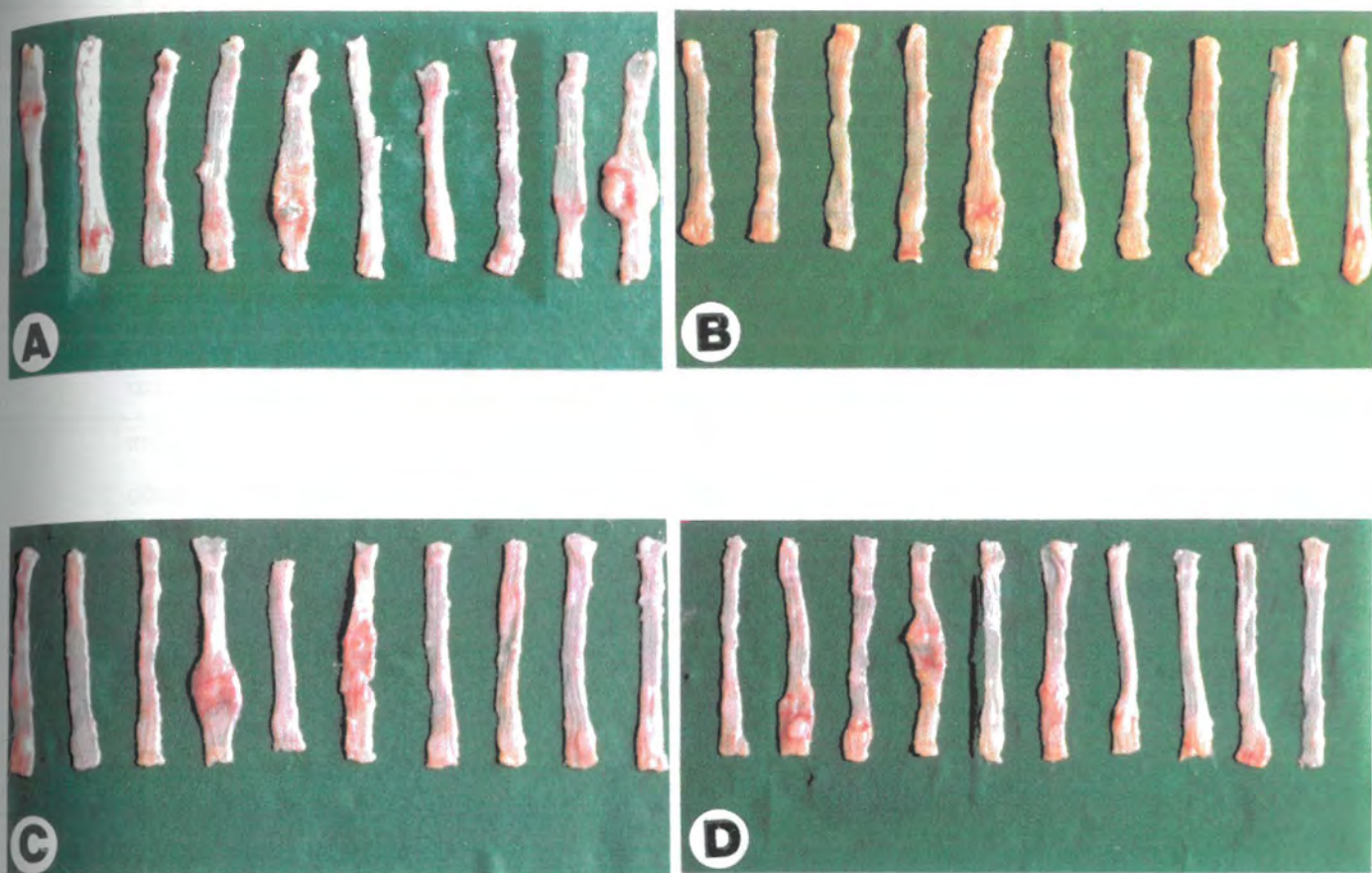


**Slika 13.** Makroskopski izgled crijeva nakon primjene BMP-7.

**A.** Kontrolna skupina; **B.** BMP-7 30 µg/kg; **C.** BMP-7 100 µg/kg;

**D.** BMP-7 250 µg/kg; **E.** BMP-7 profilaktički.





**Slika 14.** Makroskopski izgled crijeva nakon primjene BMP-6.

**A.** BMP-6 30 µg/kg; **B.** BMP-6 100 µg/kg; **C.** BMP-6 300 µg/kg; **D.** BMP-6 profilaktički.



### 3.2. Mikroskopski indeks oštećenja

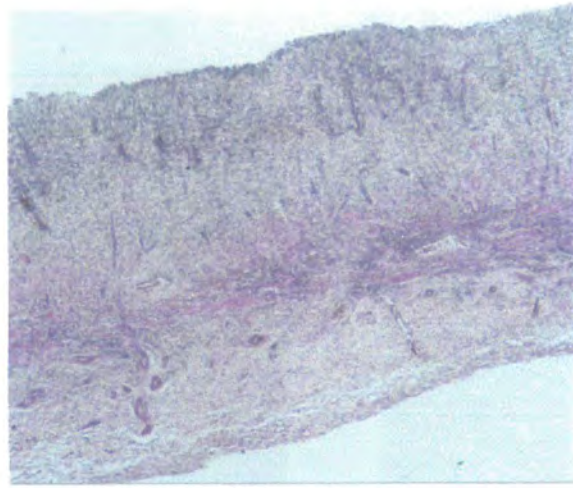
Mikroskopskim pregledom histoloških rezova debelog crijeva vidljive su se ulceracije različite dubine u pojedinim skupinama. U ulkusima je uočeno prisustvo akutnog upalnog infiltrata kojeg su većinom činili neutrofilni te istovremeno prisustvo kroničnog upalnog infiltrata sačinjenog od limfocita. Histološki indeks oštećenja prikazan u tablici 13. pokazuje značajne razlike između grupa. U 80% životinja tretiranih sa različitim dozama BMP-6 i -7 (s izuzetkom doze BMP-6 od 30 µg/kg) su pokazale minimalnu zahvaćenost kolona sa indeksom oštećenja od 0-1 (tablica 14). U dvije trećine liječenih životinja nije zamijećeno oštećenje tako da je indeks oštećenja bio 0. U kontrolnoj skupini, 50% životinja je imalo veće oštećenje sa maksimalnom ocjenom 5. Učinci pojedinačnih doza BMP-7 i -6 na histološke promjene crijeva prikazane su na slikama 15 i 16. Prema histološkom indeksu oštećenja, najučinkovitija doza BMP-7 je 250 µg/kg i profilaktička primjena BMP-7. Za BMP-6 je to doza od 100 µg/kg i također profilaktička primjena BMP-6. Mikroskopske promjene kolona tijekom razvoja kolitisa i učinak BMP-7 i -6 na oporavak su prikazane na slikama 15 i 16.

**Tablica 13.** Djelovanje BMP-6 i -7 na morfologiju kolona u TNBS/etanol kolitisu. Histološki indeks oštećenja.

Skupina	medijan	raspon	p-vrijednost
Kontrola	1	0-5	
BMP-7 30 µg/kg	0,5	0-4	
BMP-7 100 µg/kg	0,5	0-3	
BMP-7 250 µg/kg	0	0-2	< 0,05*
BMP-7 profilaktički	0	0-2	< 0,01*
BMP-6 30 µg/kg	1,5	0-5	
BMP-6 100 µg/kg	0	0-3	< 0,05*
BMP-6 300 µg/kg	0	0-5	< 0,05*
BMP-6 profilaktički	0,5	0-3	< 0,05*

**Tablica 14.** Prikaz broja životinja po skupinam u odnosu na histološki indeks oštećenja (raspon od 0-5).

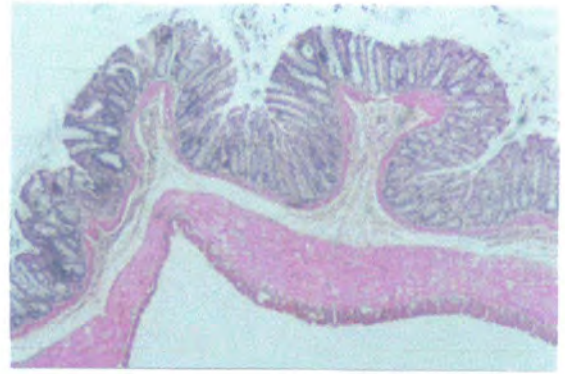
Skupina	Histološki indeks oštećenja					
	0	1	2	3	4	5
Kontrola	1	5	1	1	-	2
BMP-7 30 µg/kg	5	3	1	-	1	-
BMP-7 100 µg/kg	5	3	-	2	-	-
BMP-7 250 µg/kg	7	1	2	-	-	-
BMP-7 profilaktički	8	1	1	-	-	-
BMP-6 30 µg/kg	3	2	3	-	1	1
BMP-6 100 µg/kg	7	1	1	1	-	-
BMP-6 300 µg/kg	7	1	-	-	1	1
BMP-6 profilaktički	5	3	-	2	-	-



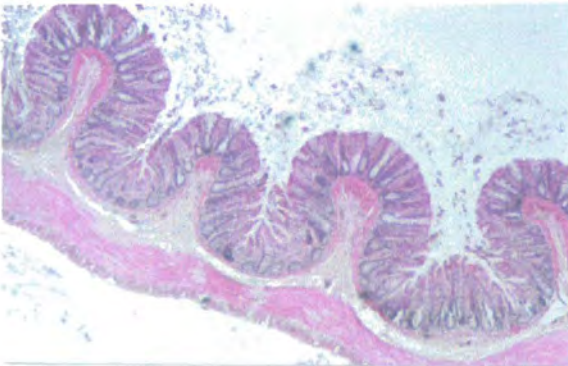
**A**



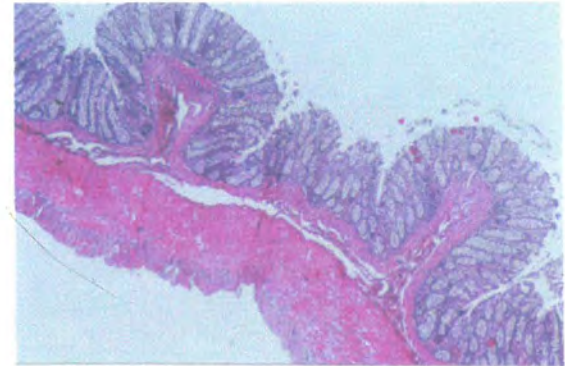
**B**



**C**



**D**

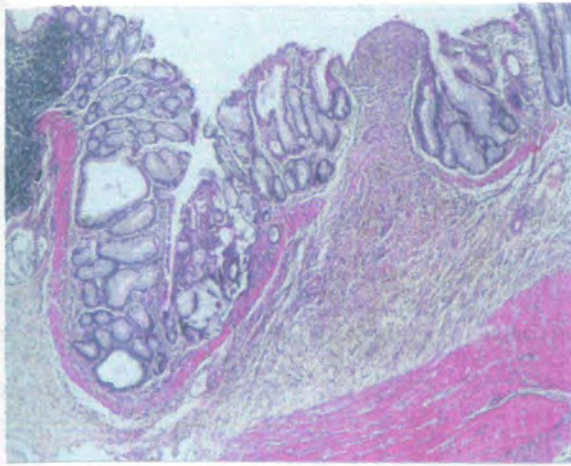


**E**

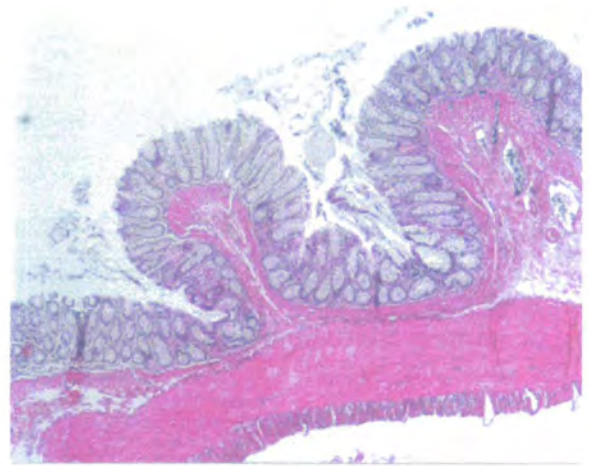
**Slika 15.** Učinak BMP-7 na mikroskopske promjene kolona.

**A.** Kontrolna skupina: prisutna transmuralna upala; **B.** BMP-7 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ : ulkusi prisutni u mukozi, a u submukozi edem i upalni infiltrat; **C.** BMP-7 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ : ulceracije ograničene na mukozi; **D.** BMP-6 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ : oskudne promjene mukoze; **E.** BMP-6 profilaktički: stijenka kolona bez promjena.

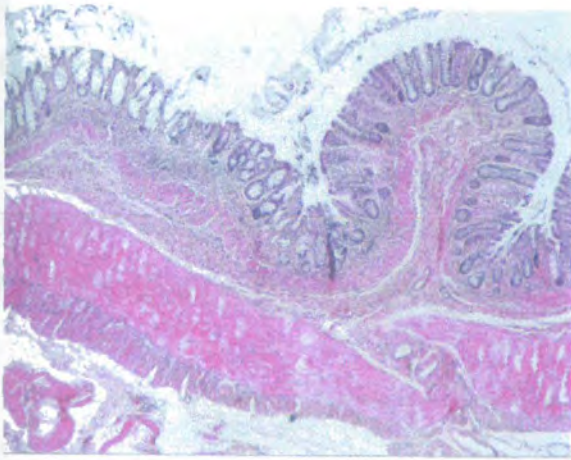




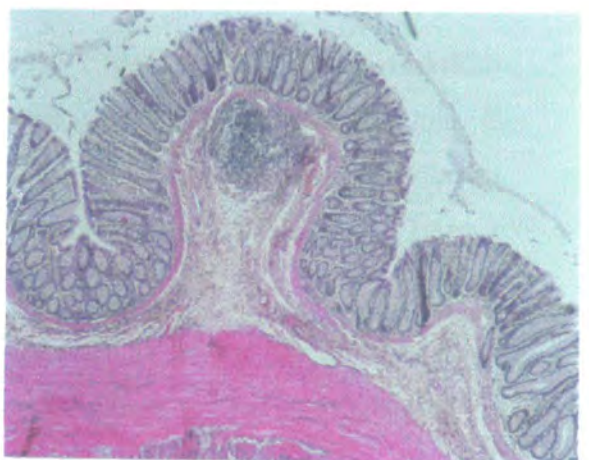
A



B



C



D

**Slika 16.** Mikroskopski izgled crijeva nakon primjene BMP-6

**A.** BMP-6 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ : nekrotična područja mukoze i submukoze zamijenjuje granulacijsko tkivo; **B.** BMP-6 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ : stijenka kolona bez promjena; **C.** BMP-6 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ : ulceracije mukoze umjerene veličine, upalni infiltrat u submukozi ; **D.** BMP-6 profilaktički: promjene ograničene na epitel kolona, u submukozi su prisutni reaktivni limfni folikuli..

### 3.3. Morfometrija crijeva

Ukupna debljina stijenke kolona te debljina pojedinih slojeva stijenke (tunica mucosa, lamina submucosa, tunica muscularis) mjereni su pomoću kompjutorskog programa za kvantitativnu obradu mikroslike (Sform, VAMS, Zagreb). Sva mjerenja su izvedena pod povećanjem od 40x na 5 vidnih polja serijskih rezova debljine 7  $\mu\text{m}$ . Statistička izračunavanja vrijednosti navedenih parametara učinjeni su pomoću kompjutorskog programa Basic Statistic for Windows; testom jednosmjerane ANOVA.

*Tunica mucosa.* Naša mjerenja su pokazala da najdeblju tunicu mucosu ima skupina koja je dobivala BMP-7 (doza 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), a najtanju skupina BMP-7 (doza 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). U odnosu na zdravu kontrolu, statistički su značajne sljedeće skupine: kontrola, BMP-7 (doza 30 i 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) i BMP-6 (doza 30, 100 i 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Skupine BMP-7 (doze 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i profilaktički) te BMP-6 (profilaktički) ne pokazuje značajnije promjene u odnosu na zdravu kontrolu. U odnosu na bolesnu kontrolu nismo dobili odstupanja. Tunica mucosa skupine koja je dobivala BMP-6 (doza 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) i BMP-7 (250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i profilaktički) je tanja u odnosu na BMP-7 (doza 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) i statistički je značajna.

*Lamina submucosa.* Najveće vrijednosti lamine submucosae su zabilježene u skupini BMP-6 (doza 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), a najtanja u skupini BMP-7 (doza 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). U odnosu na zdravu i bolesnu kontrolu nije zabilježena statistička značajnost. Među pojedinim skupina zabilježena je značajnost između BMP-6 (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) koja ima najdeblju stijenku i BMP-6 (profilaktički), BMP-7 (doze 30, 100 i 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

*Tunica muscularis.* Najdeblji mišićni sloj crijeva smo izmjerili u skupini BMP-6 (profilaktički i doza 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), a najtanja BMP-7 (doze 30 i 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). U odnosu na zdravu kontrolu statistički su značajne vrijednosti sljedećih skupina: kontrola, BMP-6 (doze 30, 100, 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i profilaktički) i BMP-7 (profilaktički). U odnosu na bolesnu kontrolu povećanu debljinu stijenke pokazuju skupine BMP-6 (doza 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i profilaktički), a znatno tanju mišićnicu imaju skupine BMP-7 (doze 30 i 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Između pojedinih skupina, deblju stijenku u odnosu na BMP-6 (doza 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ima BMP-6 (profilaktički), a tanju BMP-7 (doze



30 i 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Skupina BMP-6 (doza 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) posjeduje značano deblju mišićnicu u odnosu na BMP-6 (doza 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) i BMP-7 (doze 30, 100, 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i profilaktički). Tunica muscularis skupine BMP-6 (doza 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) je značajno deblja od mišićnice skupine koja je dobivala BMP-7 (doze 30 i 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), a tanja od BMP-6 (profilaktički). Skupina BMP-6 (profilaktički) ima značano deblju stijenku od skupina BMP-7 (30, 100, 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i profilaktički). BMP-7 (doza 30 i 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ima znatno tanju mišićnicu od BMP-7 (profilaktički).

*Debljina stijenke kolona.* Najdeblju stijenku posjeduju skupine BMP-6 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i profilaktički), a najtanju skupina BMP-7 (250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). U odnosu na zdravu kontrolu statistički se razlikuju skupine BMP-6 (30, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i profilaktički). U odnosu na bolesnu kontrolu nisu utvrđene razlike. Između skupina, znatno deblju ukupnu debljine imaju skupina BMP-6 (doza 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) u odnosu na BMP-7 (30 i 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) te skupina BMP-6 (profilaktički) znatno deblju stijenku u odnosu na BMP-7 (250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).



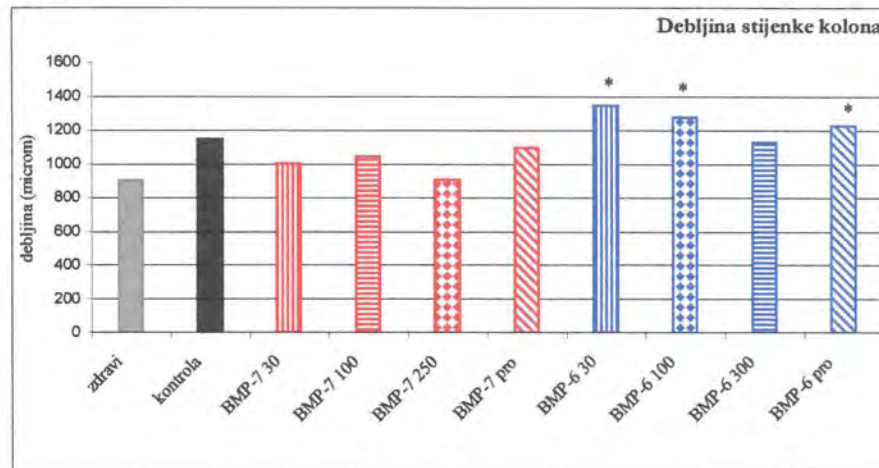
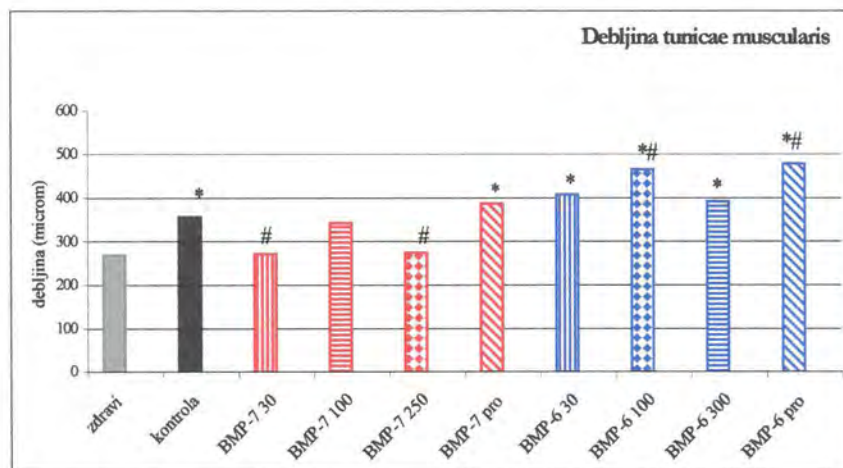
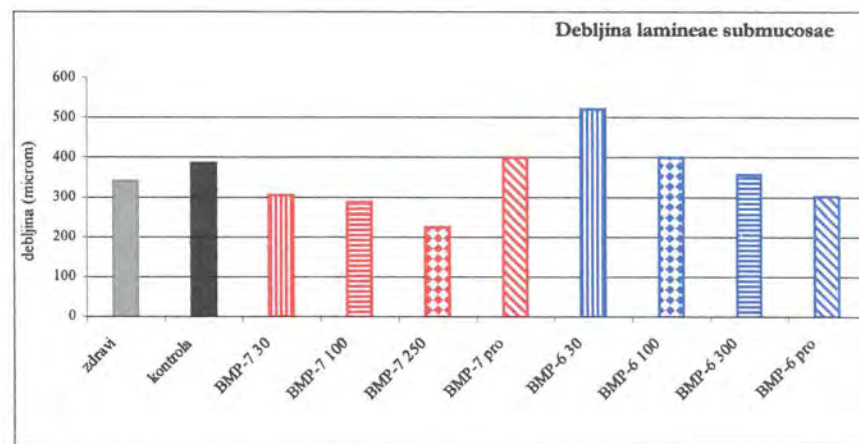
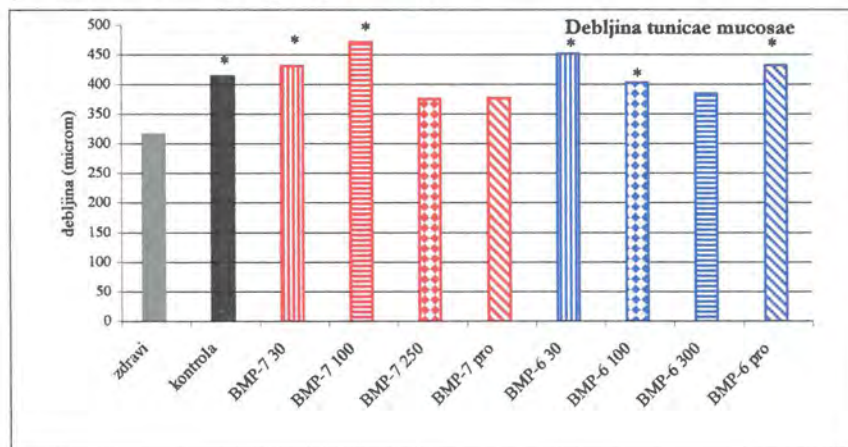
**Tablica 15.** Rezultati morfometrije stijenke kolona (vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti).

\*  $p < 0,05$  u odnosu na zdravu kontrolu;  $^{\S} p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

Skupina	Debljina pojedinačnih slojeva stijenke kolona ( $\mu\text{m}$ )			Ukupna debljina ( $\mu\text{m}$ )
	tunica mucosa	lamina submucosa	tunica muscularis	
Zdrava kontrola	316,42 $\pm$ 10,52	339,7 $\pm$ 35,59	268,84 $\pm$ 12,02	908,8 $\pm$ 44,06
Kontrola	413,270 $\pm$ 11,03*	384,18 $\pm$ 52,35	355,52 $\pm$ 10,8*	1144 $\pm$ 57,19
BMP-7 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	431,85 $\pm$ 26,02*	305,68 $\pm$ 29,3	273,65 $\pm$ 16,61 $^{\S}$	1004,67 $\pm$ 62,71
BMP-7 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	471,83 $\pm$ 23,32*	287,28 $\pm$ 29,48	344,2 $\pm$ 19,41	1046,31 $\pm$ 53,26
BMP-7 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$	375,95 $\pm$ 16,5	224,94 $\pm$ 24,67	274,92 $\pm$ 17,07 $^{\S}$	911,87 $\pm$ 49,54
BMP-7 profilaktički	377,41 $\pm$ 8,56	401,2 $\pm$ 52,07	387,71 $\pm$ 11,92*	1101,68 $\pm$ 52,81
BMP-6 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	451,7 $\pm$ 26,4*	521,82 $\pm$ 63,52	410,13 $\pm$ 17,7*	1347,8 $\pm$ 85,9*
BMP-6 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	402,85 $\pm$ 15,43*	399,66 $\pm$ 41,91	466,08 $\pm$ 15,62* $^{\S}$	1279,35 $\pm$ 55,86*
BMP-6 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$	384,54 $\pm$ 14,0	356,86 $\pm$ 45,07	393,44 $\pm$ 11,96*	1130,02 $\pm$ 63,06
BMP-6 profilaktički	432,37 $\pm$ 17,59*	302,33 $\pm$ 31,9	479,82 $\pm$ 15,85* $^{\S}$	1226,1 $\pm$ 49,15*

**Slika 17.** Grafički prikaz rezultata morfometrije kolona. Prikaz ukupne debljine kolona i debljine pojedinih slojeva stijenke.

\* $p < 0,05$  vs. zdravi; #  $p < 0,05$  vs. kontrola.



### 3.4. Rezultati imunohistokemijskih analiza

#### 3.4.1. Imunohistokemijsko određivanje izražaja BMP-7 i -3

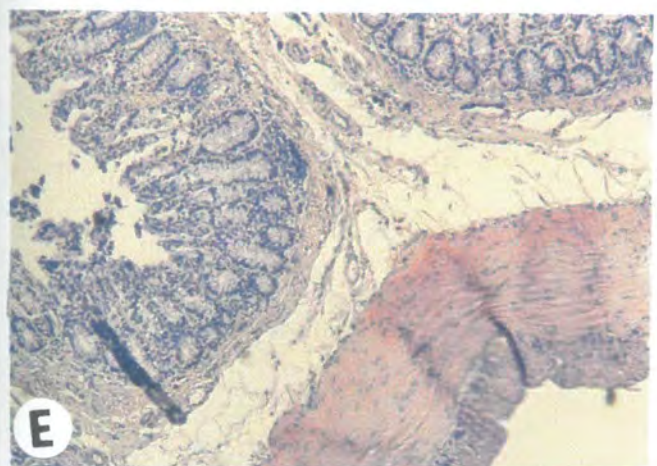
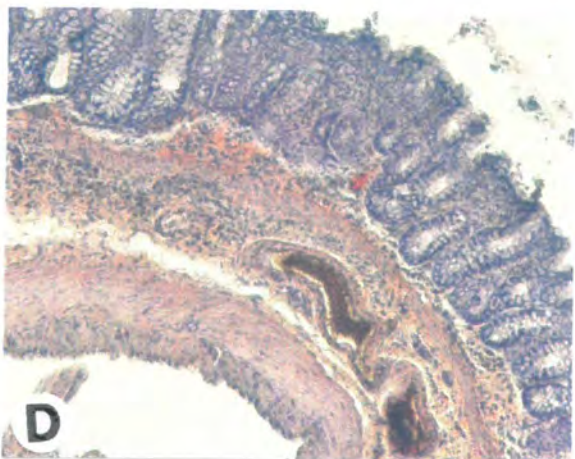
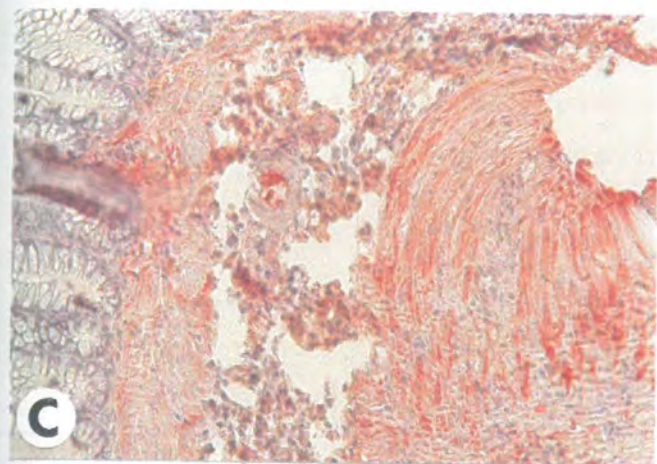
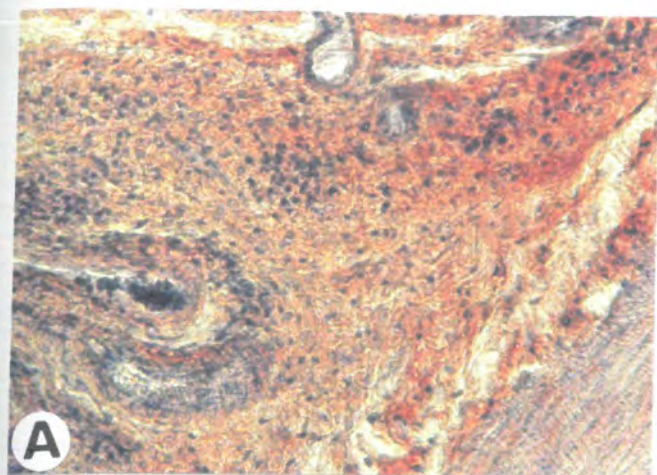
Na preparatima obojanim imunohistokemijskim postupkom detekcije BMP-7 (protutijela 3330, 718, ser 17, B12) zapaža se odsustvo reakcije.

BMP-3 pozitivno imunohistokemijsko bojanje utvrđeno je u kontrolnoj skupini životinja i to u onih gdje je došlo do spontanog oporavka nakon trasmuralne upale, potom u skupini koja je tretirana sa BMP-7 (doze 30 i 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i profilaktički). Pozitivna reakcija na BMP-3 u skupini koja je primala 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  je prikazana na slici 14. Blaga pozitivna reakcija je vidljiva i u BMP-6 tretiranih životinja (doza 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i profilaktički) i to u tunici muscularis.

**Tablica 16.** Prikaz rezultata imunohistokemijske detekcije BMP-3 u pojedinim slojevima stijenke kolona. Reakcija je kvalitativno određivana na sljedeći način: - negativna reakcija; + slaba reakcija; ++ jaka imunohistokemijska reakcija.

Skupina	Stijenka kolona		
	tunica mucosa lamina propria	lamina submucosa	tunica muscularis
Sham-kontrola	-	-	-
Kontrola	-	+	+
BMP-7 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	-	++	++
BMP-7 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	-	-	-
BMP-7 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$	++	-	++
BMP-7 profilaktički	-	++	-
BMP-6 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	-	-	-
BMP-6 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	-	-	-
BMP-6 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$	-	-	+
BMP-6 profilaktički	-	-	++





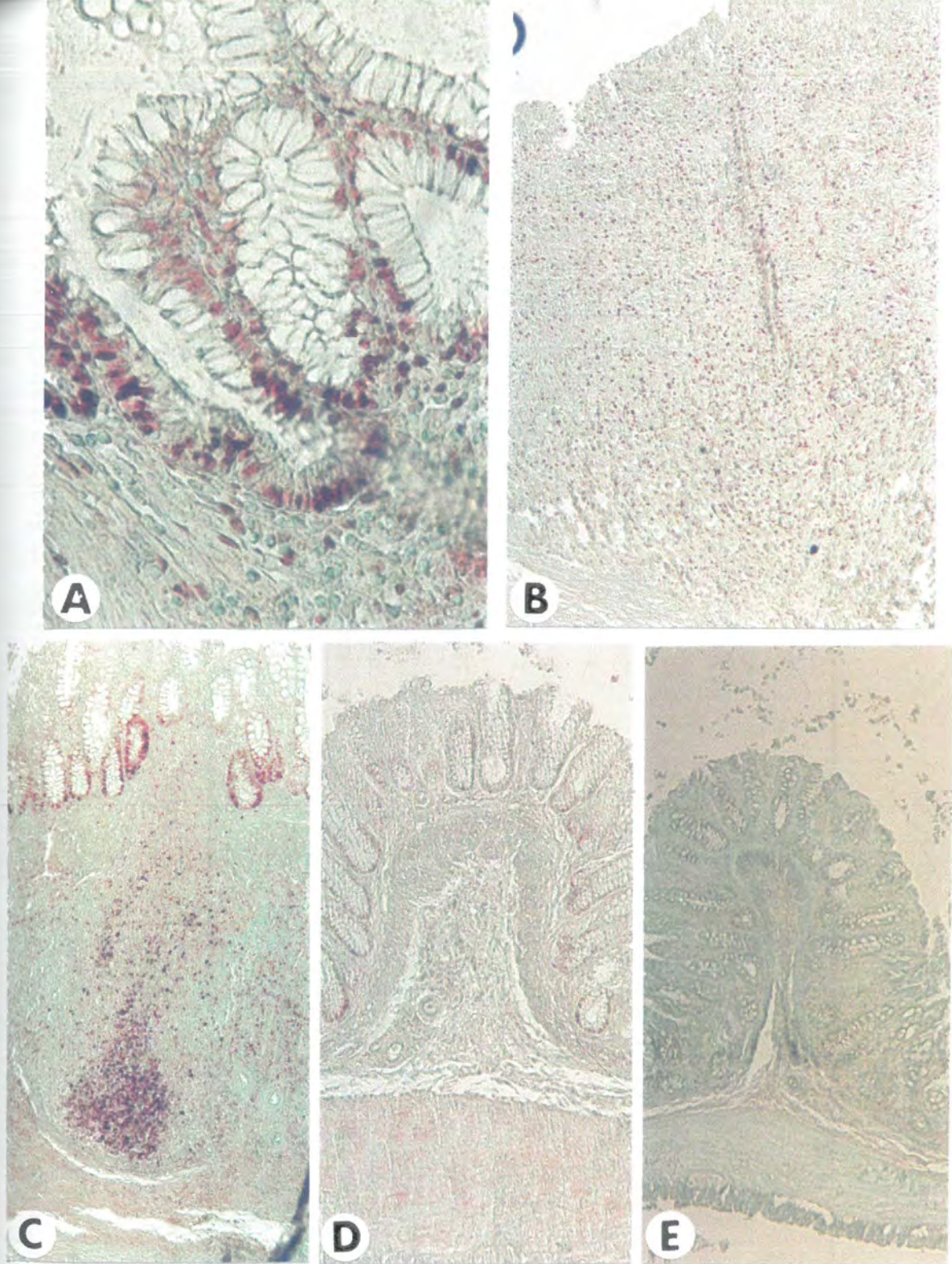
**Slika 18.** Imunohistokemijsko određivanje izražaja BMP-3 u stijenci kolona.

**A.** Kontrolna skupina: pozitivno obojenje izvanstaničnog matriksa u submukozi, x200; **B.** Kontrolna skupina: pozitivno obojenje u submukozi, x40; **C.** BMP-6 doza 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ : intenzivno obojenje glatkih mišićnih stanica; **D.** BMP-7 doza 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ : pozitivna reakcija u lamini proprii mucose i submukozi, x100; **E.** BMP-6 profilaktički: slabo pozitivno obojanje u mišićnici.

### *3.4.2. Imunohistokemijsko obilježavanje stanica u fazi proliferacije*

Učinak BMP-7 i -6 na proliferaciju stanica intermedijarnog i bazalnog dijela kripte te u stanicama submukoze je utvrđeno pomoću imunohistokemijskog obilježavanja proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Ovo protutijelo obilježava proliferirajući nuklearni antigen i pokazatelj je staničnog umnažanja. Proliferacija stanica određena sa PCNA pokazuje pojačano umnažanje stanica u bazalnog sloja kripti te u submukozi u kontrolnoj skupini. Doze BMP-7 i -6 koje se dovele do znatnog smanjenja indeksa oštećenja su znatno manje utjecale na proliferaciju. Ovi rezultati pokazuju da morfogeni proteini BMP-7 i -6 smanjuju proliferaciju stanica crijevnih kripti, s tim da BMP-7 potiče proliferaciju stanica u submukozi. Rezultati morfometrije PCNA pozitivnih stanica prikazani su u tablici 17.





**Slika 19.** PCNA pozitivne stanice u mukozi i submukozi crijeva. **A.** PCNA pozitivne stanice bazalnog sloja kripte, x400; **B.** Kontrolna skupina: povećana proliferacija stanica u području ulkusa, x40; **C.** BMP-6 100 µg/kg: proliferacija stanica u submukozi, x100; **D.** Profilaktička primjena BMP-6: slaba proliferacija stanica, x100; **E.** BMP-7 250 µg/kg: odsustvo PCNA pozitivnih stanica, x100.



**Tablica 17.** Rezultati morfometrije PCNA pozitivnih stanica tijekom eksperimentalnog kolitisa štakora. Rezultat je izražen kao postotak ukupnog broja stanica u intermedijarnom i bazalnom sloju kripte tunicae mucosae i kao ukupan broj pozitivnih stanica u lamini submucosae. \*  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu.

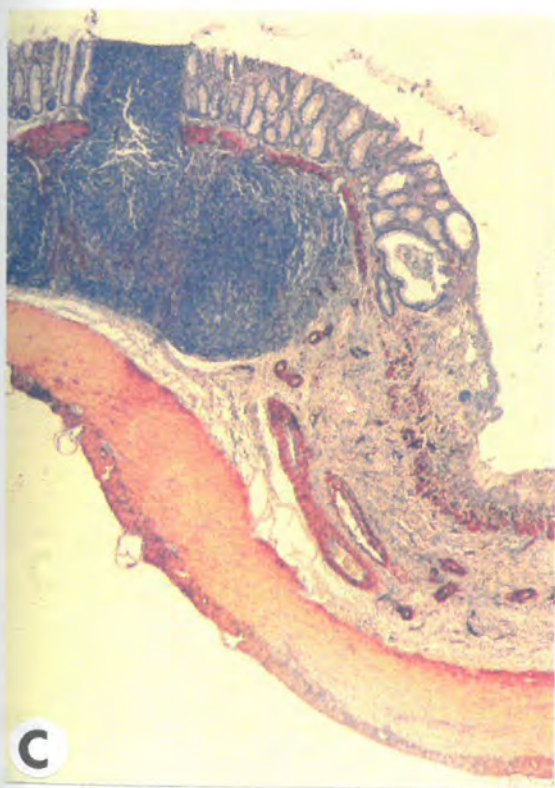
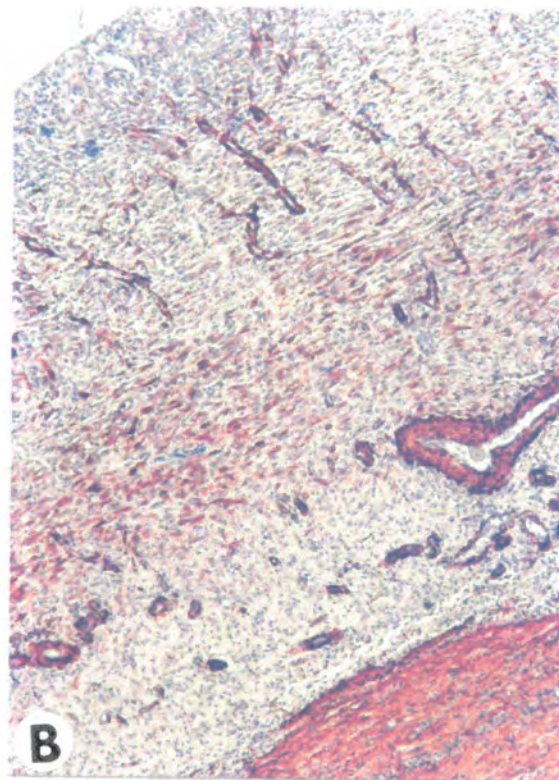
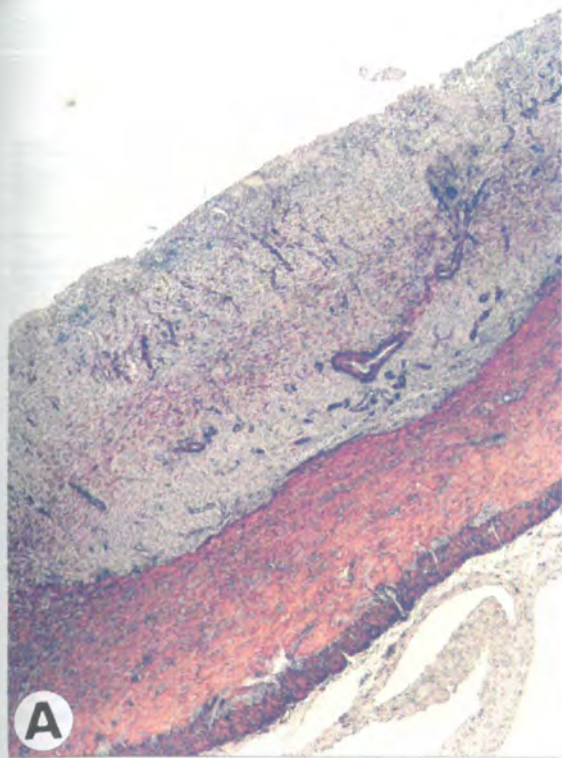
Skupine	Tunica mucosa				Lamina submucosa	
	<i>Intermedijarni sloj</i>		<i>Bazalni sloj</i>			
	Ukupan broj Izbrojane stanice	Ukupan broj Izbrojane stanice	PCNA + %	Ukupan broj Izbrojane stanice	PCNA+ %	PCNA + Izbrojane stanice
Kontrola	2470	2155	24,45 ± 3,24	315	71,5 ± 10,06	247,67 ± 41,83
BMP-7 30 µg/kg	2595	2127	32,26 ± 4,39	468	56 ± 5,33	139,17 ± 23,58
BMP-7 100 µg/kg	2632	2350	15,37 ± 0,85	285	5 ± 3,33*	122,67 ± 14,99
BMP-7 250 µg/kg	2532	2207	10,52 ± 2,35	325	2,5 ± 0,5*	145,33 ± 26,86
BMP-7 profilaktički	2412	2214	17,34 ± 2,42	288	33,38 ± 9,81	59,67 ± 13,59*
BMP-6 30 µg/kg	2696	2208	46,73 ± 8,33	488	84,55 ± 4,34	102,83 ± 38,95
BMP-6 100 µg/kg	2796	2416	20,81 ± 4,22	380	2,8 ± 8,29*	23,57 ± 2,67*
BMP-6 300 µg/kg	2536	2064	22,95 ± 4,59	472	56,26 ± 7,09	75 ± 25,4*
BMP-6 profilaktički	2705	2140	22,4 ± 4,83	565	48,7 ± 7,89	78,5 ± 10,81*

### 3.4.3. *Imunohistokemijsko određivanje $\alpha$ -aktina glatkih mišićnih stanica i vimentina*

$\alpha$ -aktin je biljeg glatke muskulature i njegova prisutnost je znak očuvanosti glatke muskulature crijeva i krvnih žila. Prisustvo pozitivne reakcije je vidljivo u svim skupinama (slika 19). U kontrolnoj skupini pozitivna reakcija je uočljiva u ulkusu, gdje se uočava proliferacija krvnih žila te dijelovi laminae muscularis mucosae (slika 19 A i B).

Vimentin je intermedijarni filament molekulske težine 52 000. On je biljeg za stanice mezenhimskog porijekla, često ograničava jezgrinu membranu, a pokazuje povezanost sa plazmatskom membranom. Danas se misli da vimentin čini mehaničku potporu jezgre. Izraženost vimentina nije postojala u kontrolnoj skupini u onim slučajevima kada je došlo do opsežnog oštećenja stijenke kolona. U nekoliko slučajeva u kontrolnoj skupini nalazimo pozitivnu reakciju na vimentin i to u području ulkusa u gdje dolazi do stvaranja granuloma (slika 20 A i B). U skupinama koje su liječene sa BMP-7 i -6 reakcija na vimentin je uočljiva u stijenkama krvnih žila submukoze, osobito uz mišićni sloj te u vezivu oko živčanih stanica plexusa myentricusa (slika 20 C i D). Primjena morfogenih proteina je očuvala krvne žile i živčane stanice stijenke kolona.

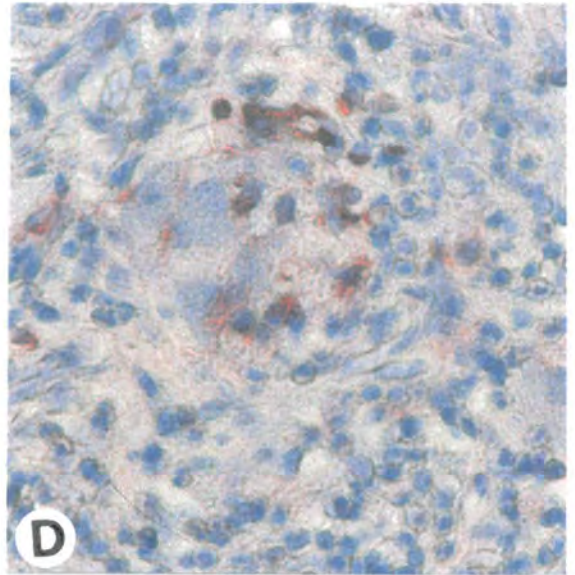
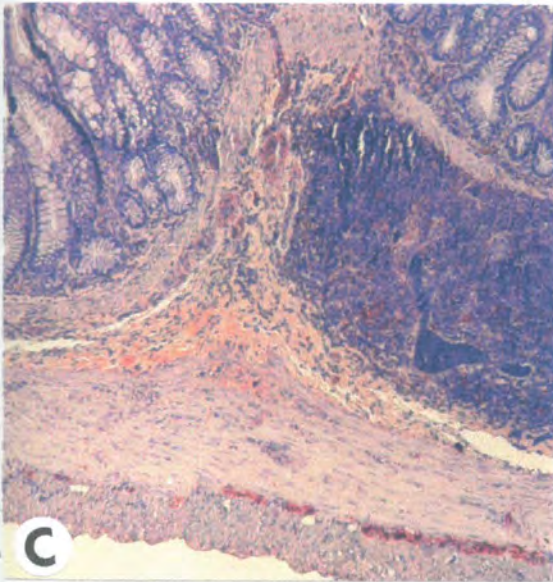
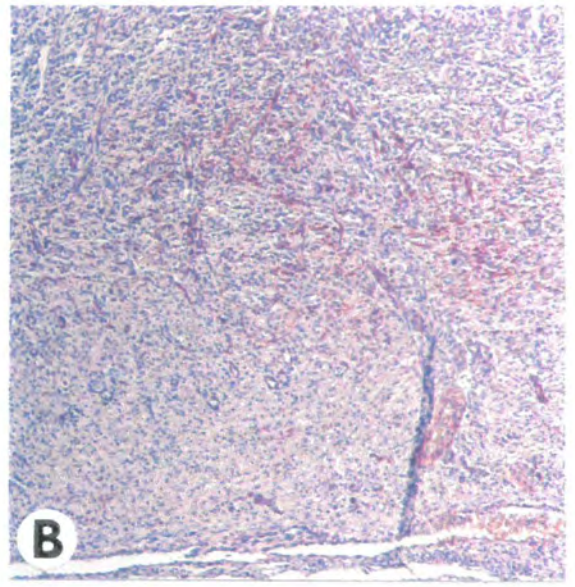
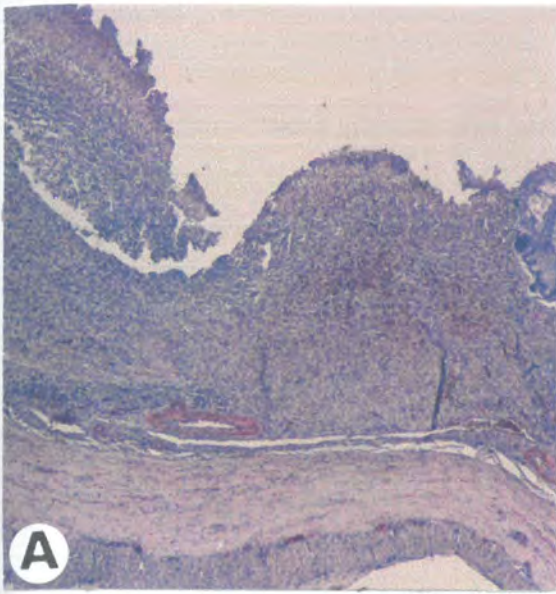




**Slika 20.** Prikaz  $\alpha$ -aktina glatkih mišićnih stanica.

**A.** U kontrolnoj skupini uočljiva je pozitivna reakcija u mišićnici i u području ulkusa gdje dolazi do urastanja krvnih žila, a vide se i ostaci laminae muscularis mucosae, x40; **B.** x100; **C.** U životinja koje su dobivale preventivno BMP-7 i **D.** BMP-6 vidi se očuvanost laminae muscularis mucosae i tunicae muscularis, x40 .





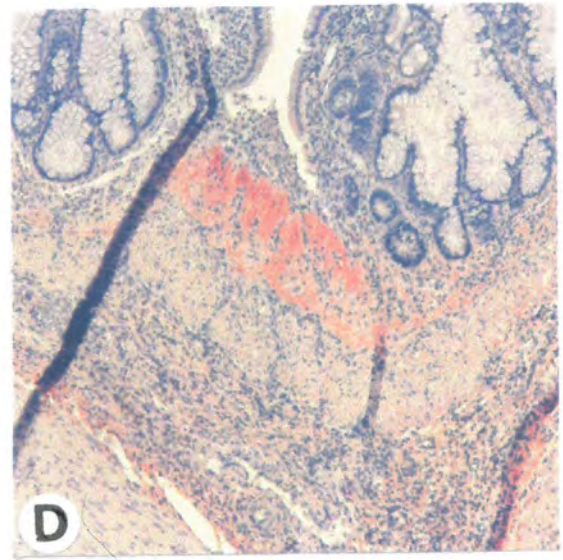
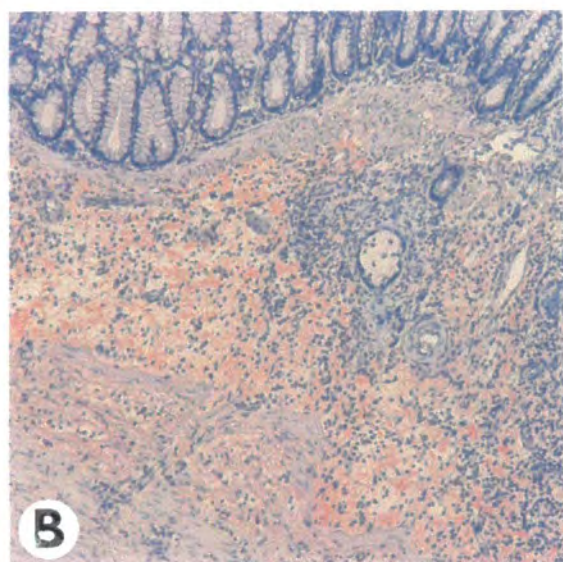
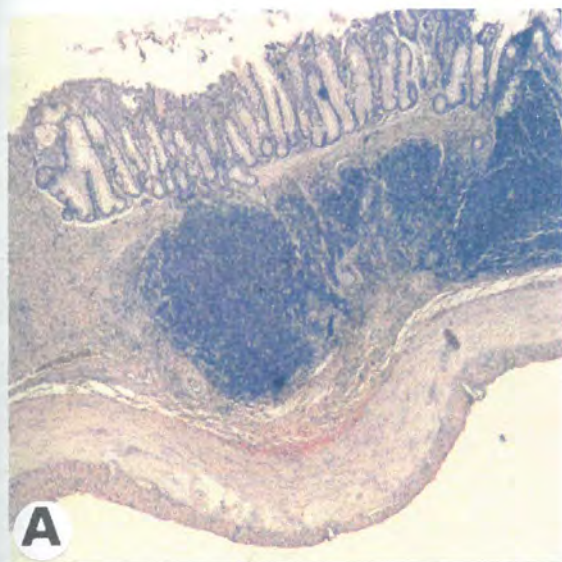
**Slika 21.** Prikaz pozitivnog bojanja na vimentin.

**A.** U području ulkusa vidljiva je pozitivna reakcija na vimentin te u krvnim žilama, x40; **B.** x100; **C.** U životinja koje su dobivale BMP-7 i -6 pozitivno bojanje je uočljivo u vezivu autonomnog ganglija kolona, x100; **D.** x 400.

#### *3.4.4. Imunohistokemijsko određivanje izražaja kolagena tipa I i III*

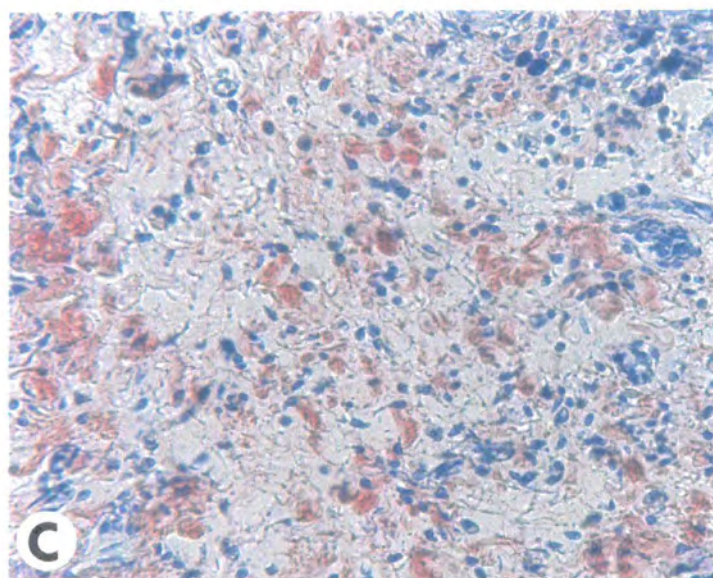
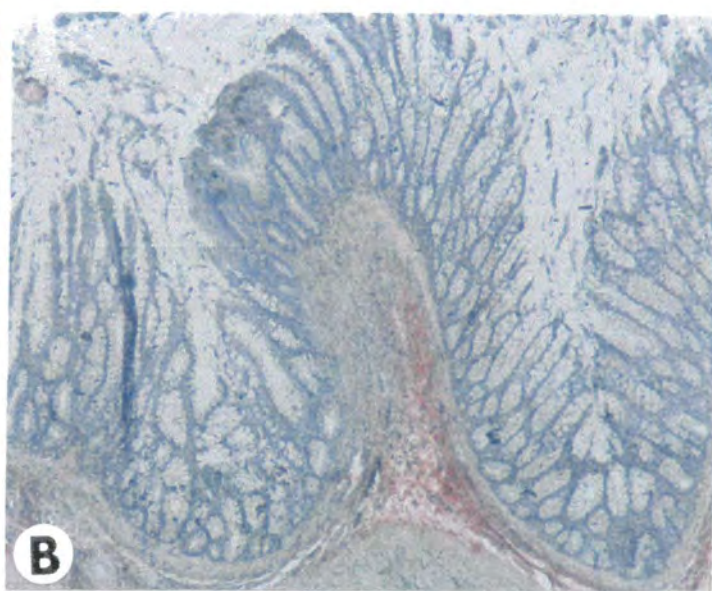
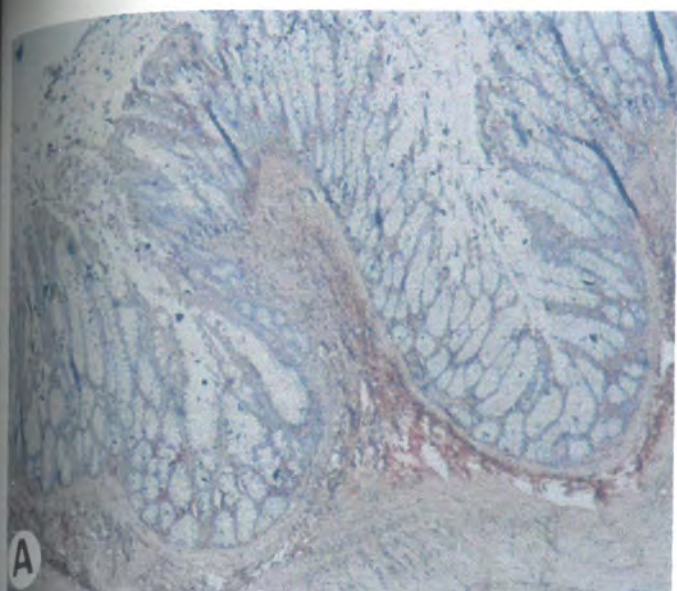
Kolagena vlakna su najrasprostranjeniji i funkcionalno najvažniji sastavni dio međustanične tvari. Kolageni tipa I i III su prisutni u mnogim tkivima, a njihov izražaj i međusobni omjer se povezuje sa suženjem crijeva koja se javlja tijekom Crohnove bolesti. Imunohistokemijskom analizom izražaja kolagena tipa I i III, utvrdili smo odsustvo izražaja kolagena tipa I svih životinja osim u one koja je liječena sa BMP-7 (doza 30 µg/kg) (slika 22 A). Nasuprot tomu, kolagen tip III je prisutan u stijenci crijeva liječenih životinja, s tim da je u kontrolnoj skupini uočljiva blaga do negativna reakcija (slika 21 A). Omjer kolagena I/III u životinja koje su liječene sa BMP-7 (doza 30 µg/kg) je bio 1,7 u korist kolagena tipa I.





**Slika 22.** Kolagen tip III pozitivno imunohistokemijsko bojanje. **A.** Kontrolna skupina: slabo pozitivna reakcija, x 40; **B.** Skupina koja je terapijski dobivala BMP-7 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ): izarazito pozitivna reakcija u submukozi, x100; **C.** Intenzivno bojanje lamine propriae i submukoze pri liječenju sa BMP-6 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), x40; **D.** x100.





**Slika 23.** **A.** Prikaz pozitivne imunohistokemijske reakcije na kolagen tip I, x40 i **B.** tip III, x40; **C.** Prikaz kolagenih vlakana u izvanstaničnom matriksu laminae propriae i submukoze, x200.

### 3.4.5. Histokemijsko određivanje nakupljanja i aktivnosti neutrofila pomoću naftol AS-D kloracetat esteraže

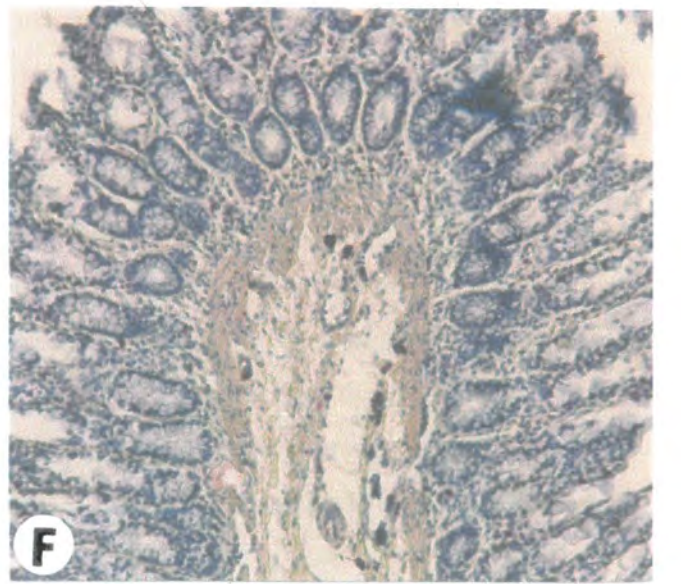
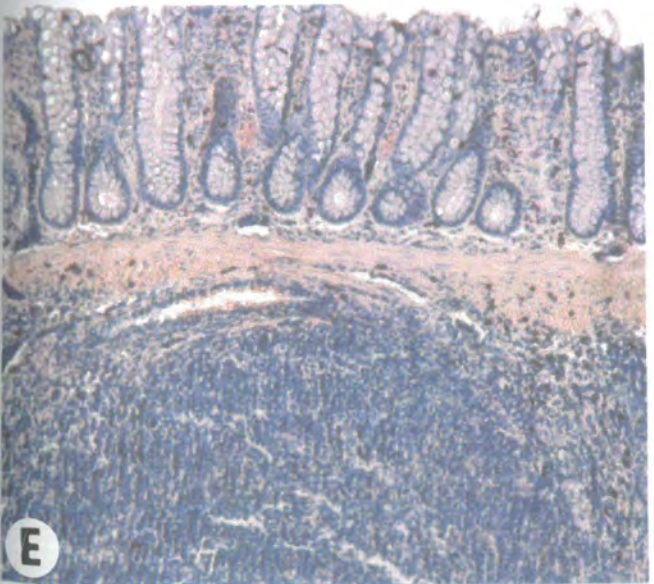
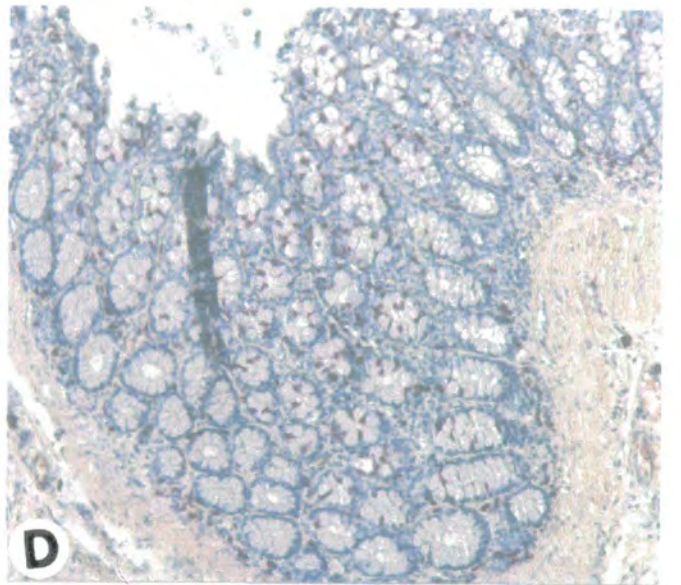
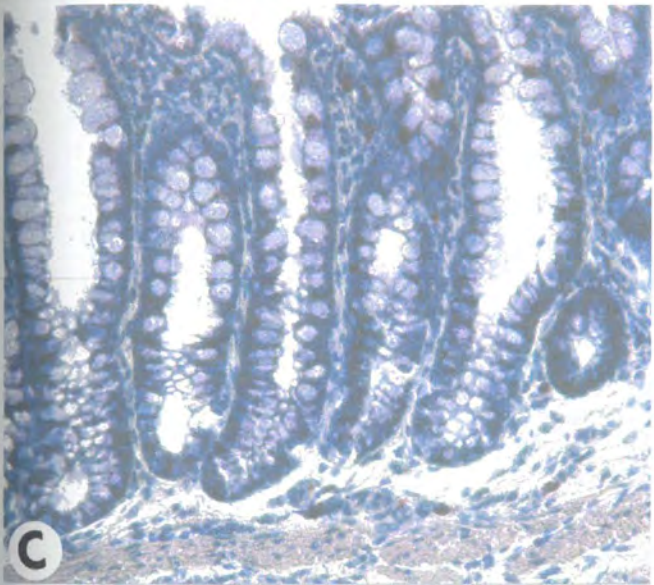
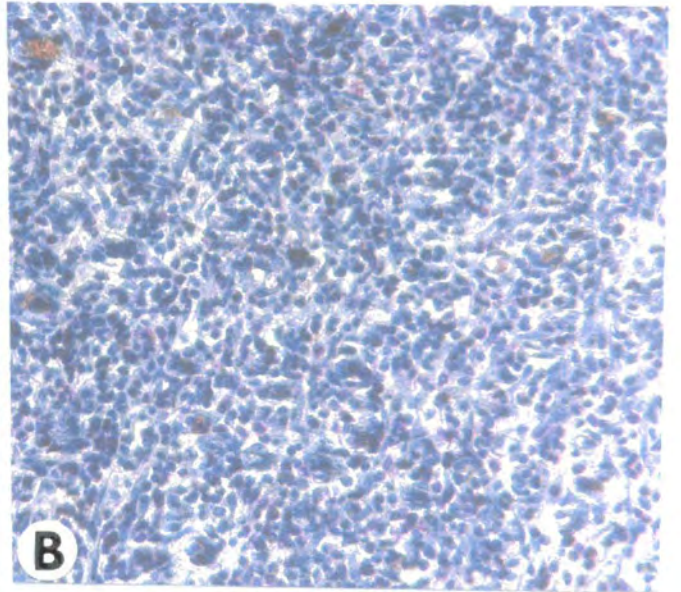
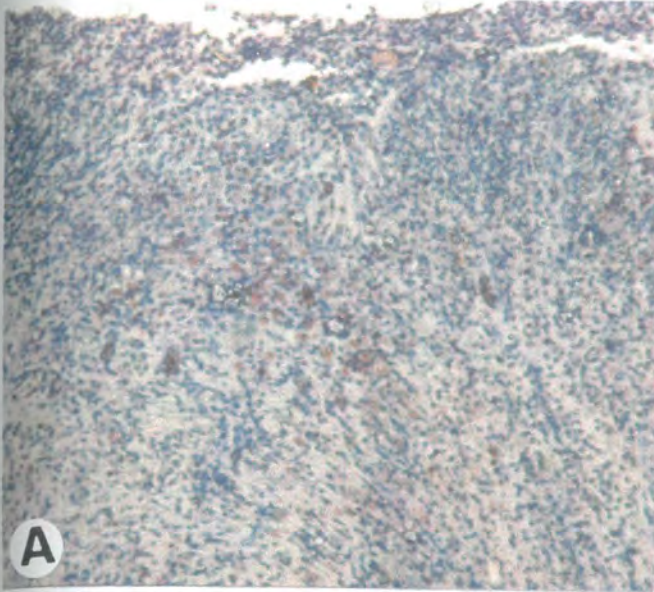
Nakupljanje neutrofila u tkivu crijeva smo odredili pomoću metode bojanja histoloških preparata sa naftol AS-D kloroacetatom. Značajno nakupljanje neutrofila smo uočili u mukozni i submukozni crijeva kontrolnih životinja. U životinja koje su u terapijskom modelu dobivale BMP-7 i -6 dolazi do značajno manjeg nakupljanja neutrofila (BMP-7 u dozi od 250 µg/kg). U profilaktičkom modelu sa BMP-7 u crijevu se uočava intenzivno nakupljanje neutrofila u tunici mucosi (slika 23). Broj neutrofila/mm<sup>2</sup> u kontrolnoj i pokusnim skupinama je prikazan u tablici 17.

**Tablica 17.** Učinak morfogenih proteina, BMP-7 i -6, na nakupljanje neutrofila. Rezultati su izraženi kao medijan/mm<sup>2</sup> površine; Mann-Whitney U-test.

Skupina	Broj stanica/mm <sup>2</sup>		p-vrijednost
	Medijan	Raspon	
Kontrola	216	(52,5 – 1250)	
BMP-7 30 µg/kg	110,4	(28,8 – 441,6)	
BMP-7 100 µg/kg	163,2	(48 – 960)	
BMP-7 250 µg/kg	79,2	(24 – 144)	* <0,05
BMP-7 profilaktički	295,2	(196,8 – 748)	
BMP-6 30 µg/kg	213,6	(148 – 312)	
BMP-6 100 µg/kg	189,6	(91,2 – 326,4)	
BMP-6 300 µg/kg	199,2	(91,2 – 350,4)	
BMP-6 profilaktički	50,4	(4,8 – 153,6)	* <0,05

**Slika 24.** Prikaz neutrofila u stijenci kolona. **A.** U kontrolnoj skupini na mjestima ulkusa dolazi do nakupljanja neutrofila, x100; **B.** x200; **C.** Terapijska primjena BMP-7 uzrokuje smanjeno nakupljanje neutrofila, x100; **D.** Preventivna primjena BMP-7 dovodi do intenzivne infiltracije neutrofila u mukozi, x100. **E.** U životinja koje su terapijski dobivale BMP-6, također je zamijećena infiltracija, x100; **F.** Životinje koje su dobivale preventivno BMP-6 pokazuju odsustvo infiltracije mukoze.







## V RASPRAVA

Naši rezultati pokazuju da intrakolična primjena haptena TNBS zajedno sa 30% etanolom ("barrier breaker") dovodi do nastanka kolitisa. Doza TNBS i koncentracija etanola je odabrana na osnovi studije Morris-a i sur. (139) te potvrđena pilot pokusom. U nekim istraživanjima koje su koristile ovaj model, rabljene su doze od 50 - 60 mg/štakoru TNBS u etanolu (oko 120-300 mg/kg) (111, 140). Prema nekim autorima (228) i našem iskustvu, ove doze izazivaju preveliko i preteško oštećenje kolona, tako da je teško procijeniti djelotvornost nekog lijeka. Ovaj pokusni model je prikladan za izučavanje patofiziologije i liječenja intestinalne upale zbog svojih svojstava. Kao prvo, upala se razvija nakon jednokratne intraluminalne primjene haptena i etanola. Nije potrebna prethodna senzibilizacija niti operativni zahvat, a ozbiljnost kolitisa se može reproducirati. Osim toga, upala prouzrokovana sa TNBS/etanolom je dugotrajna sa značajnim zadebljanjem stijenke kolona i infiltracijom, a ulceracije su prisutne najmanje 8 tjedana. Ovo je dovoljno dug vremenski period za ispitivanje uspješnosti pojedinih lijekova. Tijekom razvoja kolitisa uočava se prisutnost akutnog i kroničnog upalnog odgovora, stoga ovaj model omogućava izučavanje događaja koji su karakteristični za prijelaz akutne u kroničnu upalu. Osim toga, model je histopatološki relevantan, što znači da su prisutna neka od svojstva Crohnove bolesti u ljudi kao što je npr. transmuralna upala, postojanje sličnosti u morfologiji ulkusa, prisutnost lezija koje preskakuju i "kaldrvasti" izgled mukoze. Prisutnost histiocita i limfoidnih infiltrata te poremećaj građe kripta je također zamijećen. Smatra se da TNBS potiče kolitis na način da se kovalentno veže na E-amino grupu lizina te mijenja površne proteine stanica. Presenzibilizirani T limfociti mogu lizirati haptent-promijenjene autologne stanice (212) pod uvjetom da su životinje prethodno senzibilizirane, a ako se to ne dogodi onda makrofagi razore TNBS-promijenjene autologne stanice (100). Za pretpostaviti je da je drugi mehanizam odgovoran za razvoj kolitisa u našem izučavanju, jer životinje nismo prethodno izlagali TNBS.

Morfogeni proteini, BMP-7 i -6, prvotno izoliran iz kosti, otkriveni su u različitim epitelnim i mezenhimskim tkivima. BMP-7 je činitelj rasta koji se postnatalno u najvećoj mjeri sintetizira u bubregu, a potom se oslobađa u cirkulaciju gdje vjerojatno djeluje kao sistemski regulator (147). Usprkos nekoliko izvješća o zaštitnom djelovanju morfogenih proteina na bubrežno oštećenje (229) i hrskavicu, malo je poznato o djelovanju ovih proteina na oštećenje kolona.

U profilaktičkom pokusu, životinjama smo davali BMP-7 i -6 1,5 sat prije izazivanja kolitisa i nakon toga nastavili liječenje 1, 2, 3, 5, 10 i 14 dan. U terapijskom pokusu smo ispitali različite doze BMP-7 i -6 i to doze za BMP-7 od 30, 100 i 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a za BMP-6 od 30, 100 i 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Učinak morfogenih proteina smo procijenili pomoću makroskopskog i mikroskopskog indeksa oštećenja, morfometrijskih i imunohistokemijskih parametra, koji su nam na indirektan način bili pokazatelji oporavka crijeva.

Određivanjem makroskopskog i mikroskopskog indeksa oštećenja crijeva, pokazalo se da BMP-7 i -6 primijenjeni prije izazivanja kolitisa te nastavkom liječenja tijekom naredna dva tjedna znatno smanjuju makroskopsku nekrozu i mikroskopske ulceracije kolona (za 80%). Rezultati terapijskog pokusa su pokazali da morfogeni proteini primijenjeni nakon indukcije kolitisa tijekom dva tjedna u 70% slučajeva smanjuju makroskopske i mikroskopske promjene na crijevima. Najučinkovitije doze su 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  za BMP-7 od i za BMP-6 doza od 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Rezultati izneseni u ovom radu pokazuju da je sistemska primjena morfogenih proteina, BMP-7 i -6 učinkovita u zaštiti i terapiji upalne bolesti crijeva izazvane TNBS/etanol.

Poznato je da tijekom Crohnove bolesti u ljudi, a isto tako i u eksperimentalnom kolitisu dolazi do zadebljanja crijevne stijenke. Ovo zadebljanje je posljedica prisustva upalnog infiltrata u mukozi i submukozi, postojanja granuloma te zadebljanja laminae muscularis mucosae (139). Rezultati histomorfometrije crijevne stijenke su pokazali da tijekom profilaktičke primjene BMP-7 i terapijske primjene BMP-7 u dozi od 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ne dolazi do zadebljanja crijevne stijenke. Tijekom preventivnog i terapijskog liječenja sa BMP-6 dolazi do zadebljanja stijenke kolona ali kao posljedica zadebljanja tunicae muscularis.

Imunohistokemijskom analizom smo željeli ispitati prisustvo BMP-7 i BMP-3, tako da smo koristili monoklonska i poliklonska protutijela na BMP-7 (3330, 718, ser17, B12) i BMP-3. Nismo dobili pozitivnu reakciju sa antiBMP-7 protutijelima. Za pretpostaviti je da anti-BMP-7 protutijelo koje reagira na humanu sekvencu BMP-7 ne reagira na štakorsku sekvencu ili razlog može biti u tome da tijekom liječenja sa morfogenim proteinima smo suprimirali izražaj ovog proteina u crijevu. BMP-3 pozitivno imunohistokemijsko bojanje je uočeno u tunici mucosi (lamina propria), lamini submucosi i u tunici muscularis. Pozitivna reakcija je prisutna u skupinama koje su se bolje oporavljale nakon kolitisa. BMP-3 je bio pozitivan i u kontrolnoj skupini i to u onih gdje nije zabilježeno opsežno oštećenje crijevne stijenke. Premda su Vukičević i sur. pokazali da se BMP-3 ispoljava u epitelu crijeva tijekom razvoja (8 i



14 mjesec) nismo uočili pozitivno imunohistokemijsko obojenje u epitelu. Vjerojatno je tijekom kolitisa došlo do ozljede površnog epitela pa su funkciju oporavka preuzele stanice nižih slojeva stijenke crijeva.

Ispitivanja stanične proliferacije kontrolne i pokusnih skupina su pokazale izrazitu proliferaciju u kontrolnoj skupini. Najintenzivnija proliferacija je u bazalnim stanicama žlijezdanih kripti te u submukozi. Manji stupanj proliferacije je zamijećen u površnom, epitelnom te intramedijarnom sloju. Proliferacija je slabijeg intenziteta u pokusnim skupinama i to što je doza učinkovitija, proliferacija je manja. Tako da pri dozama BMP-7 od 250 i 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  je proliferacija je izrazito smanjena u mukozi, ali je prisutna u submukozi. U terapijskom pokusu sa BMP-6 pri dozi od 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  proliferacija stanica je smanjena i mukozi i submukozi. Za morfogene proteine, BMP-7 i -6 je poznato da potiču proliferaciju i diferencijaciju stanica pa je za pretpostaviti da je 14. dan nakon izazivanja kolitisa oporavak završen, a proliferacija smanjena. Osim toga, za TGF $\beta$  je pokazano da smanjenje proliferacije stanica, a ipak s druge strane imaju važnu ulogu u regulaciji oporavka i regeneracije nakon tkivne ozljede (9). Morfogeni proteini su članovi TGF- $\beta$  nadobitelji i možda imaju neka zajednička svojstva te regeneraciju odnosno zaštitu vrše nekim drugim mehanizmima.

$\alpha$ -aktin glatkih mišićnih stanica je izrazito pozitivan u stijenci kolona jer reagira sa glatkim mišićnim stanicama tunicae muscularis, lamina muscularis mucosae kao i mišićnim stanicama prisutnim u krvnim žilama. U kontrolnoj skupini na mjestu ulkusa prisutna je izrazita proliferacija krvnih žila tako da je i ovaj protein izrazito pozitivan. Pozitivno obojenje na vimentin je još jedan znak regeneracije tkiva. U pokusnim skupinama gdje je došlo do opsežnih oštećenja stijenke kolona utvrđeno je odsustvo reakcije na ovaj protein. U skupinama u kojima je opsežna regeneracija reakcija je izrazito pozitivna, a pozitivno bojanje na vimentin je prisutano u tunici muscularis između longitudinalnog i cirkularnog sloja, zatim stijenkama krvnih žila submukoze te u vezivu oko živčanih stanica plexusa myentericus. Davanje morfogenih proteina je očuvalo glatke mišićne stanice krvnih žila i stijenke kolona.

Od 18 vrsta kolagena koji su do danas otkriveni, u crijevu odrasle osobe se nalaze kolageni tipa I, II i III, zatim tip IV koji stvaraju epitelne i endotelne stanice te čini bazalnu membranu i kolagen tip V tzv. pericelularni kolagen kojeg stvaraju glatke mišićne stanice ali i drugi stanični tipovi (62). Građa i funkcija crijeva je velikim dijelom određena količinom, rasporedom, organizacijom i tipovima kolagena prisutnih u izvanstaničnom matriksu. Tako u zdravom crijevu prevladajući kolagen je tipa I, zatim tip III i V. Matriks građen od ovih specifičnih

tipova kolagena predstavlja preduvjet za normalnu kontrakciju mišića te rast i oporavak tkiva. U crijevu fetusa komponente matriksa sudjeluju u organogenezi djelovanjem na migraciju stanica, pričvršćivanje i diferencijaciju te predstavlja rezervoar činitelja rasta. Regulacija sinteze činitelja rasta u crijevu čovjeka je najviše izučavana u odraslim glatkim mišićnim stanicama. Glatke mišićne stanice izolirane iz humanog fetalnog crijeva luče TGF- $\beta$  (154). TGF- $\beta$  se ispoljava u muskulaturi tijekom razvoja crijeva uključujući cirkularni, longitudinalni sloj te vaskularni i laminu muscularis mucosae. Sastav kolagena znatno utiče na biomehanička i biokemijska svojstva stijenke crijeva tijekom razvoja. Valjana kontrakcija i popustljivost crijeva ovisi o specifičnom rasporedu i udjelu kolagenih vlakana. Remodeliranje tkiva i upalni odgovor također mogu biti zahvaćeni. Količina i tip kolagena može utjecati na glatke mišićne stanice, upalne stanice i epitelne stanice u stijenci crijeva na taj način da djeluju na migraciju, proliferaciju i diferencijaciju stanica. Ovi stanični događaji usmjeravaju normalni ili abnormalni razvoj, postnatalno cijeljenje i rast. Poremećaj odnosa pojedinih tipova kolagena dovodi do strukturnih i funkcionalnih poremećaja organa. Stvaranje striktura je uobičajena pojava u Crohnoj bolesti. Suženje lumena crijeva dovodi do djelimične ili potpune obstrukcije crijeva što onda dovodi do kronične anoreksije, malnutricije, gubitka tjelesne težine. Graham i suradnici (62) su pokazali da crijevne strikture u Crohnoj bolesti su posljedica akumulacije kolagena, proliferacije glatkih mišićnih stanica i povećanje količine kolagena tipa V, kojeg stvaraju glatke mišićne stanice. S obzirom na naše rezultate možemo reći da se djelovanjem BMP-7 i -6 povećano stvara kolagen ali kolagen tipa III u većim količinama nego kolagen tipa I. Kako je kolagen tipa I kolagen ožiljkastog tkiva, možemo reći da morfogeni proteini dovode do neožiljkastog cijeljenja ozljede tijekom upalne bolesti crijeva.

Tijekom upalne bolesti crijeva povećan je broj neutrofila koji su znak postojanja upale, a određivanje njihovog broja po  $\text{mm}^2$  koristi se za utvrđivanje postojanja i veličine upale tijekom eksperimentalnog kolitisa. Broj neutrofila u skupini koja je liječena sa BMP-7 (doza 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) je značajno smanjen. Također smanjen broj neutrofila smo utvrdili i kod preventivnog davanja BMP-6. Smanjenje broja neutrofila bi se moglo interpretirati kao protuupalno djelovanje nekog preparata. Vukičević i suradnici (229) su pokazali da BMP-7 inhibira inflamatorne citokine (IL-1 i TNF- $\alpha$ ), a poznato je da su to glavni citokini tijekom razvoja upale crijeva, možda je to još jedan od načina djelovanja ovih morfogenih proteina. Povećan broj neutrofila je utvrđen tijekom preventivnog davanja BMP-7 moglo bi se objasniti da nakon preventivnog davanja BMP-7 djeluje slično kao EGF i to zadržavanjem upalnih stanica a ne na novčenje upalnih stnica (161).



Za različite činitelje rasta je pokazano da djeluju na cijeljenje ozljede u različitim pokusnim modelima. Spektar bioloških aktivnosti koji se pripisuju činiteljima rasta uključuju mitogenična i kemotaktička svojstva, mogućnost oslobađanja citokina, poticanje angiogeneze i stimuliranje stvaranja izvanstaničnog matriksa (257). Smatra se da mjesto izražaja činitelja rasta predstavlja također imjesto gdje se on stvara i luči te djeluje na okolne stanice na parakrini način. Nedavna istraživanja su pokazala djelovanje morfogenih proteina u oporavku vanskeletnih tkiva (39, 229). Premda su koštani morfogeni proteini prvotno izolirani iz kosti njihova uloga u izvanskeletnim tkivima se istražuje. Izražaj receptora za BMP-7 i -6 te mRNA za ove proteine je nedavno utvrđena duž cijelog gastrointestinalnog sustava (42). Uloga BMP-7 i -6 kao endogenih medijatora rasta i diferencijacije probavnog sustava je potvrđena izoliranjem mRNA za morfogene proteine i njihovih receptora u tankom i debelom crijevu (42, 74, 231).

Pokazano je da mišji epitel crijeva ispoljava receptore za BMP-7 tijekom razvoja i to ALK-6 samo u epitelu, a ALK-3 u mezenhimu i epitelu (42), a izražaj proteina u gastrointestinalnoj mukozu je utvrđen između 6-14 tjedna (74). Moguće je da BMP-7 kao morfogeni protein koji je prisutan tijekom razvoja crijeva, možda potiče migraciju, rast i diferencijaciju stanica epitela i submukoze nakon upalnog oštećenja. Mehanizam ovog djelovanja nije u potpunosti jasan.

BMP-7 i -6 kao članovi TGF- $\beta$  nadobitelji pokazuju brojne funkcionalne aktivnosti koje bi mogle imati utjecaja u upalnoj bolesti crijeva, tako da bi im uloga mogla biti raznolika. Za BMP-7 je pokazano da djeluje citoprotektivno u bubrezima što znači da umanjuje promjene uzrokovane upalnim citokinima (229). Poznato je da su citokini važni medijatori infekcije i upalne reakcije i da većina djeluje lokalno, ali neki od klinički važnih citokina djeluju sistemski kao pleotropni hormoni. Citoprotektivno djelovanje BMP-7 se odlikuje smanjenjem stvaranja I-CAM.a molekula te smanjenjem nakupljanja neutrofila (229). U našem istraživanju imunohistokemijski određena proliferacija epitelnih stanica je pokazala smanjenje proliferacije. Za BMP-7 je pokazano da inhibira staničnu proliferaciju i potiče diferencijaciju stanica u osteosarkomu i astrocitu, a za TGF- $\beta$  da inhibira proliferaciju intestinalnih epitelnih stanica, procesa koji možda inhibira reepitelizaciju nakon površne ozljede (154). Ipak, paradoksalno je da TGF- $\beta$  pored toga ipak potiče cijeljenje stimulirajući migraciju epitelnih stanica na ozlijeđenim površinama. Nedavna istraživanja na štakorskim epitelijalnim stanicama crijeva (IEC-6 stanična linija), pokazala su da TGF- $\beta$  potiče cijeljenje oštećenog sloja usprkos inhibiciji stanične proliferacije (29). Sličnu funkciju bi mogao imati i BMP-7 i -6.



Sistemska primjena činitelja rasta kao što su EGF (161) i KGF (257) u eksperimentalnom kolitisu smanjuju oštećenje. Autori su pokazali da ovi činitelji djeluje preko različitih mehanizama. EGF primijenjen prije indukcije kolitisa dovodi do povećane zaštite mukoze te rezultira smanjenim oštećenjem tkiva nakon indukcije kolitisa. EGF djelotvorno reducira oštećenje mukoze kada se injicira prije indukcije kolitisa ali ne izaziva redukciju ako se primijeni nakon kolitisa. Ovo protektivno djelovanje EGF rezultira smanjenjem upalne infiltracije stanicama što je potvrđeno smanjenjem MPO aktivnosti. Pretpostavlja se da je redukcija upale sluznice posredovana mitogenim svojstvima EGF i poticanjem reepitelizacije EGF djeluje na protektivan način, a ne preko ubrzavanja cijeljenja. Keratinocitni činitelj rasta, KGF ukoliko se primijeni prije indukcije kolitisa ne smanjuje veličinu ili ozbiljnost oštećenja mukoze. To je u suprotnosti sa ranijim istraživanjima sa EGF. Kako KGF nema učinka na MPO aktivnost, čini se da KGF posreduje svoje djelovanje u eksperimentalnom kolitisu pomoću mehanizama koji su drugačiji od novačenja upalnih stanica i stvaranja upalnog infiltrata. Ovi nalazi ukazuju da EGF i KGF djeluju različitim mehanizama koji ublažavaju oštećenje tkiva u TNBS/etanol modelu kolitisa. iako još nijw u potpunosti jasano koji od mehanizama je odgovoran za smanjenje oštećenja mukoze u KGF-liječenih životinj, poznato je da KGF potiče proliferaciju epitela kolona i stvaranje mucina.

Za TGF- $\beta$  je pokazano dovodi do inhibicije proliferacije stanične linije epitelnih stanica crijeva – IEC-6 (29). Usprkos ovom svojstvu, paradoksalno je da TGF- $\beta$  ima centralnu ulogu u poticanju snažne re-epitelizacije nakon oštećenja mukoze u modelu rane in vitro. U stanicama laminae propriae, TGF- $\beta$  ima snažan učinak na promjenu izotipa B limfocita, aktivaciju i način ekspresije citokina u T limfocitima i makrofagima kao i djelovanje na druge stanice (234). Osim toga, TGF- $\beta$  ima snažno djelovanje na kemotaktičku aktivnost neutrofila uporabom mehanizama istiskivanja drugih kemotaktičkih činitelja (169). Čini se da TGF- $\beta$  djeluje na neke stanice i stanične procese koji mogu biti važni u patogenezi IBD. Ovo uključuje epitelni odgovor na ozljedu, aktivacija i modulacija različitih staničnih populacija laminae propriae i vojačenju stanica na mjesto aktivnosti bolesti. Graham i sur. (62) su pokazali da TGF- $\beta$  potiče odlaganje kolagena u izoliranim stanicama glatke muskulature ukazujući da ovi činitelji imaju značajnu ulogu u stvaranju fibroze i striktura u CD. McCabe i sur. (133) su pokazali povećanje sadržaja TGF- $\beta$  mRNA u mukozi bolesnika sa IBD i to u lamini proprii uz lumen crijeva. Međutim, opsežna istraživanja o ekspresiji ovih činitelja u mukozi u kontekstu IBD nije poduzeta. Za TGF- $\beta$  je poznato da inhibira proliferaciju

epitelnih stanica, procesu koji možda inhibira reepitelizaciju nakon površne ozljede. Ipak, paradoksalno je da TGF- $\beta$  usprkos tomu potiče cijeljenje stimulirajući migraciju epitelnih stanica na površini ozljede. Nedavna istraživanja uporabom štakorske intestinalne epitelne stanične linije IEC-6 su pokazala napredovanje cijeljenja ozlijeđenog monosloja usprkos inhibiciji stanične proliferacije (29). Prisustvo visoke razine mRNA za TGF- $\beta$  u stanicama laminae propriae blizu površnog epitela ukazuje da TGF- $\beta$  ima zaista značajnu ulogu u poticanju cijeljenja epitela povećanjem procesa oporavka koji služi za uspostavljanje površnog kontinuiteta nakon oštećenja mukoze (3). TGF- $\beta$ 1 se oslobađa na mjestu ozljede čišćenjem pomoću proteinskog nosača i ulazi u sistemsku cirkulaciju kao inaktivni kompleks sa specifičnim  $\alpha$ 2-makroglobulinom (140). Povećanje razine TGF- $\beta$ 1 u cirkulaciji djeluje na povećanu ekspresiju ovog gena na mjestu ozljede. Osim toga, Mourelle i sur. (140) su pokazali da povećanje razine TGF- $\beta$ 1 u kolonu je povezano sa povećanjem odlaganja kolagena, pa je za pretpostaviti da povećane razine TGF- $\beta$ 1 u kolonu mogu biti razlog pojave intestinalnih ožiljaka.

U posljednjih nekoliko desetljeća provedena su opsežna istraživanja etiologije i patofiziologije Crohnove bolesti koja su dovela do razvoja brojnih terapijskih protikola, kako eksperimentalnih tako i onih koji se provode u kliničkoj praksi. Neka se istraživanja svojim značenjem izdvajaju iz čitavog niza terapijskih pokušaja, jer njihovi rezultati obećavaju značajan napredak u liječenju upalne bolesti crijeva. Ciljevi terapije Crohnove bolesti je suprimirati upalu i smanjiti imunološki-posredovano oštećenje tkiva, odabrati odgovarajuću prehranu i uspostaviti normalan život bolesnika. Što se tiče farmakološke terapije Crohnove bolesti definirane su četiri osnovne skupine lijekova: kortikosteroidi, aminosalicilati, imunosupresivi i antibiotici. U zaštiti od imunološki posredovanog oštećenja crijeva i u obnovi njegove funkcije i strukture, dokazana je značajna uloga brojnih činitelja rasta, ali tek će klinička istraživanja pokazati koji će se predloženi terapijski protokoli pokazati nedjelotvornima, a koji će uz moguće preinake unaprijediti život bolesnika sa Crohnovom bolesti. Svaki detalj u mozaiku patofizioloških zbivanja uključenih u nastanak i razvoj kolitisa, korak je dalje prema otkrivanju terapijskog sredstva za liječenje upalne bolesti crijeva. Naši rezultati pokazuju da morfogeni proteini, BMP-7 i -6 koji su izolirani iz kosti dovode do poboljšanja sistemskih i lokalnih promjena tijekom TNBS/etanol kolitisa u životinja. Iako uloga ovih citokina u upali crijeva nije poznata, pozitivan učinak morfogenih proteina na

strukturu i funkciju crijeva tijekom eksperimentalnog kolitisa predstavljati osnovu za razvitak novih terapijskih protokola s kojima će se učinkovitije liječiti upalna bolest crijeva.



## VI ZAKLJUČCI

Model Crohnove bolesti izveli smo na štakorima jednokratnom, intraluminalnom primjenom haptena 2,4,6-trinitrobenzensulfonične kiseline (TNBS) otopljenog u etanolu. Ovaj model ima neka svojstva Crohnove bolesti (transmuralni oblik upale, pojava ulceracija koje preskakuju i tzv. "kaldrimesti" izgled sluznice). Osim toga, pogodan je za izučavanje djelovanja različitih preparata na tijek i cijeljenje patohistoloških promjena na crijevima tijekom upalne bolesti crijeva.

Rezultati u ovom radu pokazuju da morfogeni proteini, BMP-7 i -6, ako se daju životinjama sustavno imaju sljedeća djelovanja na eksperimentalni kolitis:

1. Profilaktička i terapijska primjena morfogenih proteina, BMP-7 i -6 smanjuje oštećenje crijeva budući da smanjuje makroskopski i mikroskopski indeks oštećenja crijeva.

2. Najučinkovitiji protein je BMP-7 u dozi od 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a to se vidi na temelju sljedećih parametara: makroskopskog i mikroskopskog indeksa oštećenja, ukupne debljine kolona i debljine mukoze, proliferacije stanica i nakupljanja neutrofila.

3. Povoljno djelovanje na oštećenje kolona imala je preventivna primjena BMP-7 i -6 te terapijska primjena BMP-6 u dozi od 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

4. BMP-7 smanjuje proliferaciju stanica u mukozii, a povećava u submukozii 14. dana nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa. To se vidi na temelju manjeg postotka PCNA pozitivnih stanica u bazalnom sloju kripti kolona, a povećanom broju u submukozii.

5. BMP-7 smanjuje upalu u crijevu što je vidljivo smanjenjem nakupljanja neutrofila u stijenci kolona.

6. BMP-7 i -6 čuvaju cjelovitost glatkih mišićnih stanica krvnih žila, laminae muscularis mucosae i tunicae muscularis jer je u životinja koje su dobivale ove proteine bila očuvan izražaj  $\alpha$ -aktina glatkih mišićnih stanica i vimentina.

**Prilog 1.** Lista preparata koji su rabljeni u liječenju eksperimentalnog kolitisa.

Terapijski agens	Doza	Način izazivanja kolitisa	Djelovanje
Vektor ekspresije koji sadrži TGF- $\beta$ 1cDNA (pRSVP2) (59)	3. i 10. dan 200 $\mu$ g TGF- $\mu$ 1DNA plazmida i.m.; injicira se u 8 mjesta na butinama (100 $\mu$ l/po mjestu)	TNBS	suprimira imuni odgovor na strane proteinske antigene; djeluje učinkovito na eksperimentalni kolitis
rhIL-1ra (antagonist interleukin-1 receptora) (134)	<i>akutna faza:</i> 8mg/kg sc. i 2 mg/kg iv.prije kolitisa; 8mg/kg sc. 4h i 10 h nakon kolitisa; potom slijedeća 24h svakih 8 h (8 mg/kg) i potom svakih 12h do žrtvovanja 3. dana nakon izazivanja kolitisa; <i>kronična faza:</i> 8 mg/kg sc. svakih 12 h s početkom 8. dana nakon kolitisa; nastavlja se do 15. dana kada su životinje žrtvovane	TNBS PG-APS	ublažava simptome akutnog i kroničnog enterokolitisa, ↓adhezije i artritis
Pektinom-obogaćena prehrana (125)	intragastrična infuzija 1% pektin-obogaćene hrane	metatreksat	ubrzava oporavak crijeva; ↓ oštećenje crijeva, poboljšava integritet crijeva
Odstranjivač slobodnih radikala: TEMPOL, ketotifen, L-NAME, apocinin (163)	TEMPOL (50 $\mu$ g/kg), ketotifen (200 $\mu$ g/kg), L-NAME (0.1mg/ml), apocinin (120 $\mu$ g/ml)	2% jodoacetamid	ketotifen and apocinin značajno ↓ veličinu ozljede; TEMPOL i L-NAME ne djeluju zaštitno za crijeva
Misoprostol (analog prostaglandina E1) (51, 218)	100 $\mu$ g/kg intraluminalno	4% octena kiselina	djeluje zaštitno na mukozu crijeva

16,16-dimetil prostaglandin E2 (egzogeni prostaglandin) (1, 242)	20 mg/kg dmpPGE2 (pretretman i tretman)	imuni kolitis	pretretman: ↓indeks upale, MPO, stvaranje LTB4; tretman: ↓indeks upale, prevenira razvoj makroskopskih promjena crijeva koje se javljaju 3 tjedna nakon kolitisa, manje učinkovit od pretretmana
	pretretmant: 0.2µg/kg, 20µg/kg intrarektalno	30% etanol	0.2 µg/kg - ↓makroskopski vidljiva oštećenja; veće doze (20µg/kg) –štite epitel kolona od djelovanja etanola, ↓histološke znakove oštećenja
L-NAME (162)	0.1 mg/mL u pijećoj vodi	3% jodoacetamid	djeluje zaštitno
Antibiotici (57)	Paromomicin (5mg intragastrično) Nivemicin (15 mg) – počevši od 5 dana nakon kolitisa potom 2 puta dnevno do 8 dana;	TNBS	Paromomicin –značajno ↓ koncentraciju sistemskim endotoksina; Nivemicin – nema učinka
	Aerosporin (250 i.u.); Taurolin (35 mg); Flagyl (7.5 mg metronidazole) – 8 dana nakon kolitisa i.v. injekcija	TNBS	Taurolin - značajno ↓ koncentraciju sistemskih endotoksina; Aerosporin i Flagyl – neučinkoviti
Zileuton (inhibitor 5-lipoksigenaze) (10)	50 mg/kg	TNBS	poboljšava tijek bolesti: ↑ stvaranje PGE2 i inhibira sintezu LTB4
Butirat (37)	40 mmol/L natrij butirata dva puta dnevno tijekom 2 tjedna; intraluminalna primjena	TNBS	↑ transglutaminaznu aktivnost; ublažava kolitis, ↓histološku aktivnost
Butirat klizma (17)	100 m		
Butirat i Mezalamin (37)	40 mmol/L butirata i 25 mg/kg mezalamina	TNBS	↓razinu TXB2, ↑razinu transglutaminaze u serumu, ↑cijeljenje ulkusa kolona
Faktor XIII (37)	i.v. 80 U/kg tijekom 10 dana	TNBS	poboljšava histološku sliku



Epidermalni činitelj rasta (161)	ip.600 µg/kg EGF jedan sat prije kolitisa te 1x dnevno tijekom pokusa (žrtvovanje 8h, 48h, 7 dana nakon kolitisa)	TNBS	↓oštećenje mukoze i upalu
L651,392 (inhibitor 5-lipoksigenaze -↓sintezu LB4) (241)	10 mg/kg pet puta: 2h prije, 22, 46, 70 i 94h nakon kolitisa; intrarektalno	TNBS	↓sintezu LTB4, indeks oštećenje kolona, težinu kolona; 2 tjedna nakon izazivanja kolitisa- ↓oštećenje kolona i upalu
Hormon rasta - rGH; Norditropin (28)	1.0 mg/kg sc.u zatiljak 2x dnevno, nastaviti 4. ili 7. dana	TNBS	4. dana- ↓upalu kolona, ↓ makroskopski i mikroskopski indeks oštećenja, 7. dana- vraćanje tj. težine na normalu
Keratinocitni činitelj rasta (KGF) (257)	5 mg/kg i.p., 24h i 1h prije kolitisa; životinje su žrtvovane 8h i 1 tjedan nakon izazivanja kolitisa	TNBS	nema učinka
	24h nakon kolitisa u dozama 5, 1 and 0.1 mg/kg i.p. koje su se nastavile primijenjivati 1x dnevno tijekom 1 tjedna	TNBS	značajno umanjuje oštećenje tkiva; doze od 1 i 5 µg/kg umanjuju makroskopske nekroze i mikroskopske ulceracije za 40-50%
Inhibitor ciklooksigenase -2 (170)	NSAID: Diklofenak (10 mg/kg); Naproxen (5 mg/kg) 2x dnevno	TNBS	inhibira COX-1 i COX-2; egzacerbacija kolitisa sa pojavom perforacije; ↑mortaliteta (86%)
	Nabumetone (25 ili 75 mg/kg), etodolak (10 ili 50 mg/kg), L745,337 (1 ili 5 mg/kg)	TNBS	selectivni inhibitori COX-2 preko CPX-1; L745,337-snažni inhibitor COX-2; egzacerbacija kolitisa sa pojavom perforacije; stopa smrtnosti 100%
CGP 47969A (inhibitor sinteze proinflamatornih citokina) (23)	30, 10 ili 3 mg/kg 2h prije kolitisa te 2x dnevno do žrtvovanja 48h nakon kolitisa	imuni kolitis u kunića	doza od 10 mg/kg: ↓ak. indeks upale za 58%, edem za 67%, nekrozu za 99%, MPO za 49%; ↓crijevnog IL-1α i IL-8 za 56% i 90%

Deksametazon (2)	1, 3 i 6 mg/kg; 0.5h prije indometacina	indometacin	manje doze (1 and 3 mg): potiču "prekrivanje" ulkusa sa bakterijama, mukusom i neutofilima; 6 mg/kg- ↓ ulceracije jejunuma
S-nitrozo-N-acetil-penicilamin (SNAP) (nitro-vazodilator, stvara NO) (14)	10 µg kg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> i.v.	E.coli lipopolisah.	zaštitno djelovanje u endotoksin-potaknutom akutnom oštećenju crijeva
Protuupalni lijekovi (15, 240)	BW755C	ch. kolitis - TNBS	↓povećano stvaranje 6-keto-PGF1 alpha and LTB4
	Indometacin (0.1 – 1 mg/kg sc) 2x dnevno tijekom prvog tjedna	TNBS	doza-ovisno ↑ ozbiljnosti kolitisa i stope smrtnosti; u ch. colitisu - inhibira stvaranje prostanoida
	Aspirin	ch. kolitis - TNBS	inhibira stvaranje prostanoida (PGE2), ↑MPO, nema učinka na sintezu LB4 u kolonu
	sulfasalazin ili prednisolon		inhibira stvaranje 6-keto-PGF1alpha; djelovanje manje značajno Zaključak: niti jedan protuupalni lijek ne smanjuje značajno oštećenje kolona; rezultati ukazuju da eikosanodi imaju minimalnu ulogu u uspostavljanju kroničnog makroskopskog oštećenja kolona
	Naproksen (5mg/kg)	TNBS	egzacerbacija kolitisa
	PF-5901 (100 mg/kg per os) (inhibitor 5-lipoksigenaze)	TNBS	značajno smanjuje ozbiljnost kolitisa
Quercitrin (flavonoid, štiti mukoza ili utječe na oporavak mukoze) (41)	1 ili 5 mg/kg per os	TNBS, ac. kolitis	↓razinu MPO i alkalne fosfataze; povoljno utječe na oštećenje kolona 2. dana
		TNBS, ch. kolitis	↓indeks oštećenja kolona i učestalost proljeva; uspostavlja normalan transport tekućine

Ketotifen ("stabilizator mastocita") (45)	intagastrično; 100µg/100g 2x dnevno, profilaktički 48h prije kolitisa te nastaviti tijekom pokusa	TNBS, octena kis.	↓oštećenje mukoze, u mukozi ↓stvaranje činitelja koji aktiviraju trombocite, PGE2, TXB2, LTC4, LTB4; ↓MPO
SC-41930 (antagonist leukotrienskog B4 receptora) (56)	intrarektalno 30 min nakon ili 1h prije i 1h nakon kolitisa; ED50 = 20 mg/kg (štakor); 24 mg/kg (zamorac); 30 mg/kg (kunić)	octena kis.	lokalno djelovanje, prevenira akutnu upalu kolona
FK506 (imunosupresiv) (83)	0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/kg sc.	TNBS	↓stvaranje superoksidnih radikala u neutrofilima, ↓smanjuje oštećenje kolona u ovisnosti od doze
N-3 nezasićene masne kiseline (suprimiraju plazmatski LTB4) (199)	osnovna prehrana + 2% n-3PUEA-obogaćene sa perilla uljem	TNBS	↓LTB4u plazmi i indeks ulkusa, ↓oštećenje kolona
Prostaglandin E1 (214)	12h nakon kolitisa i.p. injekcija 2 mg ?PGE1 u 1 ml fiziološke otopine, životinje su žrtvovane 3., 7. i 10. dana	10% octena kis.	↓upalu 3. dana, razlika nije značajna 7. i 10. dana; povoljno utječe na PGE1 u smanjenju ozbiljnosti upale kolona
Koloidni bismut subcitrat (CBS) (256)	1.5 ml fiziološke otopine koja sadrži 240 mg CBS ili samo CBS rektalno svakih 24h tijekom 5 dana	10% octena kis.	štiti mukozu želuca i duodenuma od pojave ulkusa; značajno ↓makroskopski i mikroskopski indeks oštećenja, ↓PGE2
BN52021 (specifični antagonist receptora za aktivirajući činitelj trombocita) (237, 243)		TNBS	tijekom 1. i 2. tjedna znatno ↓upalae i ulceracije kolona; ↓oštećenje i težinu distalnog kolona
IB-4 (monoklonalno protutijelo na leukocitnu adhezijsku molekulu CD18) (238)	3 mg/kg; pretretman ili 12h nakon izazivanja kolitisa, kunić	TNBS	pretretman:suprimira infiltraciju neutrofila u kolonu, ↓veličinu ozljede epitela; tretman: ↓MPO za 80%
Leukotrien B4 (241)	2 nmol	30% etanol	↓MPO kolona i sinteze LTB4 u kolonu



Ishrana obogaćena ribljim uljem (eikosapentaenoična kiselina) (48)	6 tjedana prehrana obogaćena ribljim uljem	4% octena kis.	eicosapentaenoična kiselina se natječe sa arahidonskom kiselinom i mijenja biosintezu eicosanoida; riblje ulje štiti apsorpciju tekućine u kolonu i ileumu
Boldine (60)		octena kis.	citoprotektivno i protuupalno djelovanje; djeluje zaštitno, ↓infiltracije neutrofila u kolonu, ali ne djeluje značajno na tkivnu lipoperoksidazu, štiti transport tekućine u kolonu
Verapamil (blokator kalcijevih kanala) (52)		4% octena kis.	štiti mukožu tako što umanjuje sintezu leukotriena u mukozi, ↑sintezu prostaglandina
MK-866 (specifični inhibitor biosinteze leukotriena) (239)	jednokratna doza od 10 mg/kg	2% octena kis.	↓sintezu LTB4 u kolonu
	dnevno – 2h prije izazivanja kolitisa te potom nastaviti tijekom 1 tjedna	2% octena kis.	↓oštećenje kolona; ubrzava cijeljenje
BAY Y 1015 (aktivirajući proteinski inhibitor 5-lipoksigenaze) (143)	8 ili 24 mg/kg per os miševi	5% dekstran sulfat	↑histološku sliku, ↓indeks aktivnosti bolesti, indeks upale (37-79%), indeks kripti (28-71%), MPO (49-57%) i razinu LTB4 (56-63%)
Rekombinantni granulocitni činitelj koji stimulira kolonije (rhG-CSF) (82)	24h prije kolitisa ili liječenje nakon indukcije sa dozama od 50 i 200 µg/kg; kunić	imuni kompleks	pretretman: ↑tkivnu MPO; tretman: ↓LTB4 i TXB2, PGE2 –nama razlike u odnosu na kontrolu; liječenje sa visokim dozama rezultira značajnim ↓proinflamatornih medijatora, ali je očuvano stvaranje PGE2 u mukozi, koji djeluje zaštitno
P8720 (Bz-Pro-Phe-boroArg) (specifični inhibitor plazmatskog kalikreina) (204)		PG-APS – bakterijski peptidoglikan-polisaharid	značajno ali umjereno ↓ac. intestinalne upale; ↓MPO

IL-4 (Ad5IL-4) (81)	ip. $3.0 \times 10^6$ PFUs Ad5 transfektiranog sa štakorskim interleukin-4 - 2 injekcije	TNBS	prekomjeren izražaj IL-4, značajno ↓ oštećenja tkiva, razine IFN- $\gamma$ u serumu i kolonu te MPO aktivnosti u distalnom kolonu
BPC-15 (body protection compound - 15) (227)	1h prije kolitisa u dozi: 0.0001, 0.001, 0.01 ili 10 nmol/kg i.p.; 10 nmol/kg intrarektalno; žrtvovanje 3. dan	TNBS	i.p. - ↓ veličinu oštećenja kolona na doza-ovisan način, ↓ MPO; intrarektalno- nedjelotvoran

**Prilog 2. Terapija Crohnove bolesti u ljudi.**

**A) KORTIKOSTEROIDI**

PREPARAT	NAČIN PRIMJENE	DOZA	TIP CD	UČINCI
Hidrokortizon ili Prednizon (7, 72)	per os	1 mg/kg dnevno tijekom 3-7 tjedna		
	parenteralno	40-60mg/d tijekom 7-10 dana	hospitalizirani bolesnici sa teškom CD	
	rektalno		oboljenjem distalnog kolona	
Prednizon (72)		0.75 mg/kg/d		
Metilprednizolon (72)		početi sa 48mg/d		
BUDESONID (20, 63, 66, 110)	per os 176 bolesnika	3 ili 6 mg/d do 12 mjeseci	CD ileuma ili ileocekalne regije	6 mg budesonid 1x dnevno = produžava vrijeme relapsa CD i dovodi do pojave blagih sistemskih nuspojava
	per os 178 bolesnika	9 mg/d ili 4.5 mg/2xd ili prednizolon 40 mg/d; tijekom 12 tjedana		remisija se događa 60% nakon 8 tjedana, budesonide je komparabilan prednizolonu
	klizma	2 mg/100 ml tijekom 4 tjedna	aktivni ulcerozni kolitis i/ili proktitis	endoskopska remisija ili poboljšane u 46-84%; histološka remisija ili poboljšanje u 46-68%; ovaj terapijski režim je djelotvoran kao i terapija drugim kortikosteroidima ali dovodi do slabije supresije plazmatskog kortizola nego drugi glukokortikoidi
	per os 81 bolesnik	3x3 mg/d tijekom 6 tj. , nakon toga 3x2 mg/d 6 tj.	aktivna CD ileuma i kolona	remisija je prisutna u 54.3%; budesonide može biti alternativa liječenju steroidima



Eudragit-obučeni budesonide (67)	per os	9mg/d tijekom 8 tjedana	aktivna CD ileuma, ileocekalne regije i/ili uzlaznog kolona	klinička remisija u 42-67%; ↓CD indeks aktivnosti bolesti
Budesonid Entocort CR- Astra Pharma (215)	per os	9 mg/d	CD ileuma i/ili uzlaznog kolona	glukokortikoid sa izrazitim lokalnim djelovanjem ali sa mnogo nižom sistemskom raspoloživosti; ciljna tkiva su ileum i ileocekalno područje; uspostavlja remisiju; oskudne sistemske nuspojave; <b>“steroid izbora”</b>

## B) AMINOSALICILATI

PREPARAT	NAČIN PRIMJENE	DOZA	HEMA LIJEČENJA		UČINCI
			AKTIVNO LIJEČENJE	TERAPIJA ODRŽAVANJA	
Sulfasalazin (72)		1g/15kg/d; max doza 5g/d			↓ rizik od relapsa
Mesalamin (13, 72)	per os	3.2-4g			
	klizma	1-4g; 60 ili 100 ml suspenzije	1-4 g prije spavanja	1g prije spavanja	
	supozitorija	500 mg ili 1 g	500 mg/2-3x/d	500 mg prije spavanja	

Mesalamin (200)	310 bolesnika	1, 2 ili 4 g/d			doza od 4g/d dovodi do značajnog poboljšanja svih parametara kvalitete života oboljelih; doze 1 i 2 g/d također dovode do poboljšanja kvalitete života, ali ne svih parametara
Azo-vezani sulfasalazin (72)	per os	500 mg	4-6 g u podijeljenim dozama	2-4 g u podijeljenim dozama	
Olsalazin (72)	per os	250 mg	diskutabilno	1.5-3 g u podijeljenim dozama	
Balsalazid (72)	per os	750 mg	2-6 g (?)	2-6 g (?)	
Derivati mesalamine (72)					
Asacol (72, 220)	per os	400 mg Eudragit-S (pH7)	2.4-4.8 g u podijeljenim dozama	800 mg-4.8 g u podijeljenim dozama	
Claversal, Mesasal ili Salofalk (72)	per os	250 ili 500 mg Eudragit-L (pH6)	1.5-3g u podijeljenim dozama	750 mg-1.5 u podijeljenim dozama	
Pentasa (kapsule sa kontroliranim oslobađanjem mesalamina) (72, 201)	per os	250 ili 500 mg mikrogranula Etilceluloze	2-4 g u podijeljenim dozama	1.5-3 g u podijeljenim dozama	potiče remisiju, ima pozitivan terapijski učinak; mogući lijek za čuvanje steroida za bolesnike sa aktivnom ili mirnom CD
Mesalazine (Mesasal/Claversal) 5-ASA (216)	per os 286 bolesnika	1.5 g prije spavanja tijekom 12 mjeseci			nije zabilježena statistička značajnost u pojavi relapsa između kontrolne i 5-ASA skupine

5-ASA (Eudragit-S-obloženi mesalin)(18)	33 bolesnika	2.4 g/d		neaktivna CD; preveniranje relapsa CD
5-ASA (5-aminosalicilna kis.) and 6-metilprednizolon (usporedna studija) (67)		4.5 g/d 5-ASA		ne postoji značajna razlika u odgovoru na 5-ASA ili 6-MPred; 5-ASA se može razmatrati za tretman aktivne CD u bolesnika koji ne regiraju ili odbijaju glukokortikoide

### C) IMUNOMODULACIJSKI LIJEKOVI

PREPARAT	NAČIN PRIMJENE	DOZA	TIP CD	UČINCI
AZATIOPRIN (16, 30, 69, 143)		2.0-2.5mg/kg/d tijekom 12.5 mjeseci	aktivna CD, bolesnici kod kojih se ne može prekinutu sa kortikosteroidima ili koji imaju perzistentno perianalno oboljenje ili fistule; u djece	potiče remisiju, postoji rizik od limfoma i supresije koštane srži
6-MERKAPTOPURIN (16, 72, 79, 80, 151)		1.0-1.5mg/kg/d	aktivna CD; u djece	potiče remisiju
		90 mg/d	ovisnost o kortikosteroidima, teško izlječive ili perianale bolesti	pojava kliničke remisije u 61.5%
	10 bolesnika	20-30 mg/d	CD ovisna o kortikosteroidima ili rezistentna na kortikosteroide, postojanje fistula	ne djeluje na promjene u kolonu i ileumu u CD; fistule se zatvaraju ili dolazi do poboljšanja u 70%



CIKLOSPORIN A (30, 71, 88, 122)	per os	2-5mg/kg/d	teško izlječiva CD, perianala bolest, fistule	nema učinka
	i.v. infuzije	4mg/kg/d		uspješno cijeljenje teško izlječivih fistula
	iv. i per os; 10 djece	2x dnevno i.v., potom per os, nakon 6 mjeseci se daje 6-MP s ciljem da se prekine sa CSA i uspostavi remisija sa 6-MP i 5-ASA	akutna teška CD	CSA postiže dobru remisiju u djece
Ciklosporin (Sandimmune, Sandoz) (49)	per os	2.5 mg podijeljeno u 2 doze tijekom jednog tjedna, potom 5 mg/kg; max. doza 15 mg/kg	CD	male doze per os režima nisu značajno djelotvorne u poticanju i uspostavljanju remisije
Ciklosporin (179)	per os 71 bolesnik	5-7.5 mg/kg/d	rezistentne CD ili CD koja ne reagira na kortikosteroide	učinkovit u 59%
CSA + kortikosteroidi (182)	i.v. potom per os	5 mg/kg/d i.v. zatim per os ciklosporin tijekom srednjeg perioda od 2.6mjeseci	teško izlječiva CD	učinkovit i snažno potiče poboljšanje akutne teške egzacerbirane CD, ali nakon prekida terapije mogu se očekivati relapsi
METOTREKSAT (30, 50, 72, 104)	i.m.	25mg 1x tjedno tijekom 16 tjedana	kronična aktivna CD; za ↓ doze kortikosteroida; kod CD otporne na steroide	klinička remisija; smanjuje dozu prednisona
	39 bolesnika		teško izlječiva CD	3 .mj. remisija u 72%, u 42% nakon 12 mj. i povlačenje steroida, relaps se javio u 58% nakon 12 mj., 12 bol.-nuspjave

Fusidična kiselina (djeluje imunosupresivno na T-stanice) (101)	per os 8 bolesnika	500 mg t.d.s. tijekom 8 tjedana	bolesnici koji ne reagiraju na terapiju	poboljšanje bolesti; učinkovit u nekim ch. aktivnim CD, potrebno daljnje istraživanje
---	-----------------------	------------------------------------	---	---

#### D) ANTIBIOTICI

PREPARAT	NAČIN PRIMJENE	DOZA	VRSTA CD	DJELOVANJE
METRONIDAZOL (72)		max. doza 10mg/kg/d 20mg/kg	perianalno oboljenje nakon resekcije crijeva	↓recidiva, nakon 24 i 36 mj nema učinka
CIPROFLOKSACIN + Metronidazole ili metilprednisolon (160)	41 bolesnik	500 mg/2x/d + 250 mg/4x/d or 0.7– 1mg/kg/d	aktivna CD	potpuna remisija u 51.6%,
RIFABUTIN & MAKROLIDNI ANTIBIOTICI (Clarithromicin ili Azatromicin) (69)	46 bolesnik		teška CD	djelomično kliničko poboljšanje CD
ANTITUBERKULOTICI (159)	4 lijeka u kombinaciji: rifampicin +etambutol +dapson + clofazamine			↓simptoma, ne djeluje na uzrok bolesti

## E) TERAPIJA BUDUĆNOSTI

PREPARAT	NACIN PRIMJENE	DOZA	VRSTA CD	UČINAK
Anti CD-4 –monoklonsko protutijelo (cM-T412) (30, 209)	infuzija 12 bolesnika	3 doze (10, 30 i 100 mg) tijekom 7 uzastopnih dana	neobuzdana CD, otporna na steroide	4. tjedna- srednje↓ indeksa aktivnosti CD za 25%, 24% i 36%; 10. tjedna- za 24% i 52% u grupama koje se dobivale 30 i 100 mg; slabi učinak na endoskopski utvrđeni indeks bolesti; osrednja učinkovitost u liječenju CD
		3 doze (10, 30 i 100 mg) tijekom 7 uzastopnih dana	naobuzdana CD	4. tjedna ↓CD4 na 75%; u 75% endoskopsko poboljšanje, 10.tjedna ↓CD indeksa aktivnosti bolesti; ↓CD4 = "AIDS-slično oboljenje"
Monoklonsko anti-CD4 B-F5 protutijelo (21)	i.v. 12 bolesnika	0.5 mg/d/kg tijekom 7 uzastopnih dana (8 bolesnika); 1. dana 0.5 mg/d/kg te 1 mg/d/kg 1-6 dana (4 bolesnika.)	teška i refrakтерна CD	1 bolesnik – pojava dispneje i tahikardije tako da je prekinuto liječenje; 2 bolesnika – produženo kliničko poboljšanje; 2 bolesnika – djelomično kliničko poboljšanje; 1 bolesnik – značajno endoskopsko poboljšanje; protutijelo nije učinkovito



Kimerično monoklonsko anti-tumor nekroza faktor protutijelo (cA2) (210, 226)	jednokratna infuzija 10 bolesnika	10 mg/kg kao 2-satna infuzija; 2 bolesnika su primila dozu od 20 mg/kg	aktivna CD koja ne reagira na terapiju	8 bolesnika je pokazalo normalizaciju indeksa aktivnosti CD i cijeljenje ulceracija unutar 4 tjedna nakon liječenja
	108 bolesnika jednokratna i.v. infuzija	5; 10; 20 mg/kg	umjerena do teška CD	nakon 4 tjedna: 81% bolesnika (5mg/kg), 50% (10mg/kg) i 64% (20mg/kg) pokazivalo je kliničko poboljšanje
CDP571 protutijelo na TNF- $\alpha$ (203)	i.v. infuzija 2 bolesnika	jednokratno 5 mg/kg kao 5 mg/mL otopina	umjereno aktivna CD	↓aktivnosti bolesti nakon 2 tjedna
Imunoglobulin (IgAbulin) (sadrži 90 mg imunoglobulina od čega 60 mg IgA) (219)	per os 2 bolesnika	14 ml IgAbulin 3x/d tijekom 4 tjedna	teška CD	poboljšava mukoznu barijeru
IL-2 (202)	i.v. infuzija 2 bolesnika	1 bolesnik – ranije liječen sa IFN- $\alpha$ ; 18x10sup6IU/m sup2 dnevno; 2 bolesnik- 6x10sup5IU/kg svakih 8h 1. do 5. i 16. do 20. dana	CD	reaktivacija CD
recombinantni human IL-10 (225)	i.v. bolus injekcija 46 bolesnika	0,5, 1, 5, 10 ili 25 $\mu$ g/kg/d tijekom 7 uzastopnih dana	CD rezistentna na steroide	↓indeks aktivnosti CD, remisija u 50% nakon 3 tjedna
Interferon-alfa (57)	12 bolesnika		kronična aktivna CD	nema kliničke remisije bolesti; terapijski ne učinkovit
Interferon alfa-2b (40)	5 bolesnika		aktivna CD	u svih bolesnika pojava influencij-sličnih simptoma, 2bol.-djelimična remisija i ↓indeksa aktivnosti bolesti za 39% i 50%; potrebno temeljitije istraživanje

Interferon alfa-2b (248)	4 terapije u 3 bolesnika	3 miliona I.U./d tijekom 4 tjedna i 3x3 milijuna U.I./tjedno tijekom 20 tjedana	CD ovisna o steroidima	2 terapije su se morale prekinuti nakon 12 i 14 tjedana zbog ↑aktivnosti bolesti; u preostala 2 tretmana došlo je do ↓aktivnosti bolesti; impresivna je pojava obilja crijevnih i vancrijevnih upalnih aktivnosti; žene puno bolje reagiraju na liječenje
Nikotin (13)	kožni flaster	15-25 mg/d	neaktivna CD	napovoljan učinak na tijek CD tako da se ovakvo liječenje ne preporučuje
Oxpentifilin (pentoxifilin) (u potpunosti zaustavlja stvaranje TNF- $\alpha$ ) (5)	3 bolesnika	400 mg 4x/d tijekom 4 tjedna	CD otporna na steroide	ne djeluje učinkovito na upalu u CD
Rekombinantni hormon rasta (77)	3 bolesnika	0.9-1 U/kg/tjedna	CD u djece	↑brzine rasta i starosti kostiju; indeks aktivnosti CD nije promijenjen
Leukocitoferezna terapija (193)	19 bolesnika		bolesnici sa IBD kod kojih je uobičajena terapija neučinkovita	kliničko poboljšanje u 84.2%; nema nuspojave
Hiperbarična oksigenacija (32)	8 bolesnika			3 potpuna i 3 djelomična poboljšanja
7S-immunoglobulini (Venimmun) (195)	i.v. 2 bolesnika	10 g tijekom 10 dana	CD rezistentna na liječenje	↓indeksa aktivnosti; bolesnici ulaze u remisiju, ↓leukocita i limfocita, CD4/CD8 omjer u perifernoj krvi se mijenja u korist supresorskih stanica
Saccharomyces boulardii (155)	20 bolesnika	250 mg t.i.d. tijekom 2 tjedna	stabilna faza CD	učinkovit; ↓BEST indeksa i ↓učestalosti pokreta crijeva

Tacrolimus (FK 506) (180)	per os 3 bolesnika	0.15-0.29 mg/kg/d, podesiti tako da koncentracija lijeka u krvi iznosi 10-20 mg/ml	komplikacije na proksimalnom dijelu tankog crijeva ili CD sa fistulama	kliničko poboljšanje; dugotrajna remisija; terapija održavanja je metotreksat ili 6-merkaptopurin; nuspojave
Ornidazole (221)			aktivna CD	↓ indeksa aktivnosti, učinkovit i siguran lijek
Cink (141)	per os 14 bolesnika	300 mg cinkovog asparata tijekom 4 tjedna	CD	biopsije crijeva nisu pokazale promjenu histološkog indeksa, razine albumina u plazmi te indeksa aktivnosti bolesti nisu promijenjeni
Eudragit NE 30D, Röhm, Darmstadt, Njemačka (enterički- presvučena kapsula ribljeg ulja); <i>kapsula sadrži: 500 mg koncentrata morskog lipida u obliku slobodnih masnih kiselina (40% eikosapentaenoične kiseline, 20% dokosaheksaenoične kiseline, 40% smjesa n-7,-9,-6 masnih kiselina)</i> (8)	per os 49 bolesnika	10 g tijekom 10 dana	CD rezistentna na terapiju	↓ indeksa aktivnosti, bolesnici ulaze u remisiju, ↓ leukocita i limfocita, CD4/CD8 omjer u perifernoj krvi se mijenja u korist supresorskih stanica



## VII LITERATURA

1. ALLGAYER H, DESCHRYVER K, STENSON WF. 1989. Treatment with 16,16'-dimethyl-prostaglandin E2 before and after induction of colitis with trinitrobenzensulfonic acid in rats decreased inflammation. *Gastroenterology* 96:1290-300.
2. ANTHONY A, DHILLON AP, SIM R, POUNDER RE, WAKEFIELD AJ. 1994. Dexamethasone promotes ulcer plugging in experimental enteritis. *Aliment Pharmacol Ther* 8:597-602.
3. BABYTSKY MW, ROSSITER G, PODOLSKY DK. 1996. Expression of transforming growth factor  $\alpha$  and  $\beta$  in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 110:975-84.
4. BARRETT KE. 1990. Involvement of histamine in a rat model of inflammatory bowel disease (abstract). *Gastroenterology* 98:A437.
5. BAUDITZ J, RUCKERT Y, RAEDLER A, NIKOLAUS S, LOCHS H, SCHREIBER S. 1995. Tumor necrosis factor inhibition by oxpentifylline and interstitial inflammation in Crohn's disease. *Lancet* 345:1445.
6. BAYLESS TM, TOKAYER AZ, POLITO JM II, QUASKEY SA, MELLITS ED, HARRIS ML. 1996. Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members: potential hereditary influences. *Gastroenterology* 111:573-9.
7. BELLANGER J, COSNES J, GENDRE JP, BEAUGERIE L, MALAFOSSE M, LE QUINTREC Y. 1994. Treatment of Crohn disease in adults. *Rev Med Interne* 15:676-89.
8. BELLUZZI A, BRIGNOLA C, CAMPIERI M, PERA A, BOSCHI S, MIGLIOLI M. 1996. Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med* 334:1557-60.
9. BERNARD JA, BEAUCHAMP RD, COFFEY RJ, MOSES HL. 1989. Regulation of intestinal epithelial cell growth by transforming growth factor type  $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1578-82.
10. BERTRÁN X, MAÑÉ J, FERNÁNDEZ-BAÑARES F, CASTELLÁ E, BARTOLI R, OJANGUREN I, ESTEVE M, GASSULL MA. 1996. Intracolonic administration of zileuton, a selective 5-lipoxygenase inhibitor, accelerates healing in a rat model of chronic colitis. *Gut* 38:899-904.
11. BJARNASON I, MACPHERSON A, SOMASLINDARM S, TEAHON K. 1993. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol* 7:160-9.

12. BODEN SD, HAIR G, TITUS M, RACINE K, McCUAIG K, WOZNAY JM, NANES MS. 1997. Glucocorticoid-induced differentiation of fetal rat calvarial osteoblasts is mediated by bone morphogenetic protein-6. *Endocrinology* 138:2820-8.
13. BONAPACE CR, MAYS DA. 1997. The effects of mesalamine and nicotine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Ann Pharmacother* 31:907-13.
14. BOUGHTON-SMITH NK, HUTCHESON IR, DEAKIN AM, WHITTLE BJ, MONCADA S. 1990. Protective effects of S-nitroso-N-acetyl-penicillamine in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *Eur J Pharmacol* 191:458-8.
15. BOUGHTON-SMITH NK, WALLACE JL, MORRIS GP, WHITTLE BJ. 1988. The effects of anti-inflammatory drugs on eicosanoid formation in a chronic model of inflammatory bowel disease in the rat. *Br J Pharmacol* 94:65-72.
16. BOUHNİK Y, LEMANN M, MARY J-Y, SCEMAMA G, TAI R, MATUCHANSKY C, MODIGLIANI R, RAMBAUD J-C. 1996. Long-term follow-up of patients with Crohn's disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. *Lancet* 347:215-19.
17. BREESE E, BRAEGGER CP, CORRIGAN CJ, WALKER-SMITH JA, MacDONALD TT. 1993. Interleukin-2- and interferon- $\gamma$ -secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology* 78:127-31.
18. BRESCI G, PARISI G, BANTI S. 1994. Long-term therapy with 5-aminosalicylic acid in Crohn's disease: is it useful? Our four years experience. *Int J Clin Pharmacol Res* 14:133-8.
19. BUTZNER JD, PARMAR R, BELL CJ, DALAL V. 1996. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. *Gut* 38:568-73.
20. CAESAR I, GROSS V, ROTH M, ANDUS T, SCHMIDT C, RAEDSCH R, WEBER A, GIEREND M, EWE K, SCHOLMERICH J. 1997. Treatment of active and postactive ileal and colonic Crohn's disease with oral pH-modified-release budesonide. *Hepatogastroenterology* 44:445-51.
21. CANVA-DELCAMBRE V, JACQUOT S, ROBINET E, LEMANN M, DROUET C, LABALETTE M, DESSAINT JP, BENGOUFA D, RABIAN C, MODIGLIANI R, WIJDENES J, REVILLARD JP, COLOMBEL JF. 1996. Treatment of severe Crohn's disease with anti-CD4 monoclonal antibody. *Aliment Pharmacol Ther* 10:721-7.
22. CASINI-RAGGI V, KAM L, CHONG YJT, FIOCCHI C, PIZARRO TT, COMINELLI F. 1995. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease: A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 154:2434-40.
23. CASINI-RAGGI V, MONSACCHI L, VOSBECK K, NAST CC, PIZARRO TT, COMINELLI F. 1995. Anti-inflammatory effects of CGP 47969A, a novel inhibitor of proinflammatory cytokine synthesis, in rabbit immune colitis. *Gastroenterology* 109:812-818.



24. CATE RL, MATTALIANO RJ, HESSION C, TIZARD R, FARBER NM, CHEUNG A, NINFA EG, FREY AZ, GASH DJ, CHOW EP, FISHER RA, BERTONIS JM, TORRES G, WALLNER BP, RAMACHANDRAN KL, RAGIN RC, MANGANARO TF, MacLAUGHLIN DT, DONAHOE PK. 1986. Isolation of the bone and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 45:6856-98.
25. CELESTE AJ, IANNAZZI JA, TAYLOR RC, HEWICK RM, ROSEN V, WANG EA, WOZNEY JM. 1990. Identification of transforming growth factor  $\beta$  family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9843-47.
26. CENTRELLA M, HOROWITZ MC, WOZNEY JM, McCARTHY TL. 1994. Transforming growth factor- $\beta$  gene family members and bone. *Endocrine Rev* 15:27-39.
27. CHEN S, RUBBOCK MJ, WHITMAN M. 1996. A transcriptional partner for Mad proteins in TGF- $\beta$  signaling. *Nature* 383:691-96.
28. CHRISTENSEN H, FLYVBJERG A, ØRSKOV H, LAURBERG S. 1993. Effects of growth hormone on the inflammatory activity of experimental colitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 28:503-511.
29. CIACCI C, LIND SE, PODOLSKY DK. 1993. Transforming growth factor  $\beta$  regulation of repair in intestinal epithelial monolayers. *Gastroenterology* 105:527-32.
30. COHEN RD, HANAUER SB. 1995. Immunomodulatory agents and other medical therapies in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 11:321-30.
31. COLGAN SP, PARKOS CA, DELP C, ARNAOUT MA, MADARA JL. 1993. Neutrophil migration across cultured intestinal epithelial monolayers is modulated by epithelial exposure to IFN- $\gamma$  in a highly polarized fashion. *J Cell Biol* 120:785-98.
32. COLOMBEL JF, MATHIEU D, BOUAULT JM, LESAGE X, ZAVADIL P, QUANDALLE P, CORTOT A. 1995. Hyperbaric oxygenation in severe perineal Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 38:609-14.
33. COLOMBEL JF, GRANDBASTIEN B, GOWER-ROUSSEAU C, PLEGAT S, EVRARD JP, DUPAS JL, GENDRE JP, MODIGLIANI R, BELAICHE J, HOSTEIN J, HUGOT JP, van KRUININGEN H, CORTOT A. 1996. Clinical characteristic of Crohn's disease in 72 families. *Gastroenterology* 111:604-7.
34. CONNER EM, BRAND SJ, DAVIS JM, LAROUX FS, PALOMBELLA VJ, FUSELER JW, KANG DY, WOLF RE, GRISHAM MB. 1996. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease: Toxins, mediators, and modulators of gene expression. *Inflammatory Bowel Dis* 2:133-47.
35. CROHN BB, GINZBURG L, OPPENHEIMER GD. 1932. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *JAMA* 99:1323-9.



36. CUNNINGHAM NS, PARLAKAR V, REDDI AH. 1992. Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein-2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor- $\beta_1$  mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11740-4.
37. D'ARGENIO G, COSENZA V, SORRENTINI I, DE RITIS F, GATTO A, DELLE CAVE M, D'ARMIENTO FP, MAZZACCA G. 1994. Butyrate, mesalamine, and factor XIII in experimental colitis in the rat: effects on transglutaminase activity. *Gastroenterology* 106:399-404.
38. D'ALESSANDRO JS, WANG EA. 1994. Bone morphogenetic proteins inhibit proliferation, induce reversible differentiation and prevent cell death in astrocyte lineage cells. *Growth Factors* 11:45-52.
39. D'ALESSANDRO JS, YETZ-ALDAPE J, WANG EA. 1994. Bone morphogenetic proteins induce differentiation in astrocyte lineage cells. *Growth Factors* 11:53-69.
40. DAVIDSEN B, MUNKHOLM P, SCHLICHTING P, NIELSEN OH, KRARUP H, BONNEVIE-NIELSEN V. 1995. Tolerability of interferon alpha-2b, a possible new treatment of active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 9:75-9.
41. DEMEDINA FS, GALVEZ J, ROMERO JA, ZARZUELO A. 1996. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 278:771-9.
42. DEWULF N, VERSCHUEREN K, LONNOY O, MORÉN A, GRIMSBY S, SPIEGLE KV, MIYAZONO K, HUYLEBROECK D, ten DIJKE P. 1994. Distinct spatial and temporal expression patterns of two type I receptors for bone morphogenetic proteins during mouse embryogenesis. *Endocrinology* 136:2652-2663.
43. DOCTOR JS, JACKSON PD, RASHKA KE, VISALLI M, HOFFMAN FM. 1992. Sequence, biochemical characterization, and developmental expression of a new member of the TGF- $\beta$  superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 151:491-505.
44. DUDLEY AT, LYONS KM, ROBERTSON EJ. 1995. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 9:2795-2807.
45. ELIAKIM R, KARMELI F, OKON E, RACHMILEWITZ D. 1992. Ketotifen effectively prevents mucosal damage in experimental colitis. *Gut* 33:1498-503.
46. ELMGREEN J, SØRENSEN H, BERKOWICZ A. 1984. Polymorphism of complement C3 in chronic inflammatory bowel disease: Predominance of the C3<sup>F</sup> gene in Crohn's disease. *Acta Med Scand* 215:375-8.
47. ELSON CO, SARTOR RB, TENNYSON G, RIDDELL RH. 1995. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109:1344-67.

48. EMPEY LR, JEWELL LD, GARG ML, THOMSON AB, CLANDININ MT, FEDORAK RN. 1991. Fish oil-enriched diet is mucosal protective against acetic acid-induced colitis in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 69:480-7.
49. FEAGAN BG, MCDONALD JWD, ROCHON J, LAUPACIS A, FEDORAK RN, KINNEAR D, SAIBIL F, GROLL A, ARCHAMBAULT A, GILLIES R, VALBERG B, IRVINE EJ. 1994. Low-dose cyclosporine for treatment of Crohn's disease. *N Engl J Med* 330:1846-51.
50. FEAGAN BG, ROCHON J, FEDORAK RN, IRVINE EJ, WILD G, SUTHERLAND L, STEINHART AH, GREENBERG GR, GILLIES R, HOPKINS M, HANAUER SB, MCDONALDS JWD. 1995. Methotrexate for the treatment of Crohn's disease. *N Engl J Med* 332:292-297.
51. FEDORAK RN, EMPEY LR, MACARTHUR C, JEWELL LD. 1990. Misoprostol provides a colonic mucosal protective effect during acetic acid-induced colitis in rats. *Gastroenterology* 98:615-625.
52. FEDORAK RN, EMPEY LR, WALKER K. 1992. Verapamil alters eicosanoid synthesis and accelerates healing during experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 102:1229-35.
53. FERGUSON EL, ANDERSON KV. 1992. Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Cell* 71:451-61.
54. FORAGE RG, RING JM, BROWN RW, McINERNEY BV, COBON GS, GREGSON RP, ROBERTSON DM, MORGAN FJ, HEARN MTW, FINDLEY JK, WETTENHALL REH, BURGER HG, DeKRETZER DM. 1986. Cloning and sequence analysis of cDNA species coding from the two subunits of inhibin from bovine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3091-5.
55. FRANZÉN P, ten DIJKE P, ICHIJO H, YAMASHITA H, SCHULZ P, HELDIN C-H, MIYAZONO K. 1993. Cloning of a TGF $\beta$  type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF $\beta$  type II receptor. *Cell* 75:681-92.
56. FRETLAND DJ, WIDOMSKI D, TSAI BS, ZEMAITIS JM, LEVIN S, DJURIC SW, SHONE RL, GAGINELLA TS. 1990. Effect of leukotriene B4 receptor antagonist SC-41930 on colonic inflammation in rat, guinea pig and rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 255:572-6.
57. GARDINER KR, ANDERSON NH, MCCAIGUE MD, ERWIN PJ, HALLIDAY MI, ROWLANDS BJ. 1994. Enteral and parenteral anti-endotoxin treatment in experimental colitis. *Hepatogastroenterology* 41:554-558.
58. GELBART WM. 1989. The decapentaplegic gene: a TGF-beta homologue controlling pattern formation in *Drosophila*. *Development* 107 (suppl):65-74.



59. GILADI E, RAZ E, KARMELI F, OKON E, RACHMILEWITZ D. 1995. Transforming growth factor-beta gene therapy ameliorates experimental colitis in rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 7:341-347.
60. GOTTELAND M, JIMENEZ I, BRUNSER O, GUZMAN L, ROMERO S, CASSELS BK, SPEISKY H. 1997. Protective effects of boldine in experimental colitis. *Planta Med* 63:311-5.
61. GRAFF JM, BANSAL A, MELTON DA. 1996. Xenopus Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF $\beta$  superfamily. *Cell* 85:479-87.
62. GRAHAM MF, DIEGELMANN RF, ELSON CO, LINDBLAD WJ, GOTSCHALK N, GAY S, GAY R. 1988. Collagen content and types in the intestinal strictures of Crohn's disease. *Gastroenterology* 94:257-65.
63. GREENBERG GR, FEAGAN BG, MARTIN F, SUTHERLAND LR, THOMSON ABR, WILLIAMS CN, NILSSON L-G, PERSSON T. 1996. Oral budesonid as maintenance treatment for Crohn's disease: a placebo-controlled, dose-ranging study. *Gastroenterology* 110:45-51.
64. GRIFFITH DL, KECK PC, SAMPATH TK, RUEGER DC, CARLSON WD. 1995. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: Structural paradigm for the transforming growth factor  $\beta$  superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:878-83.
65. GRISHAM MB, VOLKMER C, TSO P, YAMADA T. 1991. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid. *Immunology* 48:265-72.
66. GROSS V, ANDUS T, CAESAR I, BISCHOFF SC, LOCHS H, TROMM A, SCHULZ HJ, BAR U, WEBER A, GIEREND M, EWE K, SCHOLMERICH J. 1996. Oral pH-modified release budesonid versus 6-methylprednisolone in active Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 8:905-9.
67. GROSS V, ANDUS T, FISCHBACH W, WEBER A, GIEREND M, HARTMAN F, SCHOLMERICH J. 1995. Comparison between high dose 5-aminosalicylic acid and 6-methylprednisolone in active Crohn's ileocolitis. A multicenter randomised double-blind study. German 5-ASA study group. *Z Gastroenterol* 33:581-4.
68. GROSS V, ROTH M, ÜBERSCHAER B, ANDUS R, WEBER A, GIEREND M, EWE K, SCHÖLMERICH J. 1994. Treatment of active Crohn's ileocolitis with eudragit coated budesonide. *Gastroenterology* 106:A694.
69. GUI GP, THOMAS PR, TIZARD ML, LAKE J, SANDERSON JD, HERMONTAYLOR J. 1997. Two-year-outcomes analysis of Crohn's disease treated with rifabutin and macrolide antibiotics. *J Antimicrobial Chemotherapy* 39:393-400.
70. HAFEEZ W, CILIBRETO G, PERIMUTTER DH. 1992. Constitutive and modulated expression of the human alpha 1 antitrypsin gene. Different transcriptional initiation sites used in three different cell types. *J Clin Invest* 89:1214-22.



71. HANAUER SB, SMITH MB. 1993. Rapid closure Crohn's disease fistulas with continuous intravenous cyclosporin. *Am J Gastroenterol* 88:646-49.
72. HANAUER SB. 1996. Drug therapy:inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 334:841-48.
73. HAYASHI H, ABDOLLAH S, QUI Y, CAI J, XU YY, GRINELL BW, RICHARDSON MA, GIMBRONE MA, TOPPER JN, WRANA JL, FALB D. 1997. The MAD-related protein Smad 7 associates with the TGF $\beta$  receptor and functions as an antagonist of TGF $\beta$  signaling. *Cell* 89:1165-73.
74. HELDER MN, ÖZKAYNAK E, SAMPATH KT, LUYTEN FP, LATIN V, OPPERMAN H, VUKIĆEVIĆ S. 1995. Expression pattern of the osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in human and mouse development. *J Histochem Cytochem* 43:1035-44.
75. HELDIN CH, MIYAZONO K, ten DIJKE P. 1997. TGF $\beta$  signaling from cell membrane to nucleus through Smad proteins. *Nature* 390:465-71.
76. HEMMATI-BRIVANLOU A, KELLY OG, MELTON DA. 1994. Follistatin an antagonist of activin is expressed in the Spemann organizer and displays direct neutralizing activity. *Cell* 77:283-95.
77. HENKER J. 1996. Therapy with recombinant growth hormone in children with Crohn disease and growth failure. *Eur J Pediatrics* 155:1066-67.
78. HERMISTON ML, GORDON JL. 1995. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 270:1203-7.
79. HIBI T, IWAO Y, YAJIMA T, INOUE N, UENO Y, TAKAISHI H, WATANABE M, ISHII H. 1995. Immunosuppressive agents in the treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 30 (suppl) 8:121-3
80. HINOJOSA J, MOLES JR, NOS P, HOYOS M, RAMIREZ JJ, PRIMO J, FERNANDEZ J, BERENQUER J. 1995. Efficacy of 6-mercaptopurine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig* 88:455-7.
81. HOGABOAM CM, VALLANCE BA, KUMAR A, ADDISON CL, GRAHAM FL, GAULDIE FL, GAULDIE J, COLLINS SM. 1997. Therapeutic effects of interleukin-4 gene transfer in experimental inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 100:2766-76.
82. HOMMES DW, MEENAN J, DIJKHUIZEN S, TENKATE FJW, TYTGAT GNJ, VANDEVENTER SJH. 1996. Efficacy of recombinant granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) in experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 106:529-33.
83. HOSHINO H, GOTO H, SUGIYAMA S, HAYAKAWA T, OZAWA T. 1995. Effects of FK506 on an experimental model of colitis in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 9:301-7.

84. HUGOT J-P, LAURENT-PUIG P, GOWER-ROUSSEAU C, OLSON JM, LEE JC, BEAUGERIE L, NAOM I, DUPAS JL, van GOSSUM A, ORHOLM M, BONATI-PELLIE C, WEISSENBACH J, MATHEN CG, LENNARD-JONES JE, CORTOT A, COLOMBEL JF, THOMAS G. 1996. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 379:821-3.
85. IRISH VF, GELBART WM. 1987. The decapentaplegic gene is required for dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 1:868.
86. ISAACS KL, SARTOR RB, HASKILL S. 1992. Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. *Gastroenterology* 103:1587-95.
87. JENA N, MARTÍN-SEISDEDOS C, McCUE P, CROCE CM. 1997. BMP7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye. *Exp Cell Res* 230:28-37.
88. JEWELL DP, LENNARD-JONES JE, and the Cyclosporin study group of Great Britain and Ireland. 1994. Oral cyclosporin for chronic active Crohn's disease: a multicentre controlled trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 6:499-505.
89. JEWELL DP. 1995. Immunology of inflammatory bowel disease: An update. *J Gastroenterol* 8:78-82.
90. JONES CM, LYONS KM, HOGAN BLM. 1991. Involvement of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development* 111:531-42.
91. KAPLAN FS, TABAS JA, ZASLOFF MA. 1990. Fibrodysplasia ossificans progressiva: a clue from the fly? *Calcif Tissue Int* 47:117-25.
92. KAWABATA M, CHYTIL A, MOSES HL. 1995. Cloning of a novel type II serine/threonine kinase receptor through interaction with the type I transforming growth factor-beta receptor. *J Biol Chem* 270:5625-30.
93. KINGSLEY DM. 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes and Devel* 8:133-46.
94. KNUTSEN R, HONDA Y, STRING DD, SAMPATH TK, BAYLINK DJ, MOHAN S. 1995. Regulation of insulin-like growth factor system components by osteogenic protein-1 in human bone cells. *Endocrinology* 136:1352-8.
95. KOLI KM, ARTEAGA CL. 1997. Processing of the transforming growth factor beta type I and II receptors. *J Biol Chem* 272:6423-7.
96. KOUTROBAKIS I, MANOUSOS ON, MEUWISSEN SG, PENA AS. 1996. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 43:381-93.



97. KRAUSS S, CONCORDET JP, INGHAM PW. 1993. A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* 75:1431-4.
98. KÜHN R, LÖHLER J, RENNICK D, RAJEWSKY K, MULLER W. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75:263-74.
99. KULKARNI AB, HUH C-G, BECKER D, GREISER A, LYGHT M, FLANDERS RC, ROBERTS AB, SPORN MB, WARD JM, KARLSSON S. 1993. Transforming growth factor  $\beta_1$  null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:770-4.
100. KUNIN S, GALLILY R. 1983. Recognition and lysis of altered self cells by macrophages, a modification of target cells by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid. *Immunology* 48:265-72.
101. LANGHOLZ E, BRYNSKOV J, BENDTZEN K, VILJEN M, BINDER V. 1992. Treatment of Crohn's disease with fusidic acid: an antibiotic with immunosuppressive properties similar to cyclosporin. *Aliment Pharmacol Ther* 6:495-502.
102. LEE SJ. 1991. Expression of growth/differentiation factor-1 in the nervous system conservation of a bicistronic structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4250-4.
103. LEFER AM, TSAO PS, MA XL, SAMPATH TK. 1992. Anti-ischemic and endothelial protective actions of recombinant human osteogenic protein-1. *J Mol Cell Cardiol* 24:585-593.
104. LEMANN M, CHAMBIOT-PRIEUR C, MESNARD B, HALPHEN M, MESSING B, RAMBAUD JC, GENDRE JP, COLOMBEL JF, MODIGLIANI R. 1996. Metotrexate for the treatment of refractory Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 10:309-14.
105. LIETMAN SA, YANAGISHITA M, SAMPATH TK, REDDI AH. 1997. Stimulation of proteoglycans synthesis in explants of porcine articular cartilage by recombinant osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7). *J Bone Joint Surg* 79-A:1132-7.
106. LIN HY, WANG X-F, NG-EATON E, WEINBERG RA, LODISH HF. 1992. Expression cloning of the TGF $\beta$  type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 68:775-85.
107. LING N, YING SY, UENO N, SHIMASKI S, ESCH F, HOTTA M, GULLEMIN R. 1986. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the  $\beta$ -subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321:779-82.
108. LINKHART TA, MOHAN S, BAYLINK DJ. 1996. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF $\beta$  and BMP. *Bone* 19:1S-12S.



109. LIU Y, van KRUIJNINGEN HJ, WEST AB, CARTUN RW, CORTOT A, COLOMBEL JF. 1995. Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* 108:1396-404.
110. LOFBERG R, RUTGEERTS P, MALCHOW H, LAMERS C, DANIELSSON A, OLAISON G, JEWELL D, OSTERGAARD THOMSEN O, LORENZ-MEYER H, GOEBELL H, HODGSON H, PERSSON T, SEIDEGARD C. 1996. Budesonide prolongs time to relapse in ileal and ileocaecal Crohn's disease. A placebo controlled one year study. *Gut* 39:82-6.
111. LUCK MS, BASS P. 1993. Effect of epidermal growth factor on experimental colitis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 264:984-90.
112. LUO G, HOFFMAN M, BRONCKERS ALJ, SOHUKI M, BRADLEY A, KARSENTY G. 1995. BMP-7 is an inducer of morphogens and is also required for eye development, and skeletal patterning. *Genes Dev* 9:2808-2820.
113. LUYTEN FP, CUNNINGHAM S, MA S, MUTHUKUMARAN RG, HAMONDS WB, NEVINS WI, WOODS WI, REDDI AH. 1989. Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem* 264:13377-80.
114. LYONS K, GRAYCAR JL, LEE A, HASHIMI S, LINDQUIST PB, CHEN EY, HOGAN BLM, DERYNCK R. 1989. Vgr-1, a mammalian gene related to Xenopus Vg-1, is a member of the transforming growth factor- $\beta$  gene superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4554-8.
115. LYONS KM, JONES CM, HOGAN BLM. 1992. The DVR family in embryonic development. *Trends Genet* 7:408-12.
116. LYONS KM, PELTON RW, HOGAN BLM. 1990. Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein.2A (BMP-2A). *Development* 109:833-44.
117. LYONS KM, PELTON RW, HOGAN BLM. 1990. Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2A RNA suggest that transforming growth factor- $\beta$ -like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. *Genes Dev* 3:1657-1668.
118. MacDONALD TT, SPANCER J. 1988. Evidence that activated mucosal T cells play a role in the pathogenesis of enteropathy in human small intestine. *J Exp Med* 167:1341-9.
119. MADARA JL, STAFFORD J. 1989. Interferon- $\gamma$  directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 83:724-7.
120. MADSEN KL, TAVERNINI MM, DOYLE JSG. 1997. *Lactobacillus* sp. prevents development of enterocolitis in interleukin-10 gene deficient mice. *Gastroenterology* 112A:1030.

121. MADUZIA LL, PADGETT RW. 1997. Drosophila MAD, a member of the Smad family, translocates to the nucleus upon stimulation of the dpp pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 238:595-8.
122. MAHDI G, IZRAEL DM, HASSALL E. 1996. Cyclosporine and 6-mercaptopurine for active, refractory Crohn's colitis in children. *Am J Gastroenterol* 91:1355-9.
123. MALIAKAL JC, ASAHINA I, HAUSCHKA PV, SAMPATH TK. 1994. Osteogenic protein-1 (BMP-7) inhibits cell proliferation and stimulates the expression of markers characteristic of osteoblastic phenotype in rat osteosarcoma (17/2.8) cells. *Growth Factors* 11:227-34.
124. MANSFIELD JC, HOLDEN H, TARLOW JK, DI GIOVINE FS, McDOWELL TL, WILSON AG, HOLDSWORTH CD, DUFF GW. 1994. Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterology* 106:637-42.
125. MAO Y, KASRAVI B, NOBAEK S, WANG LQ, ADAWI D, ROOS G, STENRAM U, MOLIN G, BENGMARK S, JEPSSON B. 1996. Pectin-supplemented enteral diet reduces the severity of methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 31:558-567.
126. MARTINOVIĆ S, LATIN V, SUCHANEK E, STAVLJANIĆ-RUKAVINA A, SAMPATH KT, VUKIČEVIĆ S. 1996. Osteogenic protein-1 is produced by human fetal trophoblasts in vivo and regulates the synthesis of chorionic gonadotropin and progesterone by trophoblasts in vitro. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 34:103-9.
127. MASHIMO H, WU DC, PODOLSKY DK, FISHMAN MC. 1996. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 274:262-5.
128. MASON AJ, HAYFLICK JS, LING N, ESCH F, UENO N, YING SY, GULLEMIN R, NIALL H, SEEBURG PH. 1986. Complementary DNA sequence of ovarian follicular fluid inhibin shows precursor structure and homology with transforming growth factor- $\beta$ . *Nature* 318:659-63.
129. MASSAGUÉ J, ATISSANO L, WRANA JL. 1994. The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 4:172-8.
130. MASUCCI JD, MILTENBERGER RJ, HOFFMANN FM. 1990. Pattern-specific expression of the Drosophila decapentaplegic gene in imaginal disks is regulated by 3'cis-regulatory elements. *Genes Dev* 4:2011-23.
131. MAY GR, SUTHERLAND LR, MEDDINGS JB. 1993. Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease? *Gastroenterology* 104:1627-32.
132. MAYER L, EISENHARDT D. 1990. Lack of induction of suppressor T cells by intestinal epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 86:1255-60.



133. McCABE RP, SECRIST H, BOTNEY M, EGAN M, PETERS MG. 1993. Cytokine mRNA expression in intestine from normal and inflammatory bowel disease patients. *Clin Immunol Immunopathol* 66:52-8.
134. McCALL RD, HASKILL S, ZIMMERMANN EM, LUND PK, THOMPSON RC, SARTOR RB. 1994. Tissue interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist expression in enterocolitis in resistant and susceptible rats. *Gastroenterology* 106:960-72.
135. McDONALD NQ, HENDRICKSON WA. 1993. A structural superfamily of growth factors containing a cysteine knot motif. *Cell* 73:421-4.
136. McKUSICK VA. 1990. "Mendelian Inheritance in Man: Catalogues of Autosomal Dominant, Autosomal Recessive, and X-linked Phenotypes". 9th ed., Johns Hopkins Press, Baltimore, MD.
137. McPHERRON AC, LEE SJ. 1993. GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J Biol Chem* 268:3444.
138. MOMBAERTS P, MIZOGUCHI E, GRUSBY MJ, GLIMCHER LH, BHAN AK, TONEGAWA S. 1993. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T-cell receptor mutant mice. *Cell* 75:275-82.
139. MORRIS GP, BECK PL, HERRIDGE MS, DEPEW WT, SZEWCZUK MR, WALLACE JL. 1989. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96:795-803.
140. MOURELLE M, SALAS A, GUARNER F, CRESPO E, GARCÍA-LAFUENTE A, MALAGELADA JR. 1998. Stimulation of transforming growth factor  $\beta$ 1 by enteric bacteria in the pathogenesis of rat intestinal fibrosis. *Gastroenterology* 114:519-26.
141. MULDER TP, VAN DER SLUYS VEER A, VERSPAGET HW, GRIFFIOEN G, PENA AS, JANSSENS AR, LAMERS CB. 1994. Effects of oral zinc supplementation on metallothionein and superoxide dismutase concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 9:519-20.
142. MULLIN GE, LAZENBY AJ, HARRIS ML, BAYLESS TM, JAMES SP. 1992. Increased interleukin-2 messenger RNA in the intestinal mucosal lesions of Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Gastroenterology* 102:1620-7.
143. MURTHY S, MURTHY NS, COPPOLA D, WOOD DL. 1997. The efficacy of BAY 1015 in dextran sulfate model of mouse colitis. *Inflamm Res* 46:224-33.
144. NOHNO T, ISHIKAWA T, SAITO T, HOHOKAWA K, NOJI S, WOLSING DH, ROSENBAUM JS. 1995. Identification of human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein receptor type I. *J Biol Chem* 270:22522-6.



145. ÖZKAYNAK E, RUEGER DC, DRIER EA, CORBETT C, RIDGE RJ, SAMPATH TK, OPPERMAN H. 1990. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- $\beta$  family. *EMBO J* 9:2085-2093.
146. ÖZKAYNAK E, SCHNEGELSBERG PNJ, JIN DF, CLIFFORD GM, WARREN FD, DRIER EA, OPPERMAN H. 1992. Osteogenic protein-2: a new member of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily expressed in early embryogenesis. *J Biol Chem* 267:25220-7.
147. ÖZKAYNAK E, SCHNEGELSBERG PNJ, OPPERMAN H. 1991. Murine osteogenic protein (OP-1): high levels of mRNA in kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 179:116-23.
148. PADGETT RW, St JOHNSTON WD, GELBART WM. 1987. A transcript from a *Drosophila* pattern gene products a protein homologous to the transforming growth factor- $\beta$  family. *Nature* 325:81-84.
149. PANGANIBAN GE, REUTER R, SCOTT MP, HOFFMAN FM. 1990. A *Drosophila* growth factor homolog, decapentaplegic, regulates homeotic gene expression within and across germ layers during midgut morphogenesis. *Development* 110:1041-50.
150. PARLAKAR VM, NANDEDKAR AKN, POINTERS RH, KLEINMAN HK, REDDI AH. 1990. Interaction of osteogenin, a heparin binding bone morphogenetic protein, with type IV collagen. *J Biol Chem* 265:17281-4.
151. PEARSON DC, MAY GR, FICK GH, SUTHERLAND LR. 1995. Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease: a meta-analysis. *Ann Intern Med* 123:132-42.
152. PEH KH, WAN BYC, PARKE DV. 1989. Determination of glutathione content and myeloperoxidase activity in rat models of induced rectocolonic inflammation. *Br J Pharmacol* 97:548.
153. PERIDES G, JENSEN FE, EDGEComb P, RUEGER DC, CHARNESSE ME. 1995. Neuroprotective effect of human osteogenic protein-1 in a rat model of cerebral hypoxia/ischemia. *Neurosci Lett* 187:21-24.
154. PERR H, OH P, JOHNSON D. 1996. Developmental regulation of transforming growth factor  $\beta$ -mediated collagen synthesis in human intestinal muscle cells. *Gastroenterology* 110:92-101.
155. PLEIN K, HOTZ J. 1993. Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea – a pilot study. *Z Gastroenterol* 31:129-34.
156. PLEVY SE, TARGAN SR, YANG H, FERNANDEZ D, ROTTER JI, TOYODA H. 1996. Tumor necrosis factor microsatellites define a Crohn's disease-associated haplotype on chromosome 6. *Gastroenterology* 110:1053-60.

157. POLITO JM II, REES RC, CHILDS B, MENDELOFF AI, HARRIS ML, BAYLESS TM. 1996. Preliminary evidence for genetic anticipation in Crohn's disease. *Lancet* 347:798-800.
158. POWRIE F. 1995. T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. *Immunity* 3:171-4.
159. PRANTERA C, KOHN A, MANGIAROTTI R, ANDREOLI A, LUZI C. 1994. Antimicrobial therapy in Crohn's disease: Results of a controlled, double-blind trial with a multiple antibiotic regimen. *Am J Gastroenterol* 89:513-8.
160. PRANTERA C, ZANNONI F, SCRIBANO ML, BERTO E, ANDREOLI A, KOHN A, LUZI C. 1996. An antibiotic regimen for the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled clinical trial of metronidazole plus ciprofloxacin. *Am J Gastroenterol* 91:328-32.
161. PROCACCINO F, REINSHAGEN M, HOFFMANN P, ZEEH JM, LAKSHMANAN J, MCROBERTS JA, PATEL A, FRENCH S, EYSSELEIN VE. 1994. Protective effects of epidermal growth factor in an experimental model of colitis in rats. *Gastroenterology* 107:12-17.
162. RACHMILEWITZ D, KARMELI F, OKON E. 1995. Sulphydryl blocker - induced rat colonic inflammation is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase. *Gastroenterology* 109:98-106.
163. RACHMILEWITZ D, OKON E, KARMELI F. 1997. Sulphydryl blocker induced small intestinal inflammation in rats: a new model mimicking Crohn's disease. *Gut* 41:358-365.
164. RACHMILEWITZ D, SIMON PL, SCHWARTZ LW, GRISWOLD DE, FONDACARO JD, WASSERMAN MA. 1989. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 97:326-37.
165. RATH HC, HERFARTH HH, IKEDA JS, GRENTHER WB, HAMM TE Jr, BALISH E, TAUROG JD, HAMMER RE, WILSON KH, SARTOR RB. 1996. Normal luminal bacteria especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human  $\beta_2$  microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* 98:945-53.
166. REDDI AH. 1994. Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 4:737-44.
167. REDDI AH. 1997. BMPs: Actions in flash and bone. *Nat Med* 3:837-39.
168. REDDI AH. 1998. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 16:247-252.



169. REIBMAN J, MEIXLER S, LEE TC, GOLD LI, CRONSTEIN BN, HAINES KA, KOLASINSKI SL, WEISSMANN G. 1991. Transforming growth factor  $\beta$ 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6805-9.
170. REUTER BK, ASFAHA S, BURET A, SHARKEY KA, WALLACE JL. 1996. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 98:2076-85.
171. RICKARD DJ, HOFBAUER LC, BONDE SK, GORI F, SPELSBERG TC, RIGGS BL. 1997. Bone morphogenetic protein-6 production in human osteoblastic cell lines: selective regulation by estrogen. *J Clin Invest* 101:413-22.
172. RIPAMONTI U, REDDI AH. 1992. Growth and morphogenetic factors in bone induction: role of osteogenin and related bone morphogenetic proteins in craniofacial and periodontal bone repair. *Crit Rev Oral Biol Med* 3:1-14.
173. RIPAMONTI U, VUKIČEVIĆ S. 1995. Bone morphogenetic proteins: from developmental biology to molecular therapeutics. *S Afr J Sci* 91:277-80.
174. ROBERTS AB, SPORN MB. 1990. The transforming growth factor- $\beta$ s. In: SPORN MB, ROBERTS AB. *Peptide growth factors and their receptors*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 419-72.
175. ROSEN V, THIES RS. 1992. The BMP proteins in bone formation and repair. *Trends Genet* 8:97-192.
176. ROSENZWEIG BL, IMAMURA T, OKADOME T, COX GN, YAMASHITA H, ten DIJKE P, HELDIN CH, MIYAZONO K. 1995. Cloning and characterisation of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7632-6.
177. SACHAR DB. 1996. Chron's disease: A family affair. *Gastroenterology* 111:813-5.
178. SAMPATH TK, MALIAKAL JC, HAUSCHKA PV, JONES WK, SASAK H, TUCKER RF, WHITE K, COUGHLIN JE, TUCKER MM, PANG RHL, CORBETT C, ÖZKAYNAK E, OPPERMAN H, RUEGER DC. 1992. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem* 267:20352-62.
179. SANDBORN WJ, TREMAINE WJ. 1992. Cyclosporin treatment of inflammatory bowel disease. *Mayo Clin Proc* 67:981-90.
180. SANDBORN WJ. 1997. Preliminary report on the use of oral tacrolimus (FK506) in the treatment of complicated proximal small bowel and fistulizing Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 92:876-9.



181. SANDERSON JD, MOSS MT, TIZARD MLV, HERMON-TAYLOR J. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 33:890-6.
182. SANTOS JV, BAUDET JA, CASELLAS FJ, GUARNER LA, VILASECA JM, MALAGELADA JR. 1995. Intravenous cyclosporine for steroid-refractory attacks of Crohn's disease. Short- and long-term results. *J Clin Gastroenterol* 20:207-10.
183. SARTOR RB, DeLa CADENA RA, GREEN KD, STADNICKI A, DAVIS SW, SCHWAB JH, ADAM AA, RAYMOND P, COLMAN RW. 1996. Selective kallikrein-kinin system activation in inbred rats differentially susceptible to granulomatous enterocolitis. *Gastroenterology* 110:1467-81.
184. SARTOR RB, LICHTMAN SN. 1994. Mechanisms of systemic inflammation associated with interstitial injury. In: TARGAN SR, SHANAHAN F. *Inflammatory bowel disease: from bench to bedside*. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 210-29.
185. SARTOR RB. 1994. Cytokines in intestinal inflammation: Pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 106:533-9.
186. SARTOR RB. 1994. Treating IBD by altering luminal contents, rationale and response. In: RACHMILEWITZ D. *Inflammatory bowel disease*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp 177-91.
187. SARTOR RB. 1995. Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am* 24:475-507.
188. SARTOR RB. 1995. Microbacterial factors in the pathogenesis of Crohn's disease, ulcerative colitis, and experimental intestinal inflammation. In: KIRSNER JB, SHORTER RG. *Inflammatory bowel disease*. 4th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 96-124.
189. SARTOR RB. 1996. Cytokine regulation of experimental intestinal inflammation in genetically engineered and T-lymphocyte reconstituted rodents. *Aliment Pharmacol Ther* 2:36-42.
190. SARTOR RB. 1997. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 92:5S-11S.
191. SATSANGI J, JEWELL DP, ROSENBERG WMC, BELL JI. 1994. Genetic of inflammatory bowel disease. *Gut* 35:696-700.
192. SATSANGI J, WELSH KI, BUNCE M, JULIER C, FARRANT JM, BELL JI, JEWELL DP. 1996. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 347:1212-7.
193. SAWADA K, OHNISHI K, KOSAKA T, FUKUI S, YAMAMURA M, AMANO K, SATOMI M, SHIMOYAMA T. 1995. Leukocytapheresis therapy with leucocyte removal filter for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 30 (suppl 8):124-7.

194. SCHLUESENER HJ, MEYERMANN R. 1995. Immunolocalization of BMP-6, a novel TGF-beta-related cytokine, in normal and atherosclerotic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 113:153-156.
195. SCHMIDT C. 1993. Therapy of Crohn disease by immunomodulation with 7S immunoglobulins. *Immun Infekt* 21 (suppl 1):35-7.
196. SCHREIBER S, HEINIG T, PANZER U, REINKING R, BOUCHARD A, STAHL PD, READLER A. 1995. Impaired response of activated mononuclear phagocytes to interleukin 4 in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 108:21-33.
197. SHANANHAN F. 1994. Current concepts of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Ir J Med Sci* 163:544-9.
198. SHARON P, STENSON WF. 1984. Enhanced synthesis of leukotriene B4 by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 86:453-60.
199. SHODA R, MATSUEDA K, YAMATO S, UMEDA N. 1995. Therapeutic efficacy of N-3 polyunsaturated fatty acid in experimental Crohn's disease. *J Gastroenterol* 30 (suppl 8):98-101.
200. SINGLETON JW, HANAUER S, ROBINSON M. 1995. Quality-of-life results of double-blind, placebo-controlled trial of mesalamine in patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 40:931-5.
201. SMALL RE, SCHRAA CC. 1994. Chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical applications of mesalamine for the treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmacotherapy* 14:385-98.
202. SPARANO JA, BRANDT LJ, DUTCHER JP, DUBOIS JS, ATKINS MB. 1993. Symptomatic exacerbation of Crohn disease after treatment with high-dose interleukin-2. *Ann Intern Med* 118:617-18.
203. STACK WA, MANN SD, ROY AJ, HEATH P, SOPWITH M, FREEMAN J, HOLMES G, LONG R, FORBES A, KAMM MA, HAWKEY CJ. 1997. Randomised controlled trial of CDP571 antibody to tumor necrosis factor- $\alpha$  in Crohn's disease. *Lancet* 349:521-24.
204. STADNICKI A, DELACADENA RA, SARTOR RB, BENDER D, KETTNER CA, RATH HC, ADAM A, COLMAN RW. 1996. Selective plasma kallikrein inhibitor attenuates acute intestinal inflammation in Lewis rat. *Dig Dis Sci* 41:912-20.
205. STALLMACH A, SCHUPPAN D, RIESE HH, MATTHES H, RIECKEN EO. 1992. Increased collagen type III synthesis by fibroblasts isolated from strictures of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 102:1920-9.
206. STENSON WF. 1995. Animal model of colitis. *Curr Opin Gastroenterol* 11:310-5.



207. STORM EE, HUYNH TV, COPELAND NG, JENKINS NA, KINGSLEY DM. 1994. Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF- $\beta$  superfamily. *Nature* 368:639-42.
208. STRONG SA, WEST GA, KLEIN JS. 1992. Inflammatory cytokines stimulate proliferation of intestinal mucosa mesenchymal cells. *Gastroenterology* 102:A701.
209. STRONKHORST A, RADEMA S, YONG S-L, BIJL H, TEN BERGE IJM, TYTGAT GNJ, VAN DECENTER SJH. 1997. CD4 antibody treatment in patients with active Crohn's disease: a phase 1 dose finding study. *Gut* 40:320-27.
210. TARGAN SR, HANAUER SB, Van DEVENTER SJH, MAYER L, PRESENT DH, BRAAKMAN T, DeWOODY KL, SCHAIBLE TF, RUTGEERTS PJ. 1997. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor  $\alpha$  for Crohn's disease. *N Engl J Med* 337:1027-35.
211. TATEISHI H, MITSUYAMA K, TOYONAGA A, TOMOYOSE M, TANIKAWA K. 1997. Role of cytokines in experimental colitis: relation to intestinal permeability. *Digestion* 58:271-81.
212. TEH HS, PHILLIPS RA, MILLER RG. 1978. Quantitative studies on the precursors of cytotoxic lymphocytes. The cellular basis of the cross-reactivity of TNP-specific clones. *J Immunol* 121:1711-8.
213. ten DIJKE P, YAMASHITA H, SAMPATH TK, REDDI AH, ESTEVEZ M, RIDDLE DL, ICHIJO H, HELDIN CH, MIYAZONO K. 1994. Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 269:16985-88.
214. TERZIOGLU T, YALTI T, TEZELMAN S. 1997. The effect of prostaglandin E-1 on experimental colitis in rat. *International J Colorectal Dis* 12:63-6.
215. THOMSON AB, SADOWSKI D, JENKINS R, WILD G. 1997. Budesonide in the management of patients with Crohn's disease. *Can J Gastroenterol* 11:255-60.
216. THOMSON AB, WRIGHT JP, VATN M, BAILEY RJ, RACHMILEWITZ D, ADLER M, WILSON-LYNCH KA. 1995. Mesalazine (Mesasal/Claversal) 1.5 g.b.d.d. vs. placebo in the maintenance of remission of patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 9:673-83.
217. TJELLSTRÖM B, STENHAMMAR L, MAGNUSSON K-E, SUNDQVIST T. 1997. Oral immunoglobulin treatment in Crohn's disease. *Acta Pædiatr* 86:221-3.
218. TORSHER KJ, EMPEY LR, FEDORAK RN. 1992. Misoprostol therapy following trinitrobenzen sulfonic acid-induced colitis accelerates healing. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 45:275-81.



219. TOYODA H, WANG SJ, YANG HY, REDFORD A, MAGALONG D, TYAN D, McELREE CK, PRESSMAN SR, SHANAHAN F, TARGAN SR et al. 1993. Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 104:741-8.
220. TREMAINE WJ, SCHROEDER KW, HARRISON JM, ZINSMEISTER AR. 1994. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of the oral mesalamine (5-ASA) preparation, Asacol, in the treatment of symptomatic Crohn's colitis and ileocolitis. *J Clin Gastroenterol* 19:278-82.
221. TRIANTAFILLIDIS JK, NICOLAKIS D, EMMANOULLIDIS A, ANTONIOU A, PAPTAEODOROU K, CHERACAKIS P. 1996. Ornidazole in the treatment of active Crohn's disease: short-term results. *Ital J Gastroenterol* 28:10-4.
222. URIST MR, IWATA H, CECCOTTI PL, DORFMAN RL, BOYD SD, McDOWELL RM, CHIEN C. 1973. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3511-5.
223. URIST MR, NAKAGAWA M, NAKATA N. 1978. Experimental myositis ossificans. *Arch Pathol Lab Med* 102:312-6.
224. URIST MR. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893-9.
225. Van DEVENTER SJH, ELSON CO, FEDORAK RN. 1997. Multiple doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease: Crohn's Disease Study Group. *Gastroenterology* 113:383-9.
226. van DULLEMEN HM, van DEVENTER SJH, HOMMES DW, BIJL HA, JANSEN J, TYTGAT GNJ, WOODY J. 1995. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 109:129-135.
227. VELJAČA M, LESCH CA, PLLANA R, SANCHEZ B, CHAN K, GUGLIETTA A. 1995. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 272:417-22.
228. VILASECA J, SALAS A, GUARNER F, RODRIGUEZ R, MALAGELADA JR. 1990. Participation of thromboxane and other eicosanoid synthesis in the course of experimental inflammatory colitis. *Gastroenterology* 98:269-77.
229. VUKIČEVIĆ S, BAŠIĆ V, ROGIĆ D, BAŠIĆ N, SHIN MS, SHEPARD A, JIN D, DATTATREYAMURTY B, JONES W, DORAI H, RYAN S, GRIFFITHS D, MALIAKAL J, JELIĆ M, PASTORČIĆ M, STAVLJENIĆ A, SAMPATH TK. 1998. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischemic acute renal failure in rat. *J Clin Invest* 102:202-14.
230. VUKIČEVIĆ S, KOPP JB, LUYTEN FP, SAMPATH TK. 1996. Induction of nephrogenic mesenchyme by osteogenic protein 1 (bone morphogenetic protein-7). *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9021-9026.

231. VUKIČEVIĆ S, LATIN V, CHEN P, BATORSKY R, REDDI AH, SAMPATH TK. 1994. Localization of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) during human embryonic development: high affinity binding to basement membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 198:693-700.
232. VUKIČEVIĆ S, LUYTEN F, REDDI AH. 1989. Stimulation of the expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes in vitro by osteogenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8793-7.
233. VUKIČEVIĆ S, STAVLJENIĆ A, PEĆINA M. 1995. Discovery and clinical applications of bone morphogenetic proteins. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33:661-71.
234. WAHL SM, McCARTNEY-FRANCIS N, ALLEN JB, DOUGHERTY EB, DOUGHERTY SF. 1990. Macrophage production of TGF-beta and regulation by TGF-beta. *Ann NY Acad Sci* 593:188-96.
235. WAKEFIELD AJ, EKBOM A, DHILLON AP, PITTILO RM, POUNER RE. 1995. Crohn's disease: Pathogenesis and persistent measles virus infection. *Gastroenterology* 108:911-6.
236. WALL NA, BLESSING M, WRIGHT CVE, HOGAN BL. 1993. Biosynthesis and in vivo localization of the deapentaplegic-Vg-related protein, DVR-6 (bone morphogenetic protein-6). *J Cell Biol* 120:493-502.
237. WALLACE JL, BRAQUET P, IBBOTSON GC, MACNAUGHTON WK, CIRINO G. 1989. Assessment of the role of platelet-activating factor in an animal model of inflammatory bowel disease. *J Lipid Mediat* 1:13-23.
238. WALLACE JL, HIGA A, MCKNIGHT GW, MACINTYRE DE. 1992. Prevention and reversal of experimental colitis by a monoclonal antibody which inhibits leukocyte adherence. *Inflammation* 16:343-54.
239. WALLACE JL, KEENAN CM. Leukotriene B4 potentiates colonic ulceration in the rat. *Dig Dis Sci* 35:622-9.
240. WALLACE JL, KEENAN CM, GALE D, SHOUBE TS. 1992. Exacerbation of experimental colitis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is not related to elevated leukotriene B4 synthesis. *Gastroenterology* 102:18-27.
241. WALLACE JL, MACNAUGHTON WK, MORRIS GP, BECK PL. 1989. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 96:29-36.
242. WALLACE JL, WHITTLE BJ, BOUGHTON-SMITH NK. 1985. Prostaglandin protection of rat colonic mucosa from damage induced by ethanol. *Dig Dis Sci* 30:866-76.



243. WALLACE JL. 1988. Release of platelet-activating factor (PAF) and accelerated healing induces by a PAF antagonist in an animal model of chronic colitis. *Can J Physiol Pharmacol* 66:422-5.
244. WANG EA, ROSEN V, CORDES P, HEWICK RM, KRIZ MJ, LUXENBERG DP, SIBLEY BS, WOZNEY JM. 1988. Purification and characterization of the other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9484-8.
245. WANG EA, ROSEN V, D'ALESSANDRO JS, BAUDUY M, CORDES P, HARADA T, ISRAEL DI, HEWICK RM, KERNS KM, LAPAN P, LUXENBERG DP, McQUAID D, MOUTSATSOS IK, NOVE J, WOZNEY JM. 1990. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2220-4.
246. WEEKS DL, MELTON DA. 1987. A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere on *Xenopus* eggs codes for a growth factor related to TGF- $\beta$ . *Cell* 51:861-7.
247. WHARTON KA, THOMSEN GH, GELBERT WM. 1991. *Drosophila* 60A gene, another transforming growth factor  $\beta$  family member, is closely related to human bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9214-8.
248. WIRTH HP, ZALA G, MEYENBERGER C, JOST R, AMMANN R, MUNCH R. 1993. Alpha-interferon therapy in Crohn's disease: initial clinical results. *Schweiz Med Wochenschr* 123:1384-8.
249. WOZNEY JM, ROSEN V, CELESTE AJ, MITSOCK LM, WHITTERS M, KRIZ WR, HEWICK RM, WANG EA. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528-34.
250. WOZNEY JM. 1989. Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res* 1:267-71.
251. WOZNEY JM. 1990. The bone morphogenetic family and osteogenesis. *Mol Repr Dev* 32:160-6.
252. YAMASHITA H, TEN DIJKE P, HELDIN C-H, MIYAZONO K. 1996. Bone morphogenetic protein receptors. *Bone* 19:569-74.
253. YANG H, VORA DK, TARGAN SR, TOYODA H, BEAUDET AL, ROTTER JI. 1995. Intracellular adhesion molecule 1 gene associated with immunologic subset of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109:440-8.
254. YANG SP, SHERMAN S, DERSTINE JB, SCHONBERG SA. 1990. Holt-Oram syndrome gene may be on chromosome 20. *Pediat Res* 27:137A.



255. YOSHIKAWA H, RETTIG WJ, TAKAOKA K, ALDERMAN E, RUP B, ROSEN V, WOZNEY JM, LANE JM, HUVOS AG, GARIN-CHESA P. 1994. Expression of bone morphogenetic proteins in human osteosarcoma. Immunohistochemical detection with monoclonal antibody. *Cancer* 73:85-91.
256. ZAHAVI I, BURG Z, MARCUS H, KARMELI F, NUSINOVITZ M, DINARI G. Therapeutic effect of colloid bismuth subcitrate in experimental colitis in the rat. *Digestion* 56:211-13.
257. ZEEH JM, PROCACCINO F, HOFFMANN P, AUKERMAN SL, MCROBERTS JA, SOLTANI S, PIERCE GF, LAKSHMANAN J, LACEY D, EYSSELEIN VE. 1996. Keratinocyte growth factor ameliorates mucosal injury in an experimental model of colitis in rats. *Gastroenterology* 110:1077-1083.
258. ZHOU X, SASAKI H, LOWE L, HOGAN BLM, KUEHN MR. 1993. *Nodal* is a novel TGF- $\beta$ -like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* 361:543-7.
259. ZIMMERMANN EM, SARTOR RB, McCALL RD, PARDO M, BENDER D, LUND PK. 1993. Insulinlike growth factor I and interleukin 1 beta messenger RNA in a rat model of granulomatous enterocolitis and hepatitis. *Gastroenterology* 105:399-409.

## VIII ŽIVOTOPIS

Rođena sam 10. travnja 1964. g. u Česmi, općina Banjaluka. Osnovnu školu i Gimnaziju završila sam u Banjaluci. Godine 1987. završila sam na Medicinskom fakultetu u Banjaluci studij medicine. Obvezatni pripravnički staž obavila sam u Kliničkom bolničkom centru u Banjaluci, a 1989. g. sam u Zagrebu položila stručni ispit. Od 1989. do 1993. g. radila sam na Katedri za anatomiju Medicinskog fakulteta u Banjaluci, a od 1993. do 1995. g. na Zavodu za fizilogiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. Tijekom 1993. i 1994. pohađala sam poslijediplomske studije – Opća klinička patofizilogija na Medicinskom fakultetu u Rijeci, a magistarski rad pod naslovom “Sinus coronarius i njegovi pritoci u čovjeka i psa” obranila sam 1994. godine. Godine 1995. zapošljam se na Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta u Rijeci u svojstvu asistenta. Kao suradnik u nastavi aktivno sudjelujem u izvođenju svih oblika nastave za studente sveučilišnih i veleučilišnih studija na Zavodu za anatomiju. Godine 1997. i 1998. kao dobitnik stipendije Županije primorsko-goranske boravila sam u Laboratoriju za kalcificirana tkiva Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Suradnik sam na projektu “Izražaj gena i proteina koštanih i hrskavičnih morfogenetskih proteina u osteofitima ljudskih zglobova” kojeg vodi prof.dr.sc. Dragica Bobinac. Do sada sam publicirala 2 izvorna znanstvena rada i objavila 5 kongresnih priopćenja na međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima. Član sam Hrvatskog društva anatora i Hrvatskog društva za kalcificirana tkiva.

## POPIS UPOTRIJEBLJENIH OZNAKA I KRATICA

ALK	- od engl. activin-receptor like kinase
BMP-2-6	- od engl. bone morphogenetic protein -2-6
BMPR	- od engl. BMP receptor
CD	- od engl. Crohn's disease
CDMP	- od engl. cartilage-derived morphogenetic protein
COX	- od engl. cyclooxygenase
dpp	- od engl. decapentaplegic
DVR	- od engl. decapentaplegic-Vg-related
EGF	- od engl. epidermal growth factor
FSH	- od engl. follicle stimulating hormone
GDF	- od engl. growth/differentiation factor
GM-CSF	- od engl. granulocyte/monocyte colony stimulating factor
HETE	- od engl. hydroxyecosatetraenoic acid
IBD	- od engl. inflammatory bowel disease
ICAM.1	- od engl. intracellular adhesion molecule 1
IFN- $\gamma$	- interferon $\gamma$
IGF	- od engl. insulin-like growth factor
IL-1-4	- od engl. interleukin -1-4
IL-1ra	- od engl. interleukin-1 receptor antagonist
LTB <sub>4</sub>	- od engl. leukotriene B <sub>4</sub>
MHS	- od engl. major histocompatibility complex
MIS	- od engl. Müllerian inhibiting substance
NSAID	- od engl. nonsteroidal anti-inflammatory drug
OP-1	- od engl. osteogenic protein -1
PAF	- od engl. platelet-activating factor
PCNA	- od engl. proliferating cell nuclear antigen
PGE <sub>2</sub>	- prostaglandin E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	- prostaglandin I <sub>2</sub>
SIP	- od engl. smad interacting protein
SMA	- od engl. smooth muscle $\alpha$ -actin