

IZRAŽAJ MOLEKULA VEGF I HIF-1 α U PROCESU CIJELJENJA RANA KOŽE U CD26 DEFICIJENTNIM MIŠEVIMA

Grčić, Antonijo

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:804783>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Antonijo Grčić

**IZRAŽAJ MOLEKULA VEGF I HIF-1 α U PROCESU CIJELJENJA
RANA KOŽE U CD26 DEFICIJENTNIM MIŠEVIMA**

Diplomski rad

Rijeka, 2017.

Mentorica rada: Doc.dr.sc. Lara Batičić Pučar

Rad je najvećim dijelom izrađen na Zvodu za kemiju i biokemiju, u suradnji sa Zavodom za histologiju i embriologiju, te Zavodom za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Istraživanja su provedena u okviru Potpore Sveučilišta u Rijeci, broj 13.06.1.2.26., pod nazivom „Uloga proteina obitelji DPP IV u kroničnim bolestima“, voditeljice prof.dr.sc. Jadranke Varljen.

Završni rad obranjen je dana 14.07.2017. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Jadranka Varljen
2. Prof.dr.sc. Ester Pernjak Pugel
3. Doc.dr.sc. Lara Batičić Pučar

Rad ima 52 stranice, 24 slika, 3 tablice i 89 literaturnih navoda.

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Jadranki Varljen što mi je omogućila izradu ovog rada i mogućnost da sudjelujem u istraživanju molekule DPP IV/CD26.

Također se zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Lari Batičić Pučar koja mi je puno pomogla oko provođenja istraživanja te pisanju rada.

Hvala prof.dr.sc. Ester Pernjak Pugel na histološkim analizama preparata tkiva te interpretaciji rezultata.

SAŽETAK

Izražaj molekula VEGF i HIF-1 α u procesu cijeljenja rana kože u CD26 deficitnim miševima

Uvod: Dipeptidil-peptidaza IV, odnosno molekula CD26 (DPP IV/CD26), multifunkcionalan je protein s ulogom u imunomodulaciji, proliferaciji, migraciji, adheziji, apoptozi stanica te angiogenezi, ključnim mehanizmima u procesu cijeljenja rana. Glavni regulator angiogeneze je faktor rasta VEGF koji potiče migraciju i proliferaciju endotelnih stanica. Važan poticaj za izlučivanje VEGF-a ima podjedinica HIF-1 α transkripcijskog faktora HIF-1, čiji izražaj ovisi o hipoksiji u rani. Pretpostavka ovog istraživanja je da DPP IV/CD26 ima značajnu ulogu u procesu cijeljenja rana putem modulacije učinaka faktora uključenih u angiogenezu.

Cilj istraživanja: Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utječe li i na koji način DPP IV/CD26 na ključne čimbenike u nastanku novih krvnih žila te u regeneraciji i reparaciji tkiva. Specifični ciljevi bili su utvrditi makroskopske i mikroskopske značajke cijeljenja rana u uvjetima nedostatka DPP IV/CD26, ispitati izražaj VEGF i HIF-1 α te utvrditi lokalnu enzimsku aktivnost DPP IV/CD26 u uzorcima kože i rana pokusnih životinja tijekom procesa cijeljenja rana.

Materijal i metode: Istraživanje je obuhvatilo dva soja pokusnih životinja: CD26 deficitne (CD26^{-/-}) te miševe divljeg tipa (C57BL/6). Miševima su na dorzalnom dijelu inducirane dvije rane promjera 5 mm, a tijek cijeljenja rana pratio se u definiranim vremenskim intervalima: 2, 4, 7, 10 i 15 dana od indukcije rana makroskopskom i mikroskopskom analizom. Uzorci tkiva rana i kontrolne kože podvrgnuti su histomorfometrijskoj, patohistološkoj, imunohistokemijskoj te biokemijskoj analizi. Određivao se postotak zatvaranja rane, stupanj regeneracije koriuma, izražaj molekula VEGF i HIF-1 α te enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u tkivu kože i rana pokusnih životinja.

Rezultati: Utvrđena je različita dinamika cijeljenja rana u uvjetima nedostatka DPP IV/CD26: kod CD26^{-/-} miševa dolazi do većeg postotka zatvaranja rane, stupanj regeneracije koriuma je veći, upalna faza traje kraće, brže dolazi do reepitelizacije, proliferacija stanica je izraženija, te dolazi do bržeg formiranja ožiljkastog tkiva. Oba soja pokazuju statistički značajno manji ($p < 0,05$) izražaj HIF-1 α drugog dana cijeljenja rane u odnosu na kontrolnu kožu, ali već četvrtog dana taj je izražaj statistički značajno veći ($p < 0,05$) kod oba soja. Razlika među sojevima primijećena je četvrtog i sedmog dana gdje je vidljivo da CD26^{-/-} miševi imaju statistički značajno veći ($p < 0,05$) izražaj HIF-1 α u odnosu na divlji tip. Nadalje, kod CD26^{-/-} miševa izražaj VEGF-a je statistički značajno viši ($p < 0,05$) tijekom svih dana cijeljenja rana u odnosu na divlji tip, dok u kontrolnoj koži nema statistički značajne razlike. Enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u tkivu rana C57BL/6 miševa statistički je značajno snižena ($p < 0,05$) drugog, četvrtog i sedmog dana cijeljenja rane u odnosu na fiziološke uvjete.

Zaključak: Dobiveni rezultati potvrđuju pretpostavku da DPP IV/CD26 ima značajnu ulogu u procesu cijeljenja rane i putem modulacije izražaja VEGF i HIF-1 α , ključnih faktora angiogeneze. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razjasnio utjecaj DPP IV/CD26 na učinke ostalih čimbenika u nastanku novih krvnih žila te regeneraciji i reparaciji tkiva.

Ključne riječi: cijeljenje rana, dipeptidil-peptidaza IV, HIF-1 α , molekula CD26, VEGF

SUMMARY

Expression of VEGF and HIF-1 α During Cutaneous Wound Healing Process in CD26 Deficient Mice

Introduction: Dipeptidyl-peptidase IV, or CD26 molecule (DPP IV/CD26), is a multifunctional protein with roles in immunomodulation, proliferation, migration, adhesion, apoptosis and angiogenesis, key mechanisms in the wound healing process. The main angiogenesis regulator is VEGF, a growth factor that promotes migration and proliferation of endothelial cells. An important stimulus for the secretion of VEGF has a transcription factor HIF-1 α , a subunit of HIF-1, whose expression depends on early hypoxia. The hypothesis of this study is that DPP IV/CD26 plays a significant role in the wound healing process by modulating the effects of factors involved in angiogenesis.

Aim: The aim of this study was to determine whether and how DPP IV/CD26 modulates the activity of key factors in the formation of new blood vessels and in regeneration and repair of tissues. Specific goals were to determine macroscopic and microscopic features of wound healing in conditions of DPP IV/CD26 deficiency, to investigate the expression of VEGF and HIF-1 α , and to determine the local DPP IV/CD26 enzyme activity in skin and wound during the wound healing process.

Material and Methods: The study included two strains of experimental animals: CD26 deficient (CD26^{-/-}) and wild type mice (C57BL/6). Mice were experimentally wounded on the dorsal region with two wounds with diameters of 5 mm. The wound healing course was monitored at defined time intervals: 2, 4, 7, 10 and 15 days after wounding, by macroscopic and microscopic analysis. Wound and control skin samples were subjected to histomorphometric, pathohistological, immunohistochemical and biochemical analysis. The percentage of wound closure, the rate of corium regeneration, the expression of the VEGF and HIF-1 α molecules, and DPP IV/CD26 enzyme activity in skin and wound tissues were determined.

Results: Different wound healing dynamics was noticed in conditions of DPP IV/CD26 deficiency: in CD26^{-/-} mice a higher percentage of wound closure was noticed, the rate of corium regeneration is higher, the inflammatory phase is shorter, faster reepithelification was observed, cell proliferation is more pronounced, and the formation of scar was faster. Both strains showed statistically significantly lower ($p < 0.05$) expression of HIF-1 α on the second day of wound healing compared to the control skin, but on the fourth day this expression was statistically significantly higher ($p < 0.05$) for both strains. The difference between strains was observed on the fourth and seventh days where it was shown that CD26^{-/-} mice exhibit statistically significantly higher ($p < 0.05$) expression of HIF-1 α compared to wild type. Furthermore, in CD26^{-/-} mice the expression of VEGF is statistically significantly higher ($p < 0.05$) throughout all wound healing process compared to wild-type mice, while in the control

skin there are no statistically significant differences. DPP IV/CD26 enzyme activity in wounds of C57BL/6 mice was statistically significantly reduced ($p < 0.05$) on the second, fourth and seventh days of wound healing compared to physiological values.

Conclusion: Obtained results confirm the hypothesis that DPP IV/CD26 has a significant role in the wound healing process also by modulation of VEGF and HIF-1 α expression, which are key factors in angiogenesis. Further studies are required to clarify the effects of DPP IV/CD26 on other factors involved in the formation of new blood vessels as well as in tissue regeneration and reparation.

Keywords: CD26 molecule, Dipeptidyl peptidase IV, HIF-1 α , VEGF, wound healing

SADRŽAJ:

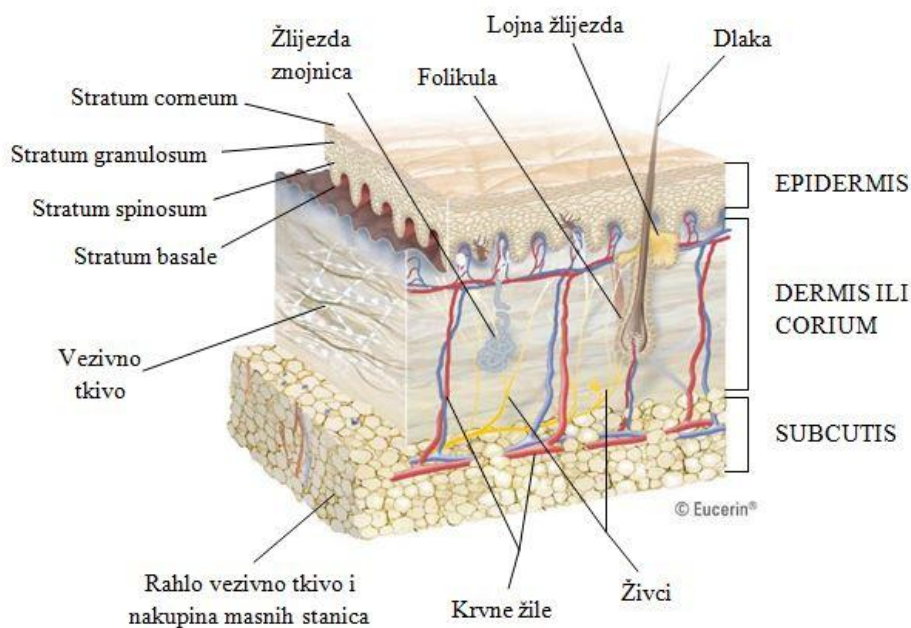
1. UVOD	1
1.1. Građa kože	1
1.2. Faze cijeljenja rana	2
1.2.1. Nulta faza - hemostaza	3
1.2.2. Faza I - upalna faza	3
1.2.3. Faza II - proliferacijska faza	5
1.2.3.1. Neovaskularizacija	6
1.2.3.2. Uloga VEGF-A i HIF-1 α u neovaskularizaciji	7
1.2.4. Faza III - faza sazrijevanja (remodeliranje)	8
1.3. Uloga endoproteaza u procesu cijeljenja rana	9
1.4. Dipeptidil-peptidaza IV/molekula CD26 (DPP IV/CD26)	10
1.4.1. Struktura građa DPP IV/CD26	11
1.4.1.1. Aktivno mjesto DPP IV/CD26	12
1.4.2. Topljiva (solubilna) DPP IV/CD26	12
1.4.3. Multifunkcionalnost DPP IV/CD26	13
1.4.3.1. Proteolitička funkcija DPP IV/CD26	13
1.4.3.2. Receptorska funkcija DPP IV/CD26	14
1.4.3.3. Uloga DPP IV/CD26 u imunomodulaciji	15
1.4.4. Obitelj DPP IV proteina	16
1.4.5. Uloga DPP IV/CD26 u procesu cijeljenja rana	17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	19
3. MATERIJAL I METODE	20
3.1. Materijal	20
3.1.1. Kemikalije i reagensi	20
3.1.2. Protutijela	20
3.1.3. Uređaji	21
3.1.4. Puferi i otopine reagensa	21
3.1.5. Laboratorijske životinje i etička načela istraživanja na životinjama	22
3.2. Metode	23
3.2.1. Plan eksperimenta	23
3.2.2. Postupak induciranja rane	23
3.2.3. Postupak mjerenja postotka zatvaranja rane	24
3.2.4. Postupak uklapanja tkivnih preparata u parafin	25
3.2.5. Postupak hematoksilin-eozin bojanja tkivnih preparata	25

3.2.6. Postupak imunohistokemijskog bojanja tkivnih preparata	26
3.2.7. Morfometrijska analiza tkivnih preparata.....	27
3.2.8. Izolacija DPP IV/CD26 iz tkiva kože	27
3.2.9. Određivanje enzimске aktivnosti DPP IV/CD26 u tkivu kože	27
3.3. Statistička obrada podataka	28
4. REZULTATI	29
4.1. Pokusni model cijeljenja rana.....	29
4.1.1. Makroskopski prikaz i postotak zatvaranja rane.....	29
4.1.2. Mikroskopski prikaz cijeljenja rana.....	30
4.1.3. Izražaj HIF-1 α tijekom procesa cijeljenja rana	33
4.1.4. Izražaj VEGF-a tijekom procesa cijeljenja rana.....	35
4.3. Enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u tkivu kože	37
5. RASPRAVA	39
6. ZAKLJUČCI	44
7. LITERATURA	45
8. ŽIVOTOPIS	52

1. UVOD

1.1. Građa kože

Koža sisavaca jest najveći organ koji omogućuje, to jest osigurava zaštitu organizma od vanjske sredine. Sastoji se od tri vrlo važna sloja: *epidermisa*, *dermisa* ili *coriuma*, te *subcutisa*. Ova tri sloja se međusobno razlikuju u građi i u funkciji. *Epidermis* je vanjski, čvrsti sloj koji je izravno izložen vanjskoj sredini, stoga ima zaštitničku ulogu. Sastoji se od bazalnih keratinocita koji stvaraju barijeru koja omogućuje zaštitu kože od vanjskih utjecaja. Također, unutar epidermisa nalaze se još melanociti (pigmenti kože), te Langerhansove stanice (tim imunosnih stanica) i Merkelove stanice (receptorske stanice). *Dermis* ili *corium* je unutarnji, deblji sloj koji se nalazi između *epidermisa* i *subcutisa*. Sastoji se od vezivnog tkiva koje je bogato kolagenim, elastičnim i retikularnim vlaknima, te međustaničnom tvari. Osim toga, unutar dermisa nalaze se krvne i limfne žile, živci, osjetna tjelešca, stalne i upalne stanice, folikuli dlaka, znojne žlijezde i žlijezde lojnice. Uloga ovog sloja jest da osigurava hranu i kisik, te uklanja strane čestice kao što su mikroorganizmi te otpad epidermalnih i dermalnih stanica. *Subcutis* je potkožje koje je povezano s podlogom, a sastoji se od rahlog vezivnog tkiva i nakupine masnih stanica, te ima termoregulacijsku ulogu (1). Kako koža služi kao zaštitna barijera, bilo kakvo oštećenje kože se mora brzo i učinkovito popraviti, a to omogućuje proces cijeljenja rana (2).

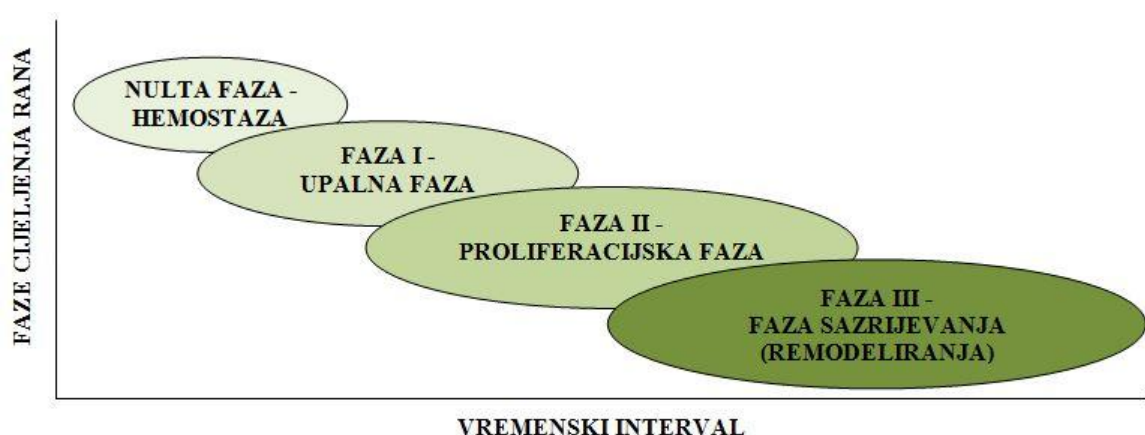


Slika 1. Građa kože; izvor¹

¹ Eucerin: www.eucerin.hr/o-kozi/osnovni-podaci-o-kozi/struktura-i-funkcija-koze

1.2. Faze cijeljenja rana

Mehaničko djelovanje na koži može uzrokovati njeno oštećenje, odnosno može nastati rana. Ako je koža rastrgana, izrezana ili probijena, onda dolazi do nastanka otvorene rane kod koje je oštećen *epidermis* i *dermis*. Kao posljedica tog oštećenja, unutar slojeva kože dolazi do interakcije između epidermalnih i dermalnih stanica te upalnih stanica što dovodi do pokretanja složenog procesa cijeljenja rana u kojem se odvijaju različite stanične i biokemijske reakcije koje omogućuju oporavak oštećenog tkiva (3, 4).



Slika 2. Shematski prikaz faza cijeljenja rana

Proces cijeljenja rana se odvija u nekoliko vremenski ovisnih, preklapajućih (Slika 1) i precizno programiranih faza (Tablica 1). U vrlo kratkom vremenskom periodu nakon nastanka rane, prvo dolazi do stvaranja krvnog ugruška, odnosno do uspostave hemostaze (nulta faza), a zatim započinje upalna faza (faza I). Na upalnu fazu nadovezuje se proliferacijska faza (faza II) nakon koje slijedi faza sazrijevanja, to jest faza remodeliranja (faza III). Sve navedene faze moraju se pojaviti u odgovarajućem slijedu i u vremenskom okviru kako bi cijeljenje rane bilo što uspješnije. Pošto se faze djelomično preklapaju i vremenski su ovisne, svaki prekid ili produživanje pojedinog procesa u nekoj fazi može dovesti do zakašnjelog zacjeljivanja ili do pojave kronične rane koja ne može zacijeliti (4, 5). Neki od faktora koji mogu uzrokovati poteškoće u procesu cijeljenja rane su: infekcija u području rane, strano tijelo u rani, stres, ishemija, dijabetes, te spol i dob (5). Kako liječenje rane još uvijek predstavlja veliki izazov u medicini, mnoga istraživanja su usmjerena upravo k razvoju novih terapijskih metoda i razvoju tehnologija za što uspješnije liječenje akutnih i kroničnih rana (4).

Tablica 1. Prikaz događaja u procesu cijeljenja rana; izvor (5)

FAZA	STANIČNI I BIOFIZIOLOŠKI DOGAĐAJI
Nulta faza - hemostaza	Agregacija i degranulacija trombocita, stvaranje krvnog ugruška
Faza I - upalna faza	Migracija neutrofila, migracija monocita i diferencijacija u makrofage, migracija limfocita
Faza II - proliferacijska faza	Reepitelizacija, fibroplazija, angiogeneza, stvaranje ekstracelularnog matriksa
Faza III - faza sazrijevanja	Remodeliranje ekstracelularnog matriksa, remodeliranje kolagena

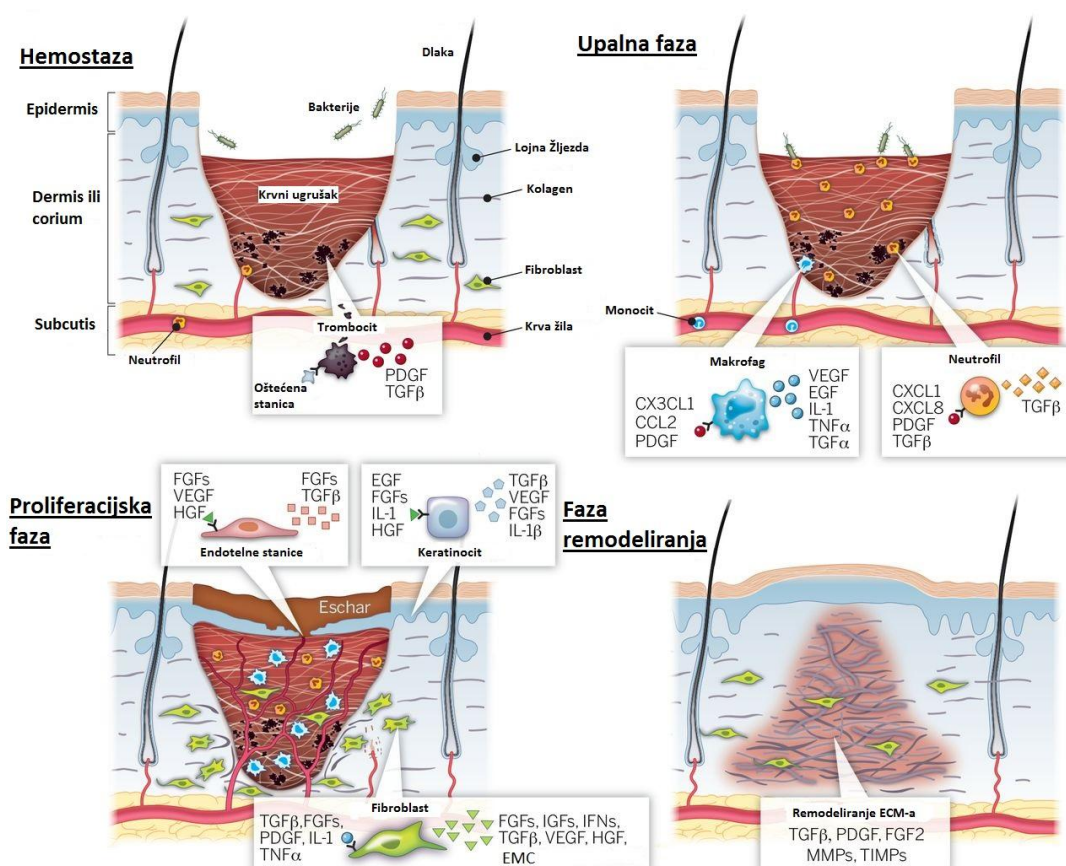
1.2.1. Nulta faza - hemostaza

Odmah nakon oštećenja kože dolazi do uspostave hemostaze (nulte faze). Zbog nastalog oštećenja u *epidermisu* i *dermisu* dolazi do narušavanja strukture krvnih žila što dovodi do povećanog priljeva trombocita koji dolazi u kontakt s kolagenom i drugim tvarima prisutnima u ekstracelularnom matriksu *dermisa*. Taj kontakt s kolagenom potiče trombocite u izlučivanju faktora zgrušavanja koji zatim dovode do njihove agregacije, što naposljetku omogućuje nastanak krvnog ugruška, odnosno fibrinskog ugruška. Fibrinski ugrušak služi kao zaštitna barijera i pripremni matriks, a sastoji se od mreže fibrina i proteina ekstracelularnog matriksa kao što su fibronektin, vitronektin i trombospodin. Glavna uloga mu je zaustavljanje krvarenja i zaštita rane od moguće infekcije. Kao pripremni matriks, predstavlja prostor u rani gdje će se odvijati svi ključni događaji procesa cijeljenja rane. Kao matrica služi za migraciju upalnih stanica i kao rezervoar faktora rasta koji su neophodni u daljnjim fazama reparacije i regeneracije tkiva (2, 6, 7).

1.2.2. Faza I - upalna faza

Trombociti, osim što imaju ulogu u stvaranju fibrinskog ugruška, također imaju i ulogu u izlučivanju signalnih tvari kao što su faktori rasta. Njihovom degranulacijom oslobađaju se sljedeći faktori rasta: EGF (engl. *epidermal growth factor*), PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*) i TGF- β (engl. *transforming growth factor- β*) (8). Izlučivanje navedenih faktora je vrlo bitno jer potiču migraciju upalnih stanica u područje rane, čime započinje upalna faza (faza I). Prve upalne stanice koje dolaze u područje rane jesu neutrofili koji su privučeni kemotaktičnim djelovanjem PDGF-a zajedno s proupalnim citokinima kao što je interleukin-1 (IL-1). Uloga neutrofila jest fagocitoza mikroorganizma, stranih čestica i oštećenog tkiva. Upravo njihova fagocitotna aktivnost je od ključne važnosti za normalno odvijanje cijelog procesa jer sprječava da dođe do infekcije. Naime, njihova se aktivnost postupno smanjuje

tijekom upalne faze te se zamjenjuju monocitima koji su također kemotaktički privučeni od strane PDGF-a, a pod utjecajem TGF- β monociti se diferenciraju u makrofage koji povećavaju upalni odgovor. Oni nastavljaju fagocitozu preostalih mikroorganizama te drugih proupalnih stanica. Osim toga, makrofazi iniciraju razvoj granulacijskog tkiva tako da izlučuju razne proupalne citokine kao što su IL-1 i IL-6, te faktore rasta EGF, FGF (engl. *fibroblast growth factor*), PDGF i TGF- β (9, 10). Za razliku od neutrofila i makrofaga, limfociti T migriraju u područje rane tek pri kraju faze I kemotaktičnim djelovanjem IL-1, a zatim vrhunac migracije postižu tijekom faze II i III. Naime, njihova uloga u procesu cijeljenja rana nije još u potpunosti razjašnjena, ali neka istraživanja upućuju da limfociti T poboljšavaju vazodilataciju i propusnost krvnih žila, te modeliraju funkciju fibroblasta, što je od velike važnosti za fazu II. Također se navodi da limfociti T utječu i na sintezu kolagena tijekom faze II i III (5, 11, 12). Neka istraživanja upućuju na činjenicu da smanjena koncentracija ili nedostatak limfocita T može utjecati na zacjeljenje rana. Provedeno je istraživanje na miševima kojima nedostaju limfociti T, te se pokazalo da se kod takvih miševa stvaranje ožiljaka smanjuje u odsutnosti limfocita (13).



Slika 3. Faze cijeljenja rana; izvor²

² Pinterest: www.pinterest.com/explore/wound-healing/

Kako se postupno upalna faza privodi kraju, smanjuje se lučenje citokina i faktora rasta pa se time smanjuje i broj neutrofila koji se zamjenjuju makrofazima koji koordiniraju početak proliferacijske faze (faze II). Glavna uloga upalne faze jest sprječavanje infekcije, čišćenje rane i aktivacija događaja vezanih za fazu II (10).

1.2.3. Faza II - proliferacijska faza

Proliferacijsku fazu (fazu II) karakteriziraju sljedeći procesi: reepitelizacija (proces zatvaranja rane), fibroplazija (sinteza kolagena) i angiogeneza (stvaranje novih krvnih žila iz postojećih). Navedeni procesi su regulirani faktorima rasta od kojih su najvažniji PDGF, TGF- β i VEGF-A (engl. *vascular endothelial growth factor-A*), ali također ključne uloge imaju i EGF i FGF (14). PDGF obuhvaća obitelj homo- ili heterodimernih faktora rasta u koje ubrajamo: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-CC i PDGF-DD. On je prvi faktor rasta koji pokazuje kemotaktično svojstvo, te ima ulogu u svim fazama cijeljenja rana. U obitelj TGF- β ubrajamo: TGF- β 1-3, BMP (engl. *bone morphogenic protein*) i aktivin. TGF- β 1-3 su glavni oblici koje pronalazimo kod sisavaca, ali jedino je TGF- β 1 najzastupljeniji u koži za vrijeme procesa cijeljenja rana. Od članova FGF obitelji, u procesu cijeljenja rana važni su bFGF (engl. *basic fibroblast growth factor*; FGF-2), KGF-1 (engl. *keratinocyte growth factor-1*; FGF-7) i KGF-2 (FGF-10). KGF-1 i KGF-2 imaju važnu ulogu u reepitelizaciji, dok bFGF u angiogenezi. Glavni članovi EGF obitelji koji sudjeluju u procesu cijeljenja rana su: EGF, TGF- α (engl. *transforming growth factor- α*) i EGF-HB (heparin-vezujući EGF). Sva tri člana sudjeluju u procesu reepitelizacije i formiranju granulacijskog tkiva (7, 9).

Prisutnost makrofaga u rani označava da se faza I privodi kraju i da započinje faza II. Makrofazi za vrijeme upalne faze izlučuju PDGF i TGF- β 1 koji u područje rane privlače fibroblaste i stanice glatkih mišića. Zatim, pod utjecajem TGF- β 1, fibroblasti stvaraju granulacijsko tkivo i ekstracelularni matriks koji dalje omogućuju odvijanje svih procesa faze II (6, 10). U formiranju granulacijskog tkiva sudjeluju i novonastale krvne žile koje opskrbljuju rastuće tkivo hranjivim tvarima i kisikom. Stvaranje novih krvnih žila se postiže angiogenezom koju iniciraju faktori rasta bFGF i TGF- β 1 koje izlučuju makrofazi, te faktor rasta VEGF-A kojeg oslobađaju makrofazi, trombociti i fibroblasti (6, 9, 14).

Uz stvaranje ekstracelularnog matriksa, također dolazi i do sinteze kolagena od strane fibroblasta koji je stimuliran s TGF- β 1. Kolagen tipa III i I od velike su važnosti tijekom procesa cijeljenja rana. Najprije se sintetizira kolagen tipa III koji je potreban u fazi II, a zatim kolagen tipa I koji je potreban u fazi III. Zajedno s kolagenom dolazi i do sinteze elastina, proteoglikana i fibronektina. Dok s jedne strane TGF- β 1 stimulira funkciju fibroblasta, s druge strane utječe na proteaze tako što smanjuje njihovu sekreciju i stimulira tkivni inhibitor metaloproteaza (TIMP, engl. *tissue inhibitor of metal protease*), te na taj način utječe na

povećanje proteina u matriksu (6, 15). Istovremeno dok se odvijaju navedeni procesi, također se odvija i reepitelizacija. Utjecajem EGF-a, TGF- α , EGF-HB, KGF-a i TGF- β 1 dolazi do migracije i proliferacije epitelnih stanica, odnosno keratinocita koji zatim migriraju preko ekstracelularnog matriksa te započinju proces zatvaranja rane. U tome im također pomažu i fibroblasti koji djelovanjem PDGF-a i TGF- β 1 pretvaraju se u miofibroblaste koji se poravnavaju duž granica ekstracelularnog matriksa te uzrokuju sužavanje i time olakšavaju zatvaranje rane. Kada se postigne zatvaranje rane, keratinociti prolaze kroz stratifikaciju i diferencijaciju kako bi se mogla ponovno uspostaviti barijera kože (2, 9).

1.2.3.1. Neovaskularizacija

Neovaskularizacija je jedan od važnijih komponenti mnogih fizioloških i patoloških procesa. Pomoću neovaskularizacije nastaju nove krvne žile koje opskrbljuju tkivo s hranjivim tvarima i kisikom. Neophodna je za reprodukciju i embrionalni razvoj, potiče preživljavanje tkiva nakon ishemijskih događaja, te pomaže u popravku oštećenih tkiva (16). Razlikujemo dva glavna mehanizma neovaskularizacije: vaskulogenezu i angiogenezu. Vaskulogeneza je *de novo* stvaranje novih krvnih žila pomoću endotelnih praroditeljskih stanica (EPC, engl. *endothelial progenitor cells*) koje dolaze iz koštane srži. Ugradnjom, proliferacijom i diferencijacijom EPC-a u endotelnim stanicama, formiraju se nove funkcionalne krvne žile koje će omogućiti normalan krvotok u tkivima. Iako je poznato da se i vaskulogeneza i angiogeneza pojavljuju tijekom cijeljenja rana, mnoga istraživanja su više usmjerena na proces angiogeneze kao češći mehanizam neovaskularizacije u cijeljenju rana (17).

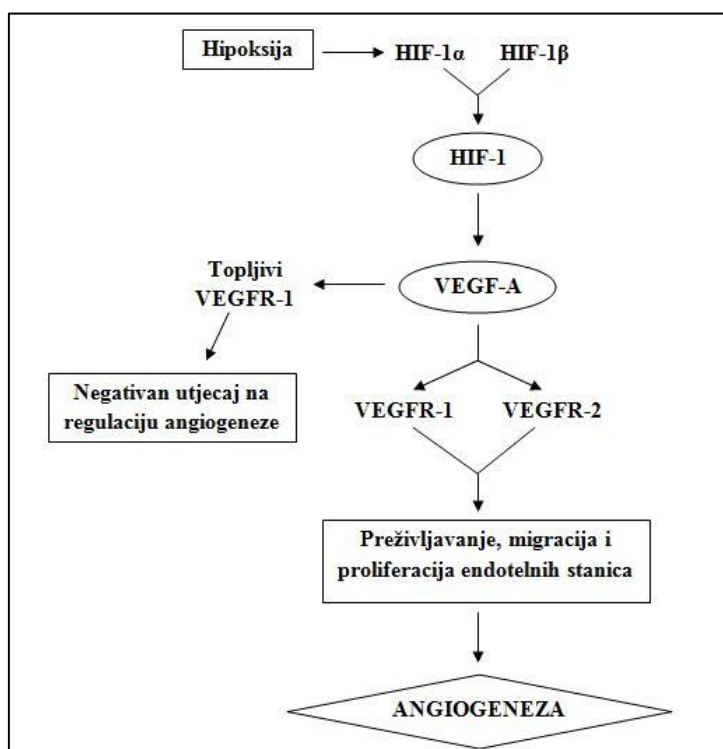
Jedan od ključnijih procesa cijeljenja rana jest angiogeneza pomoću koje se stvaraju nove krvne žile iz prethodno postojećih. Novoformirano tkivo zahtjeva vaskularizaciju kako bi bilo opskrbljeno hranjivim tvarima i kisikom. Kako se postupno stvara granulacijsko tkivo, tako dolazi do sve većeg stvaranja novih krvnih žila u *dermisu* pomoću angiogeneze. Ključni faktori rasta koji potiču angiogenezu su bFGF, TGF- β 1 i VEGF-A (14, 17). Do njihovog izlučivanja dolazi zbog velike metaboličke aktivnosti koja uzrokuje hipoksiju, odnosno manjak kisika, i manjak hranjivih tvari u tkivu. bFGF, TGF- β 1 i VEGF-A utječu na proliferaciju endotelnih stanica koje se u tračcima šire iz postojećih krvnih žila prema mjestu izlučivanja faktora rasta. U svakom tračku dolazi ponovno do proliferacije endotelnih stanica sve dok se ne stvore cjevaste tvorbe. Nastale cjevaste tvorbe iz različitih postojećih krvnih žila se zatim spajaju i time tvore kapilarnu petlju kroz koju počinje protjecati krv. Nakon što su se stvorile nove krvne žile, u njihovu stijenku useljavaju se glatke mišićne stanice i tamo mogu nastati nove arteriole ili veće arterije (18).

1.2.3.2. Uloga VEGF-A i HIF-1 α u neovaskularizaciji

VEGF-A i bFGF su najvažnije proangiogene molekule u koži jer potiču migraciju i proliferaciju endotelnih stanica što omogućuje stvaranje novih krvnih žila. Neka istraživanja čak upućuju da VEGF-A i bFGF djeluju sinergistički u poticanju angiogeneze (19). VEGF-A je heterodimerni heparin-vezujući protein molekulske mase 45 kDa. Član je VEGF obitelji u koju još ubrajamo VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E i PLGF (engl. *placenta growth factor*). Svi oni vrše svoju biološku funkciju povezivanjem na tri različita transmembranska receptora tirozin-kinaze (VEGFR-1, VEGFR-2 i VEGFR-3) koji se nalaze na površini endotelnih stanica krvnih žila (7, 17). Za VEGF-A je dokazano u *in vivo* i *in vitro* uvjetima, da je glavni regulator neovaskularizacije, te je sposoban vezati se na dva receptora i to na VEGFR-1 i VEGFR-2 (7). Od navedena dva receptora, istraživanja su dokazala da je VEGFR-2 važniji u smislu kontrole funkcije endotelnih stanica i regulacije angiogeneze zbog njegove nadmoćne sposobnosti stimulacije niza signalnih kaskada. S druge strane, VEGFR-1 ima veći afinitet vezanja VEGF-A, te se može pojaviti u membranskom i topljivom obliku. Topljivi oblik VEGFR-1 sadrži izvanstaničnu ligand-vezujuću domenu, ali joj nedostaje transmembranska i signalna domena. Stoga, topljivi oblik VEGFR-1 može imati negativni utjecaj na regulaciju angiogeneze jer zbog jačeg svojstva vezanja VEGF-A onemogućuje njegovu interakciju s membranskim oblicima VEGFR-1 i VEGFR-2 (17).

VEGF-A, tijekom nulte faze, najprije oslobađaju trombociti, a zatim u fazi I ga oslobađaju makrofazi zajedno s TNF- α (engl. *tumor necrosis factor- α*). Njegovu daljnju ekspresiju iz keratinocita i fibroblasta u fazi II potiče TNF- α . Također, na pojačanu ekspresiju VEGF-A utječu i drugi citokini i faktori rasta među kojima su TGF- β 1, EGF, TGF- α , KGF, bFGF, PDGF-DD i IL-1 β . Naime, glavni poticaj za oslobađanje VEGF-A je hipoksija nastala zbog metaboličkih poremećaja u rani (9). Pojava hipoksije u rani uzrokuje aktivaciju transkripcijskog faktora HIF-1 (eng. *hypoxia-inducible factor-1*) koji aktivira transkripcijski gen za VEGF u hipoksičnim stanicama (20). On je heterodimerni protein sastavljen od α i β podjedinice. Uloga HIF-1 ovisi o HIF-1 α podjedinici jer njegova ekspresija i funkcija ovisi o koncentraciji kisika, dok se HIF-1 β podjedinica konstitutivno eksprimira neovisno o pojavi hipoksije (21). HIF-1 α podjedinica ima ključnu ulogu u procesu cijeljenja rana jer ukoliko dođe do njezine inhibicije ili nedostatka onda može doći do defekta u procesu cijeljenja rana (22). Kada se unutar stanice pojavi hipoksija, dolazi do ekspresije HIF-1 α podjedinice unutar citoplazme koja zatim ulazi u jezgru gdje se veže na HIF-1 β podjedinicu i tako formira aktivirani HIF-1 koji promiče ekspresiju ciljnih gena kao što su geni za VEGF i SDF-1 (engl. *stromal cell-derived factor 1*) (23). Vezanjem HIF-1 na 5' kraju VEGF gena dovodi do sinteze VEGF mRNA koja se unutar jezgre veže za HuR (engl. *human antigen R*) i druge proteine koji inhibiraju njezinu degradaciju u hipoksičnim uvjetima. Zatim, VEGF mRNA prelazi u

citoplazmu gdje dolazi u interakciju sa IRES-om (engl. *internal ribosome entry site*) što omogućuje sintezu VEGF-A. Sintetizirani VEGF-A izlazi iz citoplazme u izvanstanični prostor gdje se veže za svoje receptore VEGFR-1 i VEGFR-2 koji se nalaze na endotelnim stanicama (20). Na taj način VEGF-A potiče angiogenezu te se unutar rane uspostavlja mikrocirkulacija. Kada se koncentracija kisika unutar rane vrati u normalu, kisik se veže na HIF-1 α i dolazi do blokiranja sinteze VEGF-A (6). U nehipoksičnim ranama, aktivnost HIF-1 je regulirana proupalnim citokinima kao što su IL-1 i TNF- α , te je tako osiguran mehanizam sinteze VEGF-A u takvim ranama (20).



Slika 4. Shematski prikaz regulacije angiogeneze

1.2.4. Faza III - faza sazrijevanja (remodeliranja)

Završna faza cijeljenja rana, faza sazrijevanja, odnosno remodeliranja (faza III), započinje kada je proces stvaranja ekstracelularnog matriksa na vrhuncu i kada se reepitelizacija privodi kraju (24). U fazi III dolazi do potpune normalizacije epidermalnog sloja i konačnog formiranja novog tkiva, to jest nastaje ožiljak u području *dermisa*. Ova faza je regulirana mehanizmima koji održavaju osjetljivu ravnotežu između razgradnje i sinteze (25). Remodeliranjem ekstracelularnog matriksa dolazi do sinteze kolagena tipa I, dok se kolagen tipa III i fibronektin razgrađuju. Znači, sazrijevanje ekstracelularnog matriksa se postiže zamjenom kolagena tipa III koji je nastao tijekom faze II s kolagenom tipa I koji je fiziološki

građevni element zdrave kože (24). Sljedeći korak faze III jest organizacija, odnosno remodelacija kolagena tipa I u snopove koji mogu vratiti približno do 80 % izvorne čvrstoće tkiva (24, 25). Čvrstoća nastalih snopova se postiže stvaranjem kovalentnih veza između vlakana, a u stvaranju tih kovalentnih veza pomaže prisutnost askorbinske kiseline (vitamina C). Što je veća koncentracija askorbinske kiseline, to se više stvara kovalentnih veza što rezultira jačom čvrstoćom kolagenih snopova. Također, bitnu ulogu u fazi III imaju i elastična vlakna, odnosno elastin koji vraća elastičnost vezivnog sloja kože i stijenki krvnih žila (15). Uz remodelaciju ekstracelularnog matriksa i kolagena, dolazi do apoptoze raznih tipova stanica prisutnih u rani i zaustavlja se rast krvnih žila što dovodi do smanjenje metaboličke aktivnosti u području rane. Konačni cilj ove faze jest potpuno sazrijevanje ožiljka koji ima visoku čvrstoću te se u njemu nalazi manji broj stanica i krvnih žila. Također, treba napomenuti, da ova faza može trajati veoma dugo za razliku od ostalih faza. Taj vremenski interval može trajati nekoliko tjedana ili čak nekoliko godina (24, 25).

1.3. Uloga endoproteaza u procesu cijeljenja rana

U regulaciji različitih procesa cijeljenja rana važnu ulogu imaju tri glavne skupine endoproteaza: metaloproteaze (osobito MMP, engl. *matrix metalloproteinases*), katepsin-cistein proteaze i serinske proteaze. Aktivnost ovih endoproteaza je kontrolirana specifičnim mehanizmima aktivacije i specifičnim inhibitorima od kojih su najvažniji TIMP-ovi, cisteini i inhibitori serinskih proteaza poznatih pod nazivom serpini. Većina ovih endoproteaza djeluje na površini stanica zbog toga što sadrže membranu ili domenu vezanja za površinu stanice ili zato što dolaze u interakciju sa specifičnim receptorima na površini stanice (26). Najvažniji članovi metaloproteaza koji ima bitnu ulogu u procesu cijeljenja rana jesu MMP-ovi koji olakšavaju migraciju stanica, razgrađuju proteine, sudjeluju u stvaranju granulacijskog tkiva i krvnih žila, utječu na remodeliranje ekstracelularnog matriksa i djeluju na neke faktore rasta (27). Glavni inhibitor MMP-ova jesu TIMP-ovi, te se za njih pokazalo da osim što inhibiraju MMP-ove, također neovisno o njima mogu utjecati na angiogenezu. Istraživanja provedena u *in vivo* i *in vitro* uvjetima, pokazuju da TIMP-2 može prekinuti migraciju i proliferaciju endotelnih stanica (28, 29), dok TIMP-3 može blokirati vezanje VEGF-A na receptor VEGFR-2 i time mu onemogućuje poticaj angiogeneze (30). Druga skupina endoproteaza koje sudjeluju u procesu cijeljenja rana su katepsin-cistein proteaze koje su prvenstveno poznate kao lizosomalni enzimi, ali novi podaci upućuju da imaju ulogu u obradi antigena pomoću limfocita T, u staničnoj invaziji i apoptozi stanica, remodeliranju ekstracelularnog matriksa, a utječu i na proces angiogeneze (26).

Serinske proteaze predstavljaju vrlo veliku obitelj proteaza čiji članovi imaju širok spektar različitih funkcija. Unutar te značajne obitelji, bitnu ulogu u procesu cijeljenja rana ima obitelj DPP IV proteina koju čine: dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV/CD26), protein aktivacije fibroblasta (FAP, engl. *fibroblast activation protein*), te dipeptidil-peptidaza 8 i 9 (DPP8 i DPP9) (26, 31). Od navedenih članova, značajniju ulogu u procesu cijeljenja rana ima DPP IV/CD26 jer je prethodno pokazano kako utječe na proliferaciju, migraciju i preživljavanje stanica, te na proces angiogenze, ali pokazuje i neuroimunomodulacijska svojstva (31, 32).

1.4. Dipeptidil-peptidaza IV/molekula CD26 (DPP IV/CD26)

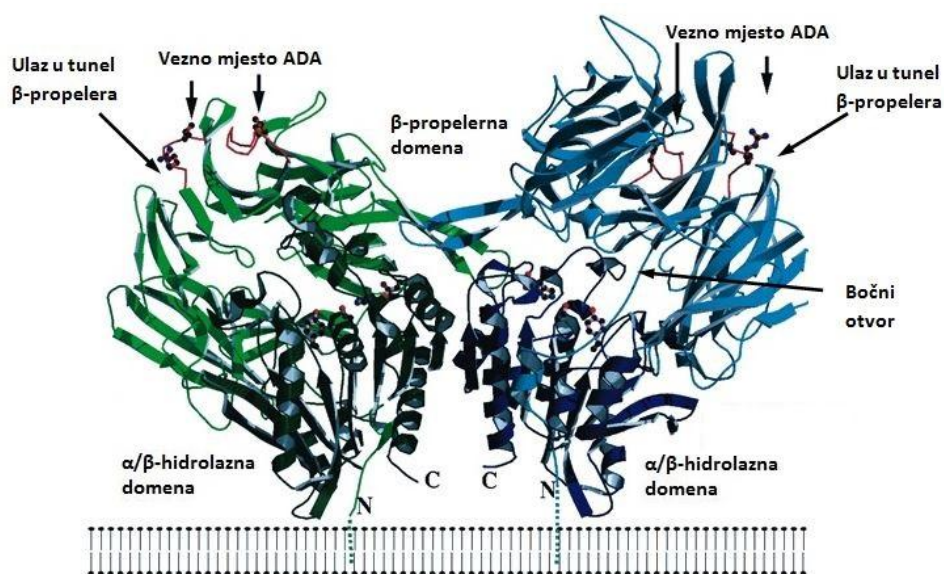
Dipeptidil-peptidaza IV, odnosno molekula CD26, član je obitelji DPP IV proteina koja čini podskupinu velike obitelji prolil-oligopeptidaza (POP) (31). Serinska je proteaza stanične površine koja cijepa dipeptide s N-terminalnog dijela proteinskog lanca s prolinom ili alaninom na preposljednjem mjestu u aminokiselinskoj sekvenci (33). Prvi put je ova molekula otkrivena i opisana 1966. godine kada su V. K. Hopsu-Havu i G. G. Glenner otkrili novi enzim histokemijskim ispitivanjima u bubregu štakora (34), a zatim i u drugim tkivima. Otkrivena je pomoću glicil-prolil- β -naftilamid kao supstrata iz kojeg je enzim oslobodio naftilamin cijepanjem veze između glicina i prolina. To istraživanje je pokazalo da se radi o novoj dipeptidil-peptidazi koja je u početku bila poznata kao dipeptidil-naftilamidaza, a kasnije kao dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV) (35). Sljedeće istraživanje provedeno 1977. godine dokazalo je da je DPP IV izražen na određenih skupinama limfocita T (36), a zatim 1978. godine utvrđeno je da je DPP IV identičan limfocitnom površinskom antigenu CD26 (37). Također je još dokazano 1985. godine da DPP IV/CD26 služi kao receptor za kolagen i fibronektin (38), 1993. godine da nastaje kompleks između DPP IV/CD26 i adenozin-deaminaze (ADA) (39), te 2001. godine povezivanje DPP IV/CD26 s tirozin-fosfatazom (CD45) (40).

Prvi uvid u primarnu strukturu DPP IV/CD26 omogućila je štakorska cDNA koja je klonirana i sekvencirana 1989. godine (41). Nekoliko godina poslije, točnije 1992. godine, izolirana i sekvencirana je cDNA koja kodira humani DPP IV/CD26, odnosno transmembranski protein tipa II molekulske mase 110 kD (42). Humani gen za DPP IV/CD26 obuhvaća 82,301 kb dužeg kraka drugog kromosoma (2q24.3) od 162,848751 Mb do 162,931052 Mb, te sadrži 26 egzona u rasponu od 45 bp do 1,4 kb koji se svi prepisuju u mRNA, a mjesto za prepoznavanje serina nalazi se između ekzona 21 i 22 (43). Naime, prepisana mRNA ne sadrži TATA box ni CAAT box na 5' kraju nego ima područje veličine oko 300 bp koje je bogato citozinom i gvaninom (oko 72 %) pa to predstavlja potencijalno mjesto za vezanje transkripcijskih faktora kao što su NK κ B, AP2 i Sp1 (44). Na temelju

sekvencirane cDNA, utvrđeno je da polipeptidni lanac DPP IV/CD26 sadrži 766 aminokiselina od kojih 22 aminokiseline (VLLGLLGAAALVTIITVPVLL) čine transmembransku hidrofobnu domenu na koju se nastavlja kratki intercelularni, hidrofilni ostatak sastavljen od svega 6 aminokiselina (MKTPWK) na N-terminalnom kraju polipeptidnog lanca, dok preostalih 738 aminokiseline sadrže devet potencijalnih N-glikozilacijskih mjesta (45).

1.4.1. Strukturna građa DPP IV/CD26

Najčešći oblik strukturne građe transmembranske DPP IV/CD26 jest dimer koji je sastavljen od dvije jedinice monomera od kojih svaka sadrži dvije podjedinice i to: α/β -hidrolaznu domenu i β -propelernu domenu (Slika 5). Svaka domena ima svoju karakterističnu građu i funkciju (46). β -propelerna domena se nalazi na N-terminalnom kraju i sastoji se od osam ploča koje su sastavljene od četiri antiparalelna lanca β -nabrane ploče. Ova domena ima karakterističan ljevkast oblik koji izgleda poput tunela. Taj tunel se proteže kroz cijelu domenu do aktivnog mjesta koje se nalazi u α/β -hidrolaznoj domeni (47). α/β -hidrolazna domena se nalazi na C-terminalnom kraju i građena je od osam β -nabranih ploča koje su sastavljene od šest paralelnih i dva antiparalelna lanca. Tih osam β -nabranih ploča čine središnju β -nabranu ploču koja je povezana s nekoliko α -uzvojnica. Povezivanje β -nabrane ploče s C-terminalnom α -uzvojnicom pomoću disulfidnog mosta između Cys-649 i Cys-762 pridonosi stabilizaciji tercijarne strukture. Također, unutar β -propelerne domene nalazi se puno cisteina koji stvaraju disulfidne mostove unutar same domene i time također pridonose stabilizaciji tercijarne strukture (46).



Slika 5. Strukturna građa DPP IV/CD26; izvor (43)

1.4.1.1. Aktivno mjesto DPP IV/CD26

Kako je već navedeno, u α/β -hidrolaznoj domeni se nalazi aktivno mjesto s reaktivnim skupinama sljedećih aminokiselina koje čine katalitičku trijadu: Ser-630 (serin), His-740 (histidin) i Asp-708 (asparginska kiselina), pa se zbog toga ova domena još naziva katalitička domena (46). Veliki značaj za katalitičku aktivnost DPP IV/CD26 ima tirozinski ostatak koji se nalazi u katalitičkoj domeni, ali također se pokazalo da sudjeluje i u stabilizaciji intermedijarnih oblika supstrata (48). Glavna funkcija β -propelerne domene je kontrola pristupa aktivnom mjestu. Da supstrat dođe do aktivnog mjesta prvo mora proći kroz tunel β -propelera ili kroz bočni otvor (Slika 5). Kada supstrat dođe do aktivnog mjesta, DPP IV/CD26 ga hidrolitički razgrađuje, a nastali produkt zatim napušta to mjesto tako da ulazni i izlazni put nisu uvijek jednaki. Također je bitno napomenuti da se unutar β -propelerne domene nalazi devet potencijalnih N-glikozilacijskih mjesta u blizini područja dimerizacije (46). Unutar tih glikolizacijskih regija nalaze se dvije molekule glukonske kiseline (Glu205 i Glu206) za koje se pokazalo da stvaraju međumolekulsku vezu s N-terminalnim dijelovima supstrata što omogućuje mjesto samo za dvije aminokiseline prije nego što peptid dopiše do aktivnog mjesta. Stoga, iz ovog mehanizma možemo shvatiti kako djeluje dipeptidilna katalitička aktivnost DPP IV/CD26 (48). Treba još spomenuti da je dimerizacija, osim što je nužna za oblikovanje aktivnog mjesta, također je bitna za pojačavanje afiniteta prema ligandu što utječe na proces prijenosa signala u stanici. Osim toga, dimerizacija i tetramerizacija utječu i na vezanje DPP IV/CD26 s ADA-om što omogućuje međustaničnu komunikaciju (46).

1.4.2. Topljiva (solubilna) DPP IV/CD26

DPP IV/CD26, osim što se nalazi u membranskom obliku na površini različitih stanica (imunskih, endotelnih i epitelnih stanica), također se nalazi i u topljivom (solubilnom) obliku koja cirkulira u mnogim tjelesnim tekućinama poput plazme, urina, sjemene i amnijske tekućine (49). Otkrivanjem kristalne strukture topljive DPP IV/CD26, dokazano je da je jedina razlika između topljivog i membranskog oblika u tome što topljivi oblik ne sadrži intercelularni i transmembranski dio (50), a nedostatak transmembranskog dijela upravo omogućuje postojanje DPP IV/CD26 u topljivom obliku (41). Aktivnost topljive DPP IV/CD26 prvi put je dokazano 1976. godine u serumu (51), dok samo podrijetlo ovog oblika još u potpunosti nije jasno, a pretpostavlja se da potječe s površine različitih tipova stanica koje izražavaju molekulu CD26, te koje su u doticaju s krvlju. Također se pretpostavlja da postoji proteolitički mehanizam koji cijepa membranski oblik s površine stanice koji se zatim otpušta u cirkulaciju, a sam mehanizam još uvijek nije utvrđen (52).

1.4.3. Multifunkcionalnost DPP IV/CD26

1.4.3.1. Proteolitička funkcija DPP IV/CD26

Membranski vezane proteaze imaju vrlo važnu ulogu u fiziološkim i patološkim procesima kao što su regulacija proteina, upalni procesi, remodeliranje tkiva, migracija i invazija stanice. Oni u tim procesima djeluju tako da razgrađuju pojedine biološki aktivne peptide i tako utječu na njihovu aktivaciju i inaktivaciju (53). Jedna od tih membranski vezanih proteaza je DPP IV/CD26 koja je prolin specifična. Velik broj biološki aktivnih peptida imaju evolucijski očuvani prolin na pretposljednem mjestu u aminokiselinskoj sekvenci (54). Stoga, DPP IV/CD26 ima važnu ulogu u moduliranju aktivnosti takvih bioloških aktivnih peptida u koje ubrajamo neuropeptide, hormone, citokine, kemokine i faktore rasta (55). Do sada je identificiran veliki broj supstrata DPP IV/CD26 (Tablica 2) koji sudjeluju u različitim fiziološkim i patološkim procesima (54).

Tablica 2. Popis dijela supstrata DPP IV/CD26; izvor (54)

Supstrati DPP IV/CD26	
α_1 -mikroglobulin	LD78 β
α -lanac fibrinogen	Limfotoksin
β -kazomorfin	MDC 67 i MDC69
Aprotinin	MIG
Bradikinin	Morfeptin
Endomorfina 1 i 2	Monocitni kemotaktički protein 1, 2 i 3 (MCP)
Enterostatin	Neuropeptid Y
Eotaksin	Peptid YY
Faktor oslobađanja hormona rasta	Prokalcitonin
Gastrični inhibicijski polipeptid (GIP)	Prokolipaza
Gastrični otpuštajući peptid	Prolaktin
Glukagonu sličan peptid 1 (GLP-1)	RANTES
Glukagonu sličan peptid 2	SDF-1 α i SDF-2 β
Glukagon	Supstancija P
Inzulinu sličan faktor rasta 1	Tripsinogen
IP-10	TNF- α
I-TAC	Tyr-melanostatin
Kentsin	Vazoaktivni intestinalni peptid (VIP)
Korionski gonadotropin	

IP-10 (engl. *interferon gamma-induced protein 10*); I-TAC (engl. *interferon-inducible T-cell alpha*); MDC (engl. *macrophage-derived chemokine*); MIG (engl. *monokine induced by gamma interferon*); RANTES (engl. *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*)

Jedna od najpoznatijih proteolitičkih funkcija DPP IV/CD26 jest ona koja se odvija u metabolizmu glukoze. Njezina uloga je dokaza 1996. godine, kada se utvrdilo da je DPP IV/CD26 odgovorna za razgradnju GLP-1 koji je identificiran kao glavni regulator metabolizma glukoze (56). Funkcija GLP-1 je vrlo značajna u liječenju šećerne bolesti tipa II (57), jer povećava koncentraciju inzulina u krvi, dok se koncentracija glukagona smanjuje i tako omogućuje iskorištavanje glukoze iz krvi (58). Kako DPP IV/CD26 proteolitički djeluje na GLP-1, on u krvi ima vrlo kratak poluživot, svega 2 do 3 minute. To je dovelo do razvoja inhibitora DPP IV/CD26 koji sprječavaju da DPP IV/CD26 proteolitički razgradi GLP-1, što omogućuje povećanje poluživota GLP-1 i on tako može nesmetano dulje vršiti svoju funkciju. Upravo su se zbog toga inhibitori DPP IV/CD26 počeli upotrebljavati kao terapijska opcija za šećernu bolest tipa II (35).

1.4.3.2. Receptorska funkcija DPP IV/CD26

Za DPP IV/CD26 je dokazano da služi kao receptor za vezanje adenzin-deaminaze (ADA) na površini limfocita T i B (54, 59). Također je dokazano da je DPP IV/CD26 izravno povezana s ADA-om (54), te je takvo povezivanje jedino pronađen kod ljudi i viših sisavaca, dok kod štakora i miševa nije (60). ADA je enzim koji je prisutan u svim stanicama sisavaca, te katalizira deaminaciju adenzina ili 2'-deoksiadenozina u inozin ili 2'-deoksiinozin i amonijak (61). On ima ključnu ulogu u razvoju i funkciji limfoidnih tkiva (54), jer u kompleksu s DPP IV/CD26 sudjeluje u razgradnji adenzina koji u većim koncentracijama djeluje kao inhibitor za proliferaciju limfocita T i B (54, 62). Stoga, nedostatak ADA-e može dovesti do poremećaja u razvoju imunološkog odgovora (54).

Nadalje je pokazano da DPP IV/CD26 služi kao koreceptor u kompleksu s kemokinskim receptorom CXCR4 koji je receptor za SDF-1 α , jednog od supstrata DPP IV/CD26. Vezanjem SDF-1 α na receptor CXCR4 potiče kemotaksiju i antivirusnu aktivnost pomagačkih limfocita T tipa 2 (T_H2), dok takav slučaj nije kod pomagačkih limfocita T tipa 1 (T_H1) (63). Interakcija stanice sa SDF-1 α , potiče povezivanje DPP IV/CD26 s CXCR4 receptorom, te tako DPP IV/CD26 može direktno proteolitički djelovati na SDF-1 α i utjecati na modulaciju kemotaksije i antivirusne aktivnosti limfocita T i B (54). Dokazano je i izravno povezivanje DPP IV/CD26 na citoplazmatsku domenu CD45 što dovodi do prijenosa signala za sintezu vrlo važnog citokina IL-2 koji je odgovoran za povećani izražaj DPP IV/CD26 na imunskim stanicama (40).

Također je dokazano da DPP IV/CD26 služi kao receptor za kolagen i fibronektin (64). Kada je povećani izražaj DPP IV/CD26 na perifernim limfocitima T, onda limfociti T mogu migrirati kroz monosloj endotelnih stanica u ekstracelularni matriks gdje DPP IV/CD26 utječe na adheziju i aktivaciju kolagena (54). Tijekom procesa cijeljenja rana dolazi do sinteze kolagena tipa I i III koji imaju važnu ulogu tijekom faze II i III cijeljenja rana (65). Istraživanje koje je provedeno u *in vitro* uvjetima dokazalo je da se DPP IV/CD26 direktno veže na kolagen tipa I i III, a mjesto povezivanja nalazi se u cisteinskoj regiji molekule DPP IV/CD26 (66). Značajniju ulogu u procesu cijeljenja rana ima i fibronektin koji sudjeluje u stvaranju privremenog matriksa, odnosno krvnog ugruška tijekom nulte faze cijeljenja rana, a tijekom faze II sudjeluje u stvaranju ekstracelularnog matriksa i utječe na reepitelizaciju (67). Povezivanje DPP IV/CD26 s fibronektinom također dovodi do adhezije i aktivacije fibronektina (54).

1.4.3.3. Uloga DPP IV/CD26 u imunomodulaciji

Istraživanja su pokazala da DPP IV/CD26 ima važnu ulogu u imunom sustavu jer sudjeluje u aktivaciji imunskih stanica (68). Izražena je na većem broju imunskih stanica i to na zrelih timocitima, aktiviranim limfocitima T, B, NK-stanicama i makrofagima (69). Najjači limfocitni izražaj DPP IV/CD26 je pronađen kod stanica koje imaju povećani izražaj drugih aktivacijskih markera kao što su CD25, CD29, CD45RO i CD71 (31). Ona je izražena otprilike 76 % na pomagačkim (CD4⁺; T_h) i 16 % na citotoksičnim (CD8⁺; T_c) limfocitima T. Također, treba još napomenuti da je izražaj DPP IV/CD26 puno veći kod T_h1 stanica nego li kod T_h2 stanica, dok njezina aktivnost u tim stanicama je jednaka bez obzira na postotak izražaja (54). U manjem postotku je izražena na mirujućim limfocitima T, no taj se izražaj može povećati za 5 do 10 % nakon stimulacije anti-CD3, IL-2 ili mitogenima (31). S druge strane, limfociti B i NK-stanice imaju znatno manju razinu izražaja DPP IV/CD26 u odnosu na limfocite T, no također se izražaj kod limfocita B može povećati nakon stimulacije mitogenima ili proteinima *Staphylococcus aureus* (70), dok kod NK-stanica izražaj se povećava stimulacijom s IL-2 (71). Izražaj i aktivnost DPP IV/CD26 u imunom sustavu upravo omogućuje složen mehanizam aktivacije imunskih stanica (54). Ona svojom proteolitičkom funkcijom djeluje na kemokine tako što im smanjuje upalno svojstvo mijenjanjem ili uklanjanjem sposobnosti aktiviranja signala preko vlastitih receptora (31).

1.4.4. Obitelj DPP IV proteina

Osim DPP IV/CD26 u obitelj DPP IV proteina ubrajamo još FAP, DPP8 i DPP9 koji imaju proteolitičku funkciju, te DLP1 i DLP2 koji nisu enzimski aktivni (72). FAP je usko povezani enzim stanične površine s DPP IV/CD26 jer dijeli s njom DPP IV-sličnu enzimsku aktivnost (31), te ima 52 % sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci s DPP IV/CD26 i sadrži približno jednak broj aminokiselina (760) (72). Uz DPP IV-sličnu enzimsku aktivnost, FAP ima i endopeptidaznu sposobnost, odnosno gelatinaznu aktivnost koja mu omogućuje da proteolitički cijepa denaturirane kolagene tipa I i III (73). Izražaj FAP-a je pronađen kod stanica koje su uključene u proces cijeljenja rana, malignog rasta tumora i kroničnih upala. U svim tim procesima dolazi do degradacije ekstracelularnog matriksa pa upravo gelatinazna aktivnost FAP-a omogućuje proteolitičku razgradnju komponenti ekstracelularnog matriksa što olakšava angiogenezu i/ili migraciju tumorskih stanica (31). Najveći izražaj FAP-a je pronađen kod stanica humanih epitelih karcinoma, u razini od 90 % (45).

DPP8 i DPP9 su dimeri koji pokazuju DPP IV-sličnu enzimsku aktivnost kao i DPP IV/CD26, te su za razliku od DPP IV/CD26 i FAP-a topljivi proteini lokalizirani u citoplazmi stanice (31, 72). Oni su međusobno vrlo usko povezani jer dijele 61 % sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci, dok s DPP IV/CD26 pokazuju samo 26 % sličnosti (72). Iako su međusobno vrlo slični, među njima postoje neke razlike najvjerojatnije zbog njihove citoplazmatske lokalizacije što upućuje da imaju različite uloge (31). Za njih se pokazalo da obje imaju ulogu u migraciji i apoptozi stanica, dok DPP9 još dodatno ima ulogu u adheziji i proliferaciji stanica. Također, za njih se pokazalo da u *in vitro* uvjetima imaju ulogu i u procesu cijeljenja rana. Međutim, točni mehanizmi njihovog djelovanja nisu još dovoljno razjašnjeni (74).

Istraživanja su pokazala da određeni članovi DPP IV proteina mogu preuzeti neke funkcije DPP IV/CD26 nakon što se na nju djeluje inhibitorima. Za inhibitore DPP IV/CD26 se pokazalo da njihova prisutnost može utjecati na proliferaciju limfocita T u *in vitro* i na imunosni odgovor u *in vivo* uvjetima. Međutim, istraživanje koje je provedeno na DPP IV deficitarnim štakorima upućuje da oni imaju normalan imunološki odgovor, te se pokazalo da enzimska aktivnost DPP8 i DPP9 ima važnu funkciju u aktivirani limfocitima (72). Iz ovoga možemo pretpostaviti da u slučaju nedostatka DPP IV/CD26, dio njene uloge u procesu cijeljenja rana mogu preuzeti DPP8 i DPP9.

1.4.5. Uloga DPP IV/CD26 u procesu cijeljenja rana

Za DPP IV/CD26 je dokazano da ima važnu ulogu u migraciji, adheziji i apoptozi stanica, a to su vrlo bitni stanični mehanizmi za normalno odvijanje svih procesa cijeljenja rana (64). Do sada su identificirani razni biološki aktivni peptidi koji sudjeluju u zacjeljivanju rana, a među njima su najvažniji brojni citokini, kemokini i faktori rasta. Oni svojim djelovanjem na specifične receptore stvaraju složenu signalnu mrežu koja regulira neke od ključnih procesa cijeljenja rana (75). Upravo neki od tih biološki aktivnih peptida su supstrati DPP IV/CD26, te to upućuje da DPP IV/CD26 putem njih utječe na procese cijeljenja rana.

Među prvim signalnim molekulama je proupalni citokin IL-1 kojeg oslobađaju keratinociti i leukociti kao odgovor na poremećaj epidermalne barijere (75). Za IL-1 je utvrđeno da povećava sintezu supstancije P i prostaglandina E₂ u brojnim neuronskim i glija stanicama (76). Supstancija P utječe na poticaj osjeta boli u rani, a njezina aktivnost je regulirana upravo s DPP IV/CD26 koja proteolitičkim cijepanjem inaktivira supstanciju P i sprječava joj da nastavi poticati osjet boli (31). Također IL-1 zajedno s faktorima rasta iniciraju početak upalne faze tako što utječu na migraciju upalnih stanica. Prvo dolazi do migracije neutrofila, pa potom monocita koji se diferenciraju u makrofage, te na kraju do limfocita T. Te upalne stanice su važne zbog sprječavanja pojave infekcije u rani, te su odgovorne za daljnje izlučivanje signalnih molekula koje su važne za normalno odvijanje ostalih faza cijeljenja rana (9). Limfociti T važni su za sintezu IL-2 tijekom procesa cijeljenja rana (77), te je za taj citokin dokazano da je odgovoran za povećani izražaj DPP IV/CD26 na limfocitima T, a upravo taj izražaj je odgovoran za proliferaciju i aktivaciju tih stanica (54). Upravo izražaj DPP IV/CD26 na limfocitima T, ali i na makrofazima, omogućuje tom enzimu da svojom proteolitičkom funkcijom utječe na kemotaktičnost kemokina RANTES-a, SDF-1 α , eotaksina, MCP-a, MDC-a i I-TAC-a koji su odgovorni za aktivaciju tih stanica (78). Ovo nam govori da DPP IV/CD26 sudjeluje u regulaciji aktivnosti upalnih stanica tijekom cijeljenja rana, pa iz toga možemo pretpostaviti da je najvjerojatnije DPP IV/CD26 odgovoran za poticaj završetka upalne faze što daje signal za početak proliferacijske faze. Međutim, ova pretpostavka nije još u potpunosti ispitana.

Zbog velike metaboličke aktivnosti u rani tijekom procesa cijeljenja rana dolazi do pojave hipoksičnih uvjeta koji će biti jedan od glavnih signala za poticanje angiogeneze tijekom proliferacijske faze (9). Angiogeneza je jedan od ključnih procesa cijeljenja rana i bez nje se ne mogu normalno odvijati svi ostali procesi (17). Za vrijeme hipoksičnih uvjeta u rani, DPP IV/CD26 proteolitičkim cijepanjem sprječava da se neuropeptidu Y (NPY) poveže za svoj receptor Y1 jer ga cijepa u molekulu NPY(3-36) koja je specifična za povezivanje na receptore Y2 i Y5, ali ne i Y1 (79). NPY(3-36) preko receptora Y2 i Y5 potiče angiogenezu tako što stimulira adheziju, migraciju i proliferaciju endotelnih stanica (80). Također, NPY

utječe na stimulaciju faktora rasta VEGF-a i bFGF-a što pojačava angiogeni poticaj i tako se poboljšava funkcija miokarda i sazrijevanje novonastalih krvnih žila (79). Ovo pokazuje da DPP IV/CD26 preko svog supstrata NPY-a može direktno utjecati na poticanje angiogeneze tijekom zacjeljivanja rana.

Također, istraživanja su pokazala da SDF-1 α putem svojeg receptora CXCR4 na endotelnim stanicama inducira njihovu kemotaksiju, proliferaciju i migraciju što je važno za poticaj angiogeneze, te poboljšava proliferaciju keratinocita što je važno za reepitelizaciju (9, 81). Daljnja istraživanja u *in vivo* uvjetima su pokazala da je sinteza SDF-1 α regulirana od strane HIF-1 (79), te da SDF-1 α svojom kemotaktičnom funkcijom pojačava VEGF-induciranu proliferaciju endotelnih stanica (82). Kako je SDF-1 α supstrat DPP IV/CD26, onda možemo reći da preko njega ovaj enzim utječe na angiogenezu i reepitelizaciju tako što DPP IV/CD26 proteolitičkom funkcijom onemogućuje kemotaktičnu sposobnost SDF-1 α (78). Za kontrolu angiogeneze, važna su još dva kemokina i to IP-10 i MIG za koje se pokazalo da inhibiraju angiogenezu. Ta njihova funkcija je upravo regulirana od strane DPP IV/CD26 koja proteolitičkom funkcijom smanjuje kemotaktičnu sposobnost IP-10 i MIG-a, ali im ostaje sposobnost da inhibiraju angiogenezu (76).

Nadalje je dokazano da DPP IV/CD26 dolazi u interakciju s komponentama ekstracelularnog matriksa, a pogotovo s kolagenom i fibronektinom (31). Kada dođe do povećanog izražaja DPP IV/CD26 na perifernim limfocitima T, onda oni migriraju u ekstracelularni matriks gdje DPP IV/CD26 može doći u interakciju s kolagenom i fibronektinom te utječe na njihovu adheziju i aktivaciju (54). Tako DPP IV/CD26 može utjecati na stvaranje ekstracelularnog matriksa i na reepitelizaciju djelovanjem na fibronektin (67), dok djelovanjem na kolagen može utjecati na fibroplaziju, te remodeliranje ekstracelularnog matriksa i kolagena (78). Na temelju svega navedenog možemo reći da DPP IV/CD26 ima važnu ulogu u procesu cijeljenja rana tako što utječe na niz signalnih puteva koji reguliraju upalnu fazu, proliferacijsku fazu i fazu remodeliranja.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

S obzirom na prethodno pokazanu ulogu DPP IV/CD26 u procesima važnim za cijeljenje ranjenog tkiva, **pretpostavka** ovog istraživanja je da ova molekula ima značajnu ulogu u procesu cijeljenja rane putem modulacije učinaka faktora uključenih u angiogenezu.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utječe li i na koji način DPP IV/CD26 na ključne čimbenike u nastanku novih krvnih žila te regeneraciji i reparaciji tkiva.

Specifični ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. utvrditi makroskopske i mikroskopske značajke cijeljenja rana u uvjetima nedostatka DPP IV/CD26;
2. ispitati postoje li razlike u postotku zatvaranja rane između CD26 deficijentnih i divljeg tipa životinja;
3. ispitati izražaj VEGF i HIF-1 α tijekom procesa cijeljenja rana kože u uvjetima nedostatka DPP IV/CD26 u odnosu na fiziološke uvjete;
4. utvrditi lokalnu enzimsku aktivnost DPP IV/CD26 u uzorcima kože i rana C57BL/6 životinja tijekom procesa cijeljenja rana.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Kemikalije i reagensi

U ovom istraživanju korištene su sljedeće kemikalije i reagensi za potrebe analitičkih postupaka:

Depilacijska krema, *Veet*

Eozin, *Shandon Inc.*

Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %), *Kemika*

Fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS), *Sigma-Aldrich Life Sciences*

Glicin-prolin-p-nitroanilid (Gly-Pro-p-NA), *Sigma-Aldrich Life Sciences*

Hematoksin, *Shandon Inc.*

Kloridna kiselina (HCl, 37 %), *Kemika*

Kromogen DAB sustav za vizualizaciju, *Dako real en vision system, Dako Inc.*

Ksilol (C_8H_{10}), *Kemika*

Medij za montiranje - Entellan, *Merck*

Paraformaldehid (4 %), *Sigma-Aldrich Life Sciences*

Parafin, *Shandon Inc.*

Streptavidin-POD konjugat, (ref. 11 089 153 001), *Roche Diagnostics*

3.1.2. Protutijela

U svrhu ovog istraživanja korištena su sljedeća protutijela:

Primarno zečje poliklonsko HIF-1 α protutijelo, ab2185, *Abcam Inc.*

Primarno zečje poliklonsko VEGF protutijelo, ab46154, *Abcam Inc.*

Sekundarno kozje protu-mišje Ig protutijelo, cat550337, *BD Pharmingen*

Sekundarno kozje protu-zečje IgG H&L (biotin) protutijelo, ab6720, *Abcam Inc.*

3.1.3. Uređaji

Za provedbu analitičkih postupaka ovog istraživanja korišteni su sljedeći instrumenti i uređaji:

Analitička vaga, *Mettler toledo*

Aparat za dobivanje ultra čiste vode, *TKA MicroPure*

Centrifuga ROTINA 420R, *Hettich Zentrifuge*

Čitač mikrotitarskih pločica Bio-tek EL808, *Bio-tek instruments INC*

Destilator vode, *TAK Pacific*

Digitalna kamera (TMC 76S), *Pulnix*

Digitalni pH-metar (MP 222), *Mettler Toledo*

Digitalni fotoaparat, *Olympus*

Digitalna vaga, *Mettler toledo*

Histokinet, *MSE*

Instrument za uzimanje bioptičkog materijala i indukciju rana, *Biopsy Punch, Miltex*

Kombinirani hladnjak s ledenicom +4/-20 °C, *Gorenje*

Mašinic za brijanje, *Simbo*

Mikroton (HM340 E), *Laica*

Svjetlosni mikroskop (BX40), *Olympus*

Zamrzivač do -80 °C (VXE 490), *Jouane*

3.1.4. Puferi i otopine reagensa

Za potrebu ovog istraživanja pripremljeni su sljedeći puferi i otopine reagensa:

Citratni pufer (pH = 6,0)

Za pripremu citratnog pufera prvo je potrebno odvagati 2,94 g natrij-citrata dihidrata koji zatim otopimo u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml s destiliranom vodom. Kada se otopi cijeli natrij-citrat dihidrat u odmjernu tikvicu dodajemo destiliranu vodu do oznake. Za određivanje pH vrijednost pripremljene otopine koristimo digitalni pH-metar te ako pH vrijednost nije jednak 6,0 onda ju podešavamo dodavanjem par kapi otopine NaOH, destilirane vode ili par kapi otopine HCl. Nakon što se pripremi citratni pufer, on se pohranjuje na +4 °C i koristi se za pripremu tkivnih preparata kod imunohistokemije.

Tris-HCl pufer (pH = 8,0)

Prvo se pripremi 1 M otopina Tris-a tako što se otopi 1,211 g krutog Tris-a u 10 ml destilirane vode. Zatim se u odmjernoj tikvici volumena 50 ml promiješa 4,305 ml 1 M Tris-a s 2,5 ml 1 M HCl, te se potom tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake. pH vrijednost pripremljene otopine se određuje pomoću digitalnog pH-metra. U slučaju da pH vrijednost nije jednaka 8,0 onda se podešava s par kapi otopine HCl, destilirane vode ili par kapi otopine NaOH. Nakon što se pripremi Tris-HCl pufer, on se pohranjuje na +4 °C i koristi se za stvaranje optimalnih uvjeta za odvijanje hidrolize supstrata pri određivanju aktivnosti DPP IV/CD26.

Acetatni pufer (pH = 4,5)

Za pripremu acetatnog pufera potrebno je u omjernoj tikvici volumena 50 ml promiješati 6,5 ml 1 M otopine etanske kiseline s 2,5 ml 1 M otopine NaOH, te onda nadopuniti s destiliranom vodom do oznake. Uz pomoć digitalnog pH-metra možemo odrediti pH vrijednost pripremljene otopine, te ako pH nije jednak 4,5 onda se podešava dodavanjem par kapi otopine NaOH, destilirane vode ili par kapi HCl. Nakon što se pripremi acetatni pufer, on se pohranjuje na +4 °C i koristi se za zaustavljanje katalitičke reakcije pri određivanju aktivnosti DPP IV/CD26.

3.1.5. Laboratorijske životinje i etička načela istraživanja na životinjama

Za provedbu ovog istraživanja, korištena su dva soja laboratorijskih miševa: divlji tip miševa (C57BL/6, CD26^{+/+}) i CD26 deficijentni miševi (CD26^{-/-}) koji su dobiveni na C57BL/6 genetskoj podlozi kod kojih je inaktiviran gen za DPP IV/CD26. CD26 deficijentni miševi dobiveni su ljubaznošću dr. Didiera Margueta (Centre d'immunologie de Marseille Luminy, Parc Scientifique de Luminy, Merseille Cedex, Francuska).

Eksperimentalne životinje su bile muškog spola, starosti 8 do 10 tjedana, uzgojene u središnjem uzgojnom vivariju Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Za vrijeme istraživanja, životinje su boravile u vivariju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, u standardnim kavezima za čuvanje laboratorijskih miševa uz prirodni ciklus izmjene svjetla i tame. Također, tijekom ovog istraživanja, životinje su bile hranjene standardnom laboratorijskom hranom (Standard diet GLP; Mucedola, Italija) i vodom *ad libitum*.

Istraživanje je provedeno na eksperimentalnim životinjama u skladu s važećim Zakonom o zaštiti životinja (NN br. 135/2006) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN br. 055/2013). Poštivana su sva temeljna etička i znanstvena načela o provođenju eksperimenta na životinjama, uz izbjegavanje nepotrebnih eksperimenata i

patnje životinja. Također, poštivana su 3R načela: nadomještanje životinja - engl. *replacement*, smanjenje broja životinja - engl. *reduction* i oplemenjivanje postupaka - engl. *refinement*. Ovo istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

3.2. Metode

3.2.1. Plan eksperimenta

Za uspješnu provedbu ovog istraživanja, osmišljen je plan eksperimenta koji uključuje dva soja eksperimentalnih životinja i različite analitičke postupke. Prvu skupinu predstavljali su miševi divljeg tipa soja C57BL/6 (kontrolna skupina), a drugu skupinu CD26 deficiijentni miševi (CD26^{-/-}) dobiveni iz soja C57BL/6. Svaka ispitivana skupina podijeljena je u podskupine prema danu cijeljenja rane, a obuhvaćala je 6 do 8 životinja. Svim su životinjama učinjene dvije jednake rane promjera 5 mm na dorzalnom dijelu, u intraskapularnom prostoru. Nakon indukcije rana slijedilo je žrtvovanje eksperimentalnih životinja, poštivajući sva etička načela rada sa životinjama, nakon drugog, četvrtog, sedmog, desetog i petnaestog dana cijeljenja rana, prema utvrđenom planu pokusa. Tijekom žrtvovanja, uzeti su uzorci tkiva rana i kontrolnog tkiva za daljnje histološke i biokemijske analize.

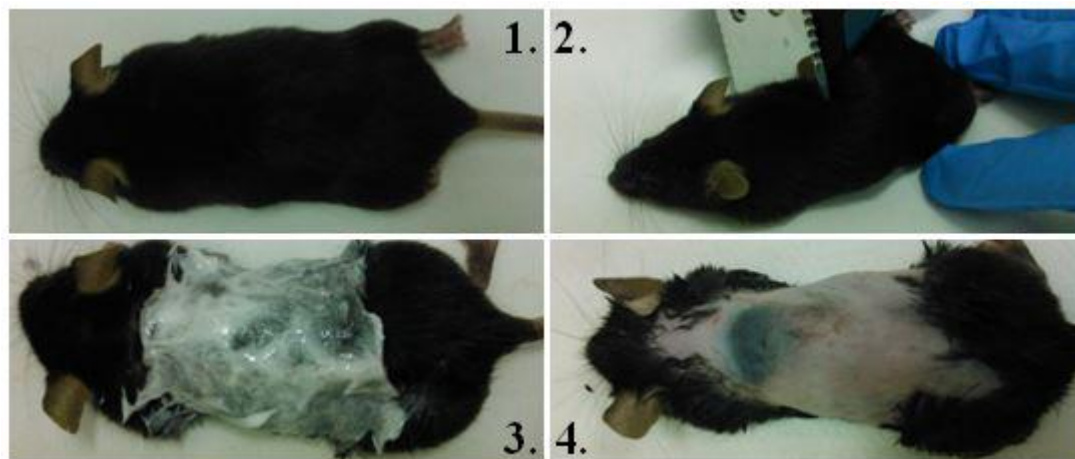


Slika 6. Shematski prikaz uspostave pokusnog modela cijeljenja rana i žrtvovanja životinja kod oba soja miševa

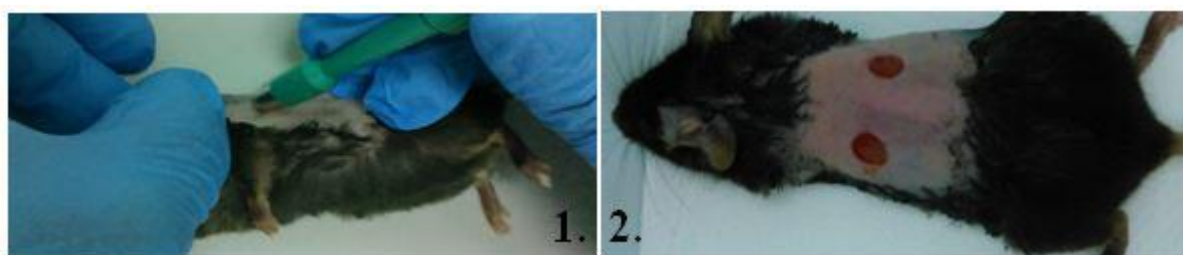
3.2.2. Postupak induciranja rane

Prije induciranja rane, pokusne su životinje bile podvrgnute općoj anesteziji intraperitonealnom injekcijom standardne otopine ketamina/ksilazina. Uspostava modela cijeljenja rana proveden je prema protokolu Peters i sur. (83): prije induciranja rane kod eksperimentalnih životinja potrebno je najprije ukloniti dlake s mišjih leđa pomoću brijanja i depiliranja (Slika 7), kako bi dobili posve glatku kožu koju je zatim potrebno dodatno očistiti otopinom PBS-a. Nakon što smo uklonili sve dlake na mišjim leđima, slijedio je postupak

induciranja rane koristeći sterilni instrument za uzimanje biopsičkog materijala, engl. *biopsy punch*. Dvije jednake rane promjera 5 mm učinjene su svakoj pokusnoj životinji u interskapularnom području dorzuma kako je prikazano na Slici 8.



Slika 7. Postupak uklanjanja dlaka s mišjih leđa



Slika 8. Postupak induciranja rane pokusnoj životinji

3.2.3. Postupak mjerenja postotka zatvaranja rane

U cilju mjerenja postotka zatvaranja rane kod pojedine pokusne životinje te kako bi usporedili brzinu zatvaranja rane između C57BL/6 i CD26^{-/-} miševa, učinjene su digitalne fotografije pojedinih rana prilikom indukcije rane te drugog, četvrtog, sedmog, desetog i petnaestog dana cijeljenja rane uvijek u isto vrijeme (10 sati ujutro). Dobivene fotografije su se digitalno obrađivale i svaka je površina rane izračunata pomoću programa *ImageJ*[®] koji je dostupan na internet stranicama Nacionalnog instituta za zdravstvo (<https://imagej.nih.gov/ij>). Postotak zatvaranja rane je izračunat prema metodi Straino i sur. (84) kao omjer površine rane u određenoj vremenskoj točki i početne površine koja je nastala tijekom indukcije rane. Rezultati postotka zatvaranja rana su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

3.2.4. Postupak uklapanja tkivnih preparata u parafin

Tijekom žrtvovanja eksperimentalnih životinja obiju skupina, izdvojeni su uzorci tkiva rana i kontrolne kože za histološka istraživanja. Dobiveni uzorci se fiksiraju unutar plastičnih histoloških kazetica tijekom 24 sata u 4 %-nom paraformaldehidu, a nakon 24 sata slijedi dehidracija kroz rastuće koncentracije etanola (70 %, 80 %, 96% i 100 %). Dehidracija s etanolom pomaže u uklanjanju vode iz tkiva uzoraka, nakon koje slijedi prosvjetljivanje ksilolom. Postupci dehidracije i prosvjetljivanja odvijaju se u histokinetu. Sljedeći korak je uklapanje uzoraka u parafin koje se provodi postupkom uranjanja uzoraka tkiva u tekući parafin temperature od +50 °C do +60 °C, što dovodi do zamjene ksilola koji se nalazi u tkivu s parafinom. Do krutog parafinskog bloka se dolazi hlađenjem na +4 °C, a prije postupka rezanja, važno je parafinske blokove zalediti na -20 °C. Konačni korak ovog postupka jest serijsko rezanje parafinskih blokova mikrotomom na rezove debljine 4 µm koji se adheriraju na silanizirana predmetna stakalca.

3.2.5. Postupak hematoksilin-eozin bojanja tkivnih preparata

Pripremljeni tkivni preparati prolaze kroz postupak klasičnog histološkog bojanja hematoksilin-eozinom (HE) kod kojeg hematoksilin boji kromatin i jezgru, odnosno kisele strukture u stanici ljubičasto-plavo, dok eozin boji citoplazmu, odnosno bazične strukture crveno. Postupak HE bojanja se provodi na sljedeći način: predmetna stakalca na kojima su tkivni preparati, prvo se uranjaju u otopinu ksilola 3 puta po 5 minuta kako bi se deparafinirali, a zatim u otopinu etanola s padajućim koncentracijama (2 x 100 %, 90%, 70 % i 50 %) kroz 4 minute. Ovaj postupak omogućuje rehidraciju tkiva, nakon čega slijedi ispiranje u destiliranoj vodi kroz 4 minute, pa potom bojanje preparata. Prvo bojanje se provodi otopinom hematoksilina kroz 5 minuta, nakon kojega slijedi ispiranje pod mlazom tekuće vode kroz 15 minuta, pa onda diferenciranje u otopini HCl-etanola (100 ml 70 %-nog etanola i 0,5 ml HCl) kroz 2 sekunde, te ponovno ispiranje pod mlazom tekuće vode kroz 10 minuta. Prije drugog bojanja, preparati se uranjaju u destiliranu vodu kroz 3 minute, a onda slijedi bojanje s otopinom eozina kroz 3 minute. Obojeni preparati tada prolaze trostruko ispiranje s destiliranom vodom po 5 minuta. Predzadnji dio ovog postupka jest dehidracija s otopinama etanola s rastućim koncentracijama (70 %, 2 x 96 % i 2 x 100 %) kroz 30 sekundi, a zatim slijedi trostruko uranjanje u ksilol po 5 minuta. Na kraju je preostalo sušenje obojenih preparata na sobnoj temperaturi i montiranje pokrovnih stakalca pomoću entelana.

3.2.6. Postupak imunohistokemijskog bojanja tkivnih preparata

Za određivanje HIF-1 α i VEGF, potrebno je napraviti imunohistokemijsko bojanje tkivnih preparata prema sljedećem protokolu: prvo slijedi deparafinacija tkivnih preparata uranjanjem u ksilol 3 puta po 5 minuta, te potom rehidracija u otopini etanola padajućih koncentracija (2 x 100 %, 90 % i 70 %) kroz 3 minute. Zatim slijedi ispiranje u destiliranoj vodi 2 puta po 3 minute i uranjanje tkivnih preparata u PBS kroz 5 minuta. Sljedeći korak je „otkrivanje“ antigena (engl. *antigen retrieval*) u mikrovalnoj pećnici u citratnom puferu (pH = 6,0) dok ne proključa (3 minute), a potom na 350 W kroz 10 minuta. Tijekom postupka vrlo je važno provjeravati nivo otopine i po potrebi dodatno još zagrijati na 350 W tijekom 5 minuta. Tada slijedi hlađenje kroz 20 minuta, a potom ispiranje destiliranom vodom 2 puta po 3 minuta i ispiranje u TBS-u kroz 5 minuta. Poslije ispiranja slijedi blokiranje endogene peroksidaze u otopini koja se sastoji od 35 ml metanola, 34 ml PBS-a i 1,2 ml H₂O₂ kroz 35 minuta. Zatim slijedi ispiranje tkivnih preparata s PBS-om 2 puta po 5 minuta i dodavanje 10 %-nog normalnog kozjeg seruma po 150 μ l po uzorku kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela. Nakon seruma dodaju se primarna protutijela i to primarno zečje poliklonsko HIF-1 α protutijelo proizvođača *Abcam Inc.* u razrjeđenju 1:20, te primarno zečje poliklonsko VEGF protutijelo proizvođača *Abcam Inv.* u razrjeđenju 1:100. Poslije dodavanja primarnih protutijela, slijedi inkubacija tkivnih preparata preko noći na temperaturi +4 °C u vlažnoj komori. Sljedećeg dana provodi se ispiranje tkivnih preparata u PBS-u 3 puta po 5 minuta, a zatim se dodaju sekundarni protutijela u razrjeđenju 1:200 i to sekundarno kozje protu-mišje Ig protutijelo proizvođača *BD Pharmigen*, te sekundarno kozje protu-zečje IgG H&L (biotin) protutijelo proizvođača *Abcam Inc.* Nakon dodavanja slijedi inkubacija kroz 30 do 45 minuta na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori, a zatim ispiranje tkivnih preparata u PBS-u 3 puta po 5 minuta. Sljedeći korak je inkubacija s preparatom streptavidina na koji je vezan enzim peroksidaza kroz 45 minuta u vlažnoj komori, te ispiranje s PBS-om 3 puta po 5 minuta. Za vizualizaciju pozitivnih stanica HIF-1 α , odnosno pozitivnih stanica VEGF-a koristi se kromogeni supstrat DAB, koji se inkubira kroz 20 sekundi. Pomoću mikroskopa se provjerava ako je postupak vizualizacije dobro napravljen, te potom slijedi prvo ispiranje kroz 10 minuta u tekućoj vodi, a zatim u destiliranoj vodi kroz 5 minuta. Zatim slijedi bojanje tkivnih preparata s hematoksilinom kroz 15 sekundi zbog kontrastiranja boje, te ispiranje prvo tekućom vodom kroz 10 minuta, a zatim destiliranom vodom kroz 5 minuta. Zadnji koraci u ovom postupku su dehidracija u otopini etanola rastućih koncentracija (70 %, 80 %, 2 x 96 % i 2 x 100 %) kroz 3 minute i uranjanje u ksilol 3 puta po 5 minuta, te konačno na kraju se montiraju pokrovna stakalca s entelanom.

3.2.7. Morfometrijska analiza tkivnih preparata

Sva morfometrijska mjerenja provedena su na prethodno obojenim preparatima i analizirana od strane iskusnog histologa, na 6 do 8 uzoraka tkiva po životinji po bojanju. Morfometrijska analiza debljine korijuma dobivena je mjerenjem duljine od baze dermisa do baze epidermisa na 10 točaka cijelom dužinom rane, na 6 do 8 uzastopnih uzoraka rane polazeći od središnje sagitalne linije, te su rezultati izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. Mikroskopska analiza je provedena pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus BX40 (Tokio, Japan) i digitalne kamere Pulnix TMC 76S (Tokio, Japan). Digitalne fotografije su se analizirale pomoću Soft Imaging System Cell B (Olympus, Njemačka). Svi dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

3.2.8. Izolacija DPP IV/CD26 iz tkiva kože

Uzorci tkiva kože i rana mase oko 200 mg za određivanje enzimске aktivnosti DPP IV/CD26 oprezno su usitnjeni pomoću kirurškog skalpela te ručno homogenizirani na ledu u 0,4 ml TRIS-HCl pufera (pH = 8,0). Dobiveni homogenati se zatim centrifugiraju na 14000 okretaja u minuti kroz 20 minuta na temperaturi od +4 °C. Nakon centrifugiranja, oprezno se odvaja supernatant od taloga i prenese u čistu i ohlađenu epruvetu. Dobiveni supernatanti su korišteni za određivanje ukupne koncentracije proteina prema metodi Bradford i sur. (85), te dalje za određivanje enzimске aktivnosti DPP IV/CD26.

3.2.9. Određivanje enzimске aktivnosti DPP IV/CD26 u tkivu kože

Enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u tkivu kože određena je u svim ispitivanim skupinama C57BL/6 miševa spektrofotometrijskom metodom, mjerenjem apsorpcije svjetlosti pri valnoj duljini 405 nm korištenjem čitača mikrotitarskih pločica.

Metoda određivanja enzimске aktivnosti DPP IV/CD26 temelji se na hidrolizi kromogenog supstrata glicin-prolin-p-nitroanilida (Gly-Pro-p-NA). Kako bismo mogli izmjeriti enzimsku aktivnost potrebno je prvo pripremiti slijepu probu i probu u jažicama mikrotitarske pločice prema postupku navedenom u Tablici 3. Kod pripreme obiju reakcijskih smjesa dodaje se 34 μ l Tris-HCl pufera (pH = 8,0) i 2 μ l komercijalnog kromogenog supstrata (Sigma Chemical, Njemačka). U pripremljenu reakcijsku smjesu probe dodaje se još 4 μ l uzorka (homogenata tkiva), te se potom obje smjese inkubiraju na 37 °C tijekom 30 minuta kako bi se ostvarili optimalni uvjeti za hidrolitičku reakciju enzima DPP IV/CD26 iz homogenata tkiva sa supstratom. Nakon završetka inkubacije, potrebno je zaustaviti reakcije u reakcijskim smjesama, što se postiže dodavanjem 160 μ l acetatnog pufera (pH = 4,5) koji mijenja pH

vrijednost tih smjesa i time se reakcija zaustavlja. Uz dodani acetatni pufer, u reakcijsku smjesu slijepe probe dodaje se još 4 µl uzorka kako bi se isključile moguće interferencije iz tkiva prilikom mjerenja. Tijekom hidrolitičke razgradnje supstrata dolazi do nastanka različitih intenziteta žute boje, proporcionalno količini razgrađenog supstrata, te se taj intenzitet određuje prema slijepoj probi svakog pojedinog uzorka. Slijepa proba nam služi kako bismo dobili stvarnu vrijednost apsorbancije probe tako što oduzmemo apsorbanciju slijepe probe od ukupne apsorbancije. Nakon što smo pripremili mikrotitarsku pločicu započinjemo sa spektrofotometrijskim mjerenjem pri valnoj duljini 405 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica.

Dobiveni rezultati apsorbancije probe nam služe za određivanje enzimske aktivnosti DPP IV/CD26 u homogenatu tkiva prema sljedećem izrazu:

$$\text{Enzimska aktivnost} = \frac{V_{\text{uk}} \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot t \cdot V_{\text{uz}}} \cdot A_p$$

gdje je V_{uk} ukupni volumen reakcije smjese, 10^6 je faktor pretvorbe mol-a u µmole-e, ε je molarni apsorpcijski koeficijent (za p-nitroanilid pri 405 nm iznosi $9,9 \times 10^3$ mol), t je vrijeme inkubacije u minutama (30 min), V_{uz} je volumen uzorka, te A_p je apsorbancija probe.

Enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u homogenatu tkiva izražena je u miliinternacionalnim jedinicama po miligramu izoliranih ukupnih proteina (mIU/mg proteina).

Tablica 3. Postupak određivanja enzimekse aktivnosti DPP IV/CD26 u tkivu

	SLIJEPA PROBA	PROBA
	V / µl	V / µl
Tris-HCl pufer (pH = 8,0)	34	34
Supstrat (Gly-Pro-p-NA)	2	2
Uzorak (homogenat tkiva)	-	4
Inkubacija uzoraka 30 minuta na 37 °C		
Acetatni pufer (pH = 4,5)	160	160
Uzorak (homogenat tkiva)	4	-

3.3. Statistička obrada podataka

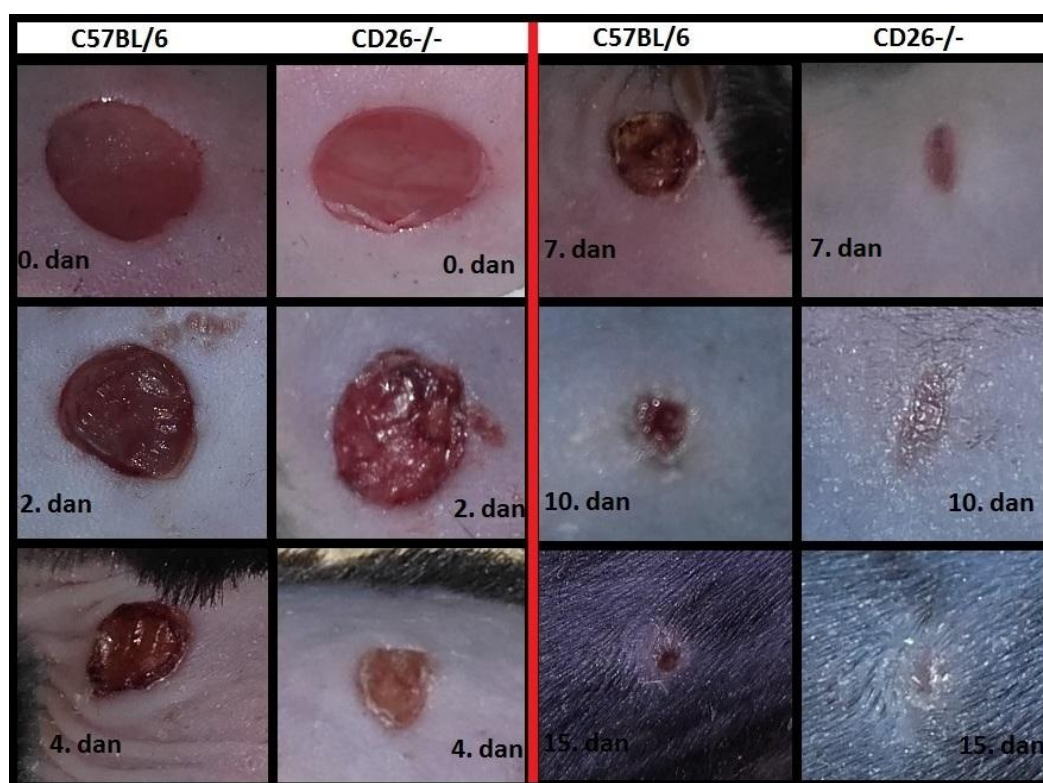
Dobiveni rezultati u ovom istraživanju su pohranjeni u baze podataka koristeći program Windows Microsoft Office Excel® 2007. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, te su prikazani tabelarno ili grafički. Statistička obrada rezultata je napravljena pomoću programa STATISTICA® 8.0 (StatSoft Inc. Tulsa). Razlike između ispitanih skupina određivane su pomoću ANOVA testa, nakon čega je slijedio *post hoc* Scheffe-ov test. Razina od $p < 0,05$ smatrala se statistički značajna.

4. REZULTATI

4.1. Pokusni model cijeljenja rana

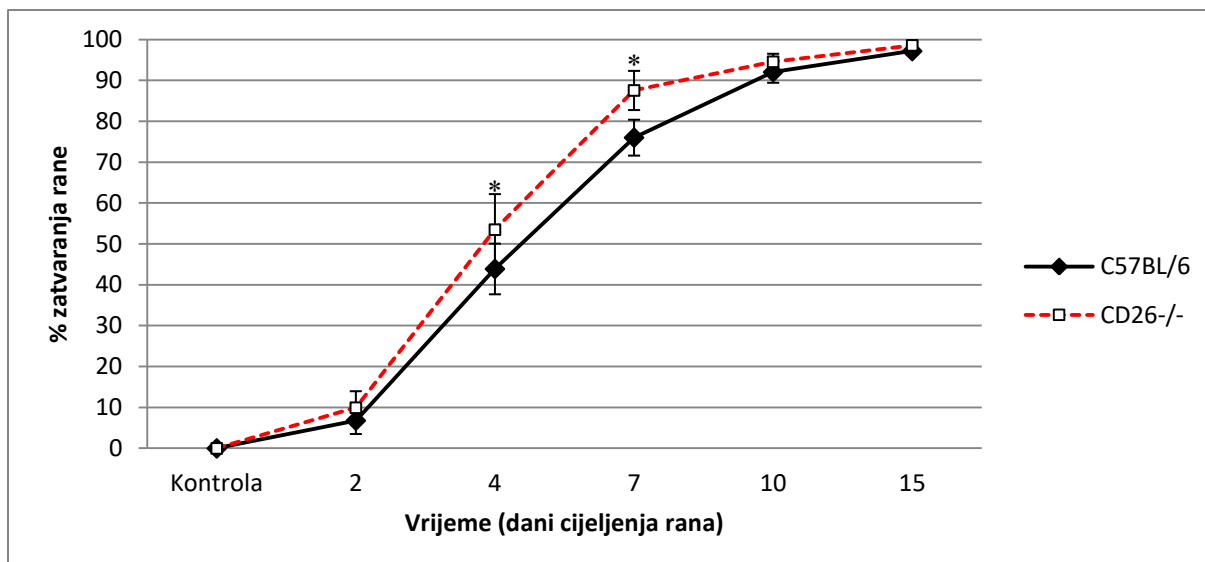
4.1.1. Makroskopski prikaz i postotak zatvaranja rane

Na temelju makroskopske analize primijećena je određena razlika u cijeljenju rana između ispitanih sojeva eksperimentalnih životinja (Slika 10). Kod $CD26^{-/-}$ miševa se može primijetiti da već od četvrtog dana pa sve do petnaestog dana dolazi do relativno uspješnijeg cijeljenja rana.



Slika 9. Prikaz cijeljenja rana kod obje skupine eksperimentalnih životinja od nultog do petnaestog dana

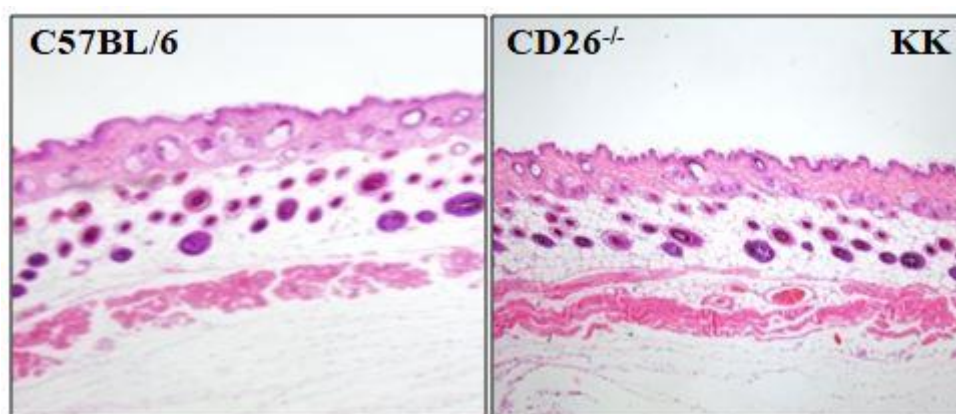
Kako bismo mogli bolje uvidjeti razliku u makroskopskom cijeljenju rana, provedena je analiza postotnog zatvaranja rane kod obje skupine eksperimentalnih životinja. Iz Slike 11, možemo primijetiti da je veći postotak zatvaranja rane kod $CD26^{-/-}$ miševa u odnosu na C57BL/6 miševe tijekom svih dana cijeljenja. Razlika u postotku zatvaranja rane između sojeva je najveća četvrtog i sedmog dana gdje je statistički značajno veći ($p < 0,05$) postotak zatvaranja rane kod $CD26^{-/-}$ miševa u odnosu na C57BL/6 miševe.



Slika 10. Prikaz postotka zatvaranja rane kod istraživanih skupina eksperimentalnih životinja; * statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na C57BL/6 miševe istoga dana

4.1.2. Mikroskopski prikaz cijeljenja rana

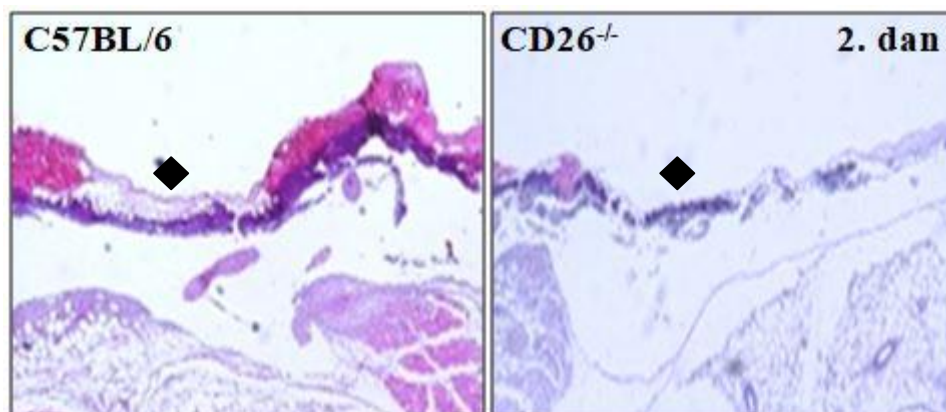
Kako bismo mogli bolje uočiti razlike u procesu cijeljenja rana kod C57BL/6 i CD26^{-/-} miševa, napravljene su mikroskopske analize zacjeljivanja rana, odnosno histološka i histomorfometrijska analiza uzoraka zdravog i ranjenog tkiva obiju ispitanih skupina životinja, žrtvovanih drugog, četvrtog, sedmog, desetog i petnaestog dana od indukcije rane.



Slika 11. Histološki prikaz kontrolne kože (KK) kod C57BL/6 i CD26^{-/-} miševa; HE bojanje, povećanje 40x

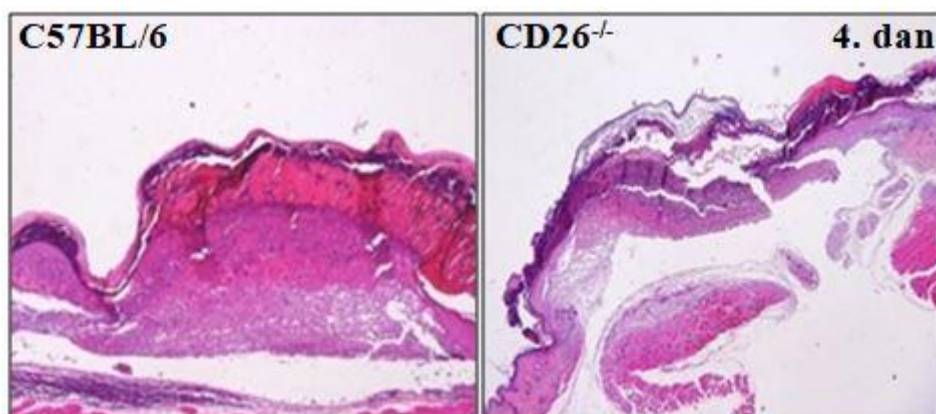
Uzorci kontrolne kože kod oba soja miševa su uzeti s dijelova kože leđa koji nisu bili u području izazvanog oštećenja te prikazuju normalan histološki izgled. Mikroskopska analiza kontrolne kože je pokazala da ne postoji razlika u mikroskopskom izgledu kože između C57BL/6 i CD26^{-/-} miševa (Slika 11). Analizom ranjenog tkiva nakon drugog dana od

ranjavanja (Slika 12), uočeno je da je kod oba soja miševa vidljiv nedostatak epitela i infiltracija mononukleara u područje rane što prikazuje kraj nulte faze cijeljenja rana i početak faze I. Također na površini defekta je vidljiv tanak sloj fibrinskog ugruška.



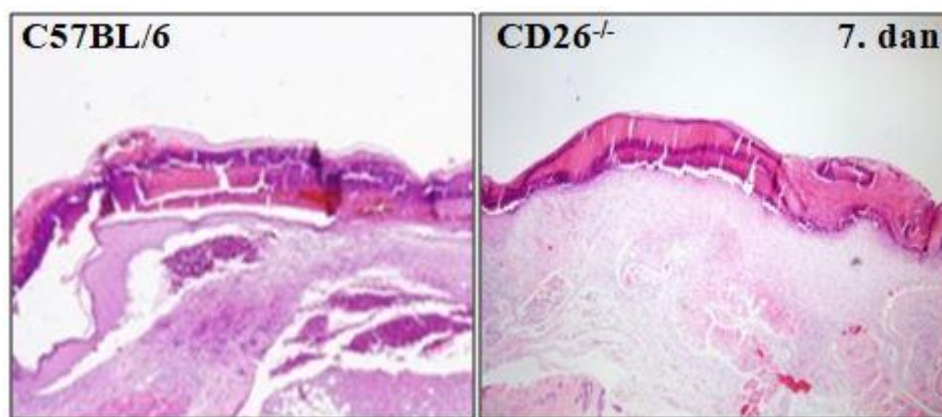
Slika 12. Histološki prikaz ranjenog tkiva drugog dana od ranjavanja kod C57BL/6 i CD26^{-/-} miševa, HE bojanje; povećanje 40x; romb prikazuje tanki sloj fibrina iznad rane

Četvrtog dana od ranjavanja, mogu se vidjeti na površini defekta fibrinske naslage ispod kojih je vidljiva rubna proliferacija epitela koji je još uvijek tanak i bez vezivno-tkivnih papila (Slika 13). Tijekom četvrtog dana nije uočena značajna razlika između sojeva miševa.



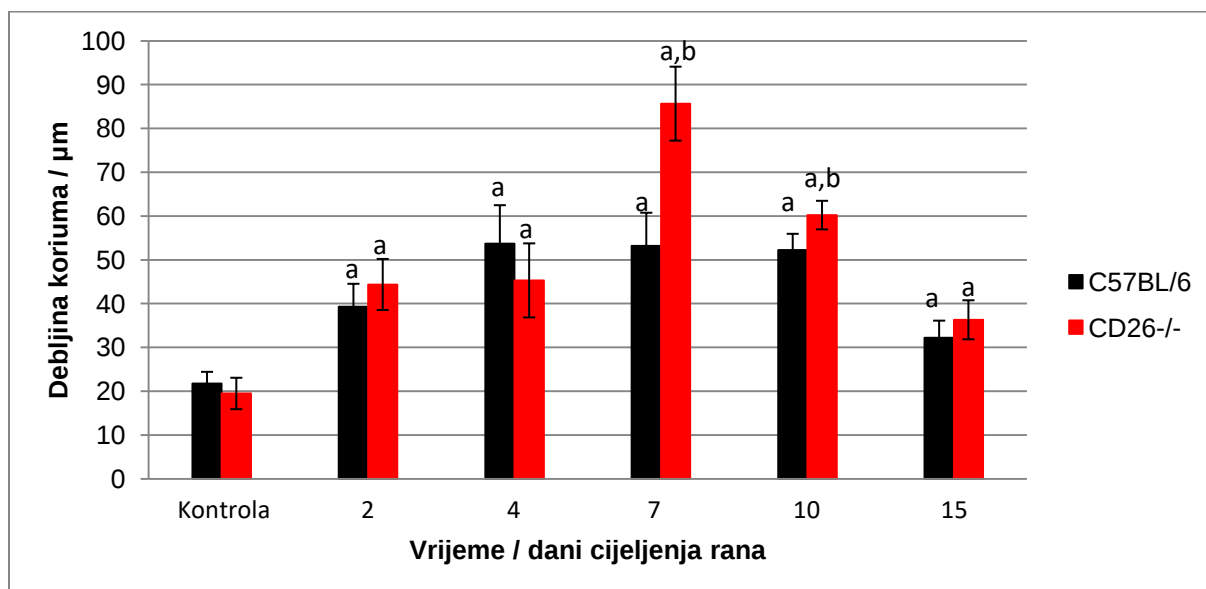
Slika 13. Histološki prikaz ranjenog tkiva četvrtog dana od ranjavanja kod C57BL/6 i CD26^{-/-} miševa, HE bojanje; povećanje 40x

Razlika između C57BL/6 i CD26^{-/-} miševa u reakciji tkiva na inducirano oštećenje uočena je sedmog dana od ranjavanja. Kod CD26^{-/-} miševa je uočeno da je debljina epitela veća negoli kod C57BL/6 miševa, te se u vezivnom tkivu koriuma nalazi veći broj stanica i veća je količina međustaničnog matriksa što naposljetku dovodi do bržeg ulaska u fazu II cijeljenja rana kod CD26^{-/-} miševa (Slika 14). Također, morfometrijska analiza pokazuje statistički značajnu razliku u debljini koriuma (Slika 15).



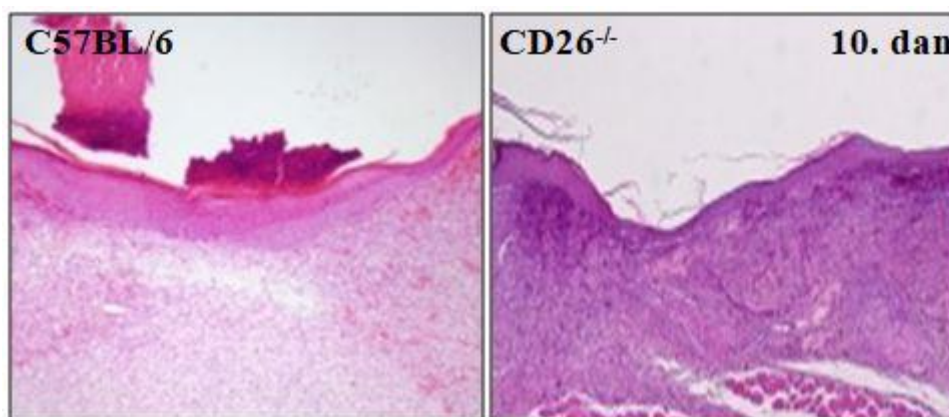
Slika 14. Histološki prikaz ranjenog tkiva sedmog dana od ranjavanja kod C57BL/6 i CD26^{-/-} miševa, HE bojanje; povećanje 40x

Iz Slike 15 možemo primijetiti da kod oba soja je debljina koriuma statistički značajno veća ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu što upućuje na regeneraciju koriuma. Možemo primijetiti da je regeneracija koriuma kod CD26^{-/-} miševa nešto sporija drugog i četvrtog dana u odnosu na C57BL/6 miševе, ali sedmog i desetog dana uočena je statistički značajno veća ($p < 0,05$) debljina koriuma kod CD26^{-/-} miševa u odnosu na C57BL/6 miševе.

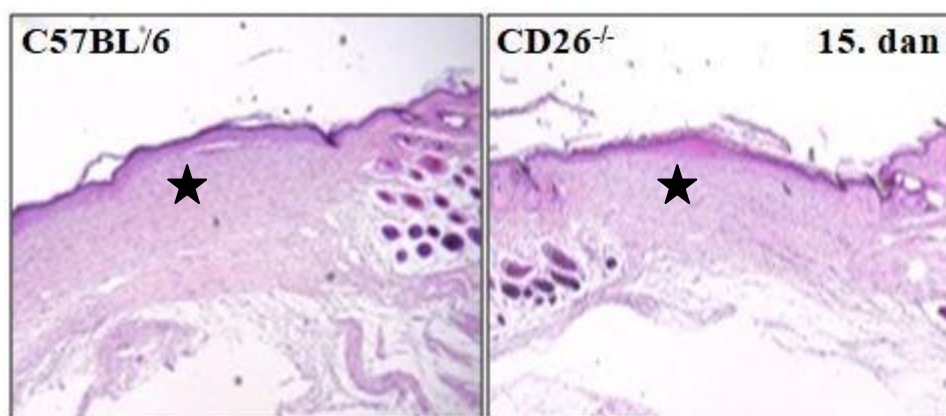


Slika 15. Prikaz debljine koriuma kod C57BL/6 i CD26^{-/-} miševa; a - statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu, b - statistička značajna razlika ($p < 0,05$) između sojeva

Desetog dana od ranjavanja može se primijetiti da se navedena razlika između sojeva smanjuje zbog kontrakcije rane i nastanka ožiljka (Slika 16), dok se petnaestog dana može uočiti potpuna reepitelizacija na području defekta te ponovna uspostava mišićnog sloja sluznice, ali još uvijek nije uočena pojava dlaka i žlijezda lojnica (Slika 17).



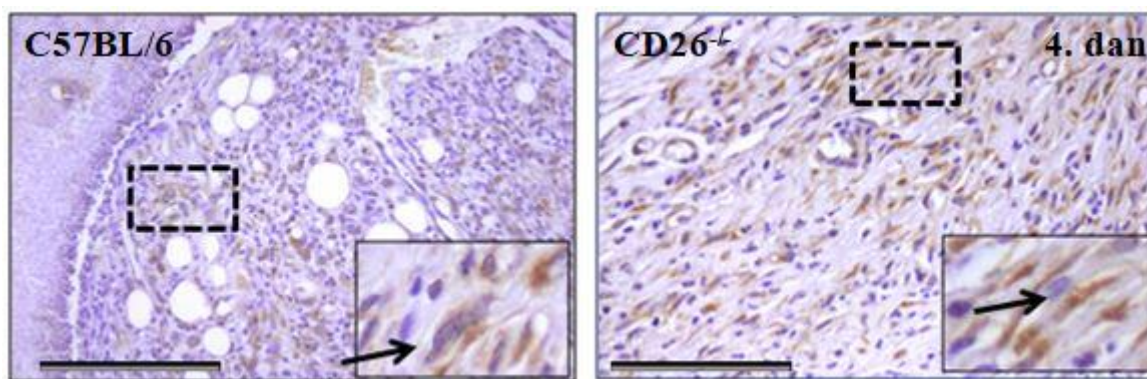
Slika 16. Histološki prikaz ranjenog tkiva desetog dana od ranjavanja kod C57BL/6 i CD26^{-/-} miševa, HE bojanje; povećanje 40x



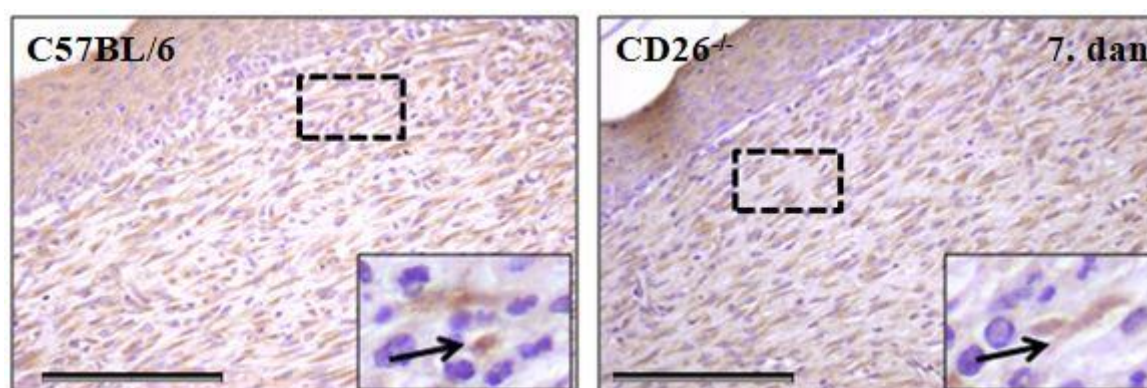
Slika 17. Histološki prikaz ranjenog tkiva petnaestog dana od ranjavanja kod C57BL/6 i CD26^{-/-} miševa, HE bojanje; povećanje 40x; zvjezdica prikazuje mjesto formiranja ožiljka

4.1.3. Izražaj HIF-1 α tijekom procesa cijeljenja rana

Kako bi istražili na koji način utječe nedostatak molekule DPP IV/CD26 na proces cijeljenja rana, a pogotovo na neovaskularizaciju, promatrali smo izražaj glavnog transkripcijskog faktora HIF-1, odnosno njegove podjedinice HIF-1 α , koji je odgovoran za sintezu VEGF-a. Izražaj HIF-1 α smo promatrali kod oba soja miševa tijekom drugog, četvrtog, sedmog, desetog i petnaestog dana cijeljenja rana. Pomoću imunohistokemijske i morfometrijske analize možemo utvrditi broj HIF-1 α pozitivnih stanica, te su rezultati ove analize prikazani na Slikama od 18. do 20. Slike 18. i 19. prikazuju mikroskopski prikaz za četvrti i sedmi dan nakon induciranja rane gdje je uočena razlika u broju HIF-1 α pozitivnih stanica između sojeva.



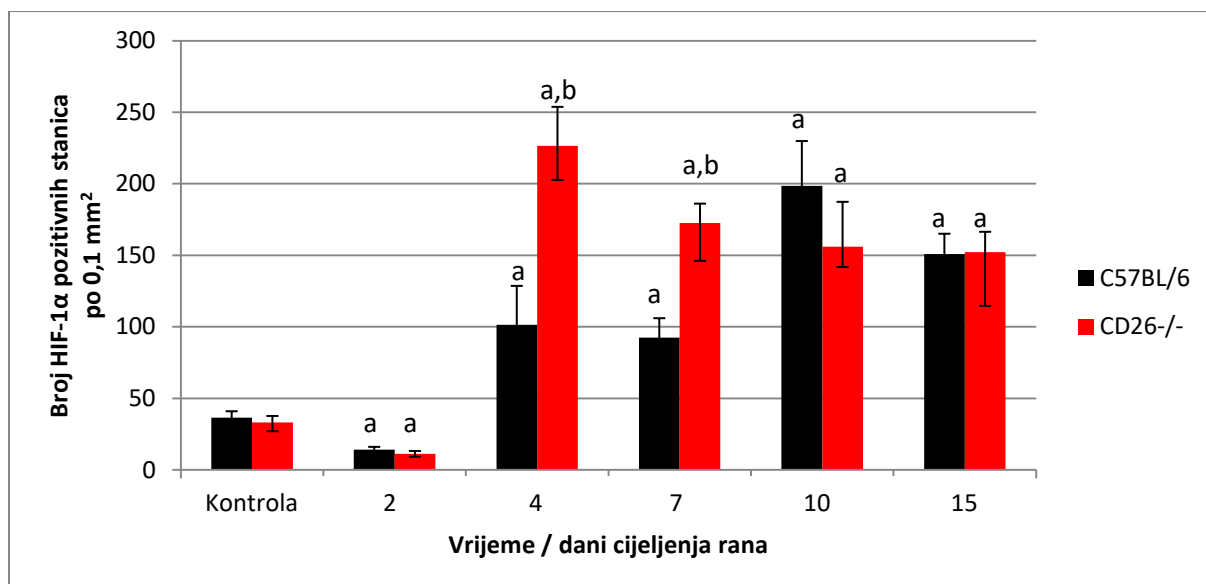
Slika 18. Imunohistokemijski prikaz HIF-1 α pozitivnih stanica četvrtog dana od ranjavanja; vizualizacija DAB-om, kontrastno bojanje hematoksilinom, povećanje 100x; Digitalno zumirani okvir prestavlja područje definirano crtkanim linijama; strijelica pokazuje smeđe obojene HIF-1 α pozitivne stanice u vezivnom tkivu koriuma



Slika 19. Imunohistokemijski prikaz HIF-1 α pozitivnih stanica sedmog dana od ranjavanja; vizualizacija DAB-om, kontrastno bojanje hematoksilinom, povećanje 100x; Digitalno zumirani okvir prestavlja područje definirano crtkanim linijama; strijelica pokazuje smeđe obojene HIF-1 α pozitivne stanice u vezivnom tkivu koriuma

Na Slici 20 može se primijetiti da je kod oba soja miševa u kontrolnoj koži pronađeno približno jednak broj HIF-1 α pozitivnih stanica, dok je drugog dana cijeljenja rana uočen statistički značajno manji ($p < 0,05$) broj HIF-1 α pozitivnih stanica kod obje skupine eksperimentalnih miševa u odnosu na kontrolu, što upućuje na činjenicu da se unutar rane još nije pojavila hipoksija. Tek se četvrtog dana može vidjeti statistički značajno veći ($p < 0,05$) broj HIF-1 α pozitivnih stanica kod obje skupine miševa u odnosu na kontrolu, te to upućuje da je u području rane došlo do pojave hipoksije što rezultira povećanom sintezom HIF-1 α . Također i ostali dani pokazuju statistički značajno veći ($p < 0,05$) broj HIF-1 α pozitivnih stanica kod obje skupine, ali se može primijetiti da kod C57BL/6 miševa taj broj nepravilno raste i pada. Kod tog soja vidljivo je da nakon što četvrtog dana poraste broj HIF-1 α pozitivnih stanica, desetog dana naglo naraste. S druge strane, kod CD26^{-/-} miševa broj naglo poraste četvrtog dana, a onda se kontinuirano smanjuje do petnaestog dana gdje

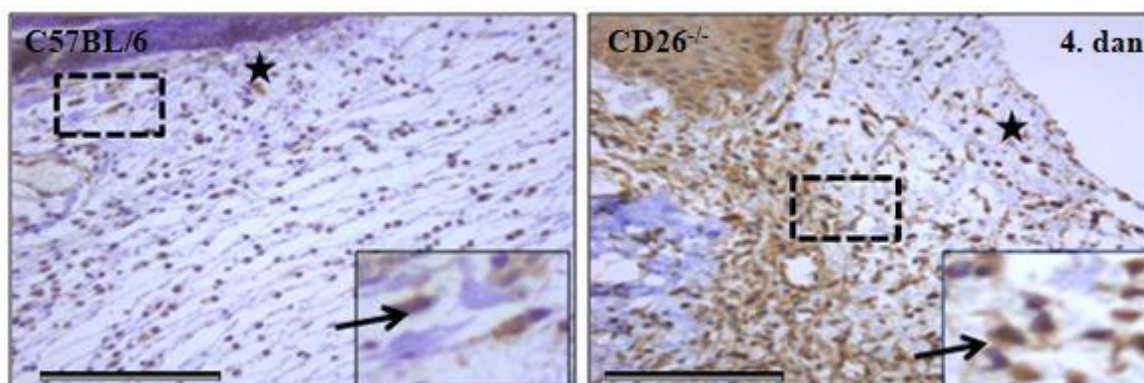
poprima približno jednaku vrijednost kao i kod C57BL/6 miševa što upućuje da hipoksija unutar stanice postupno nestaje. Razlika između sojeva je uočena četvrtog i sedmog dana gdje CD26^{-/-} miševi imaju statistički značajno veći ($p < 0,05$) broj HIF-1 α pozitivnih stanica u odnosu na C57BL/6 miševe.



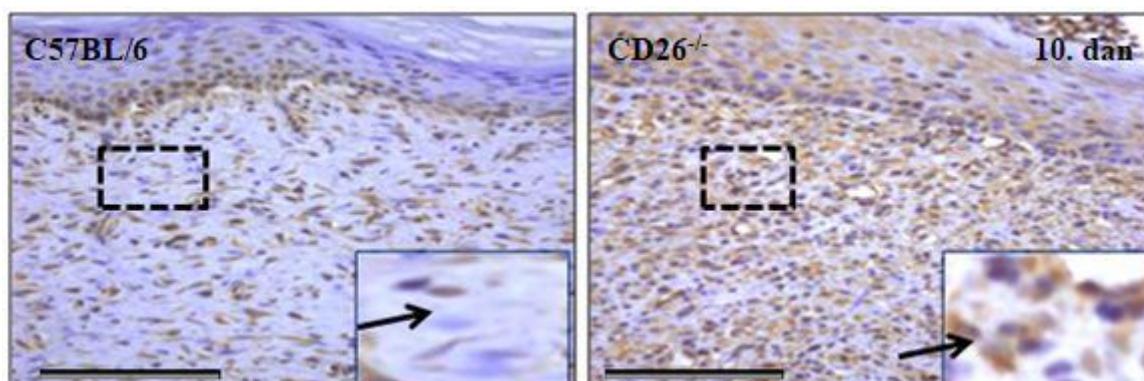
Slika 20. Prikaz broja HIF-1 α pozitivnih stanica po 0,1 mm² kod obje skupine eksperimentalnih životinja; a - statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu, b - statistička značajna razlika ($p < 0,05$) između sojeva

4.1.4. Izražaj VEGF-a tijekom procesa cijeljenja rana

Kako bismo mogli dalje ispitati na koji način utječe nedostatak molekule DPP IV/CD26 na proces cijeljenja rana, odnosno neovaskularizaciju, također smo promatrali izražaj VEGF-a kod oba soja miševa u zdravoj koži te tijekom drugog, četvrtog, sedmog, desetog i petnaestog dana cijeljenja rana. Imunohistokemijskom i morfometrijskom analizom mjerili smo izražaj VEGF-a u dermalnom tkivu te su rezultati prikazani na Slikama od 21. do 23. Razlika među sojevima je primijećena već drugog dana cijeljenja rana, a Slike 21. i 22. prikazuju mikroskopski prikaz izražaja VEGF pozitivnih stanica, dok Slika 23. prikazuje rezultate morfometrijske analize.



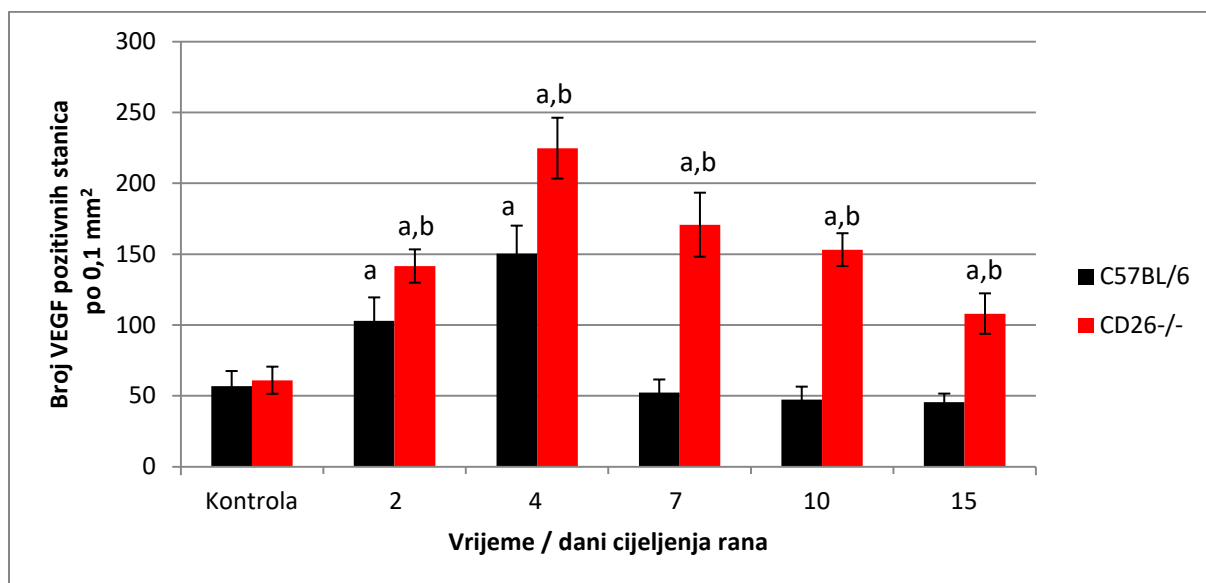
Slika 21. Imunohistokemijski prikaz VEGF pozitivnih stanica četvrtog dana od ranjavanja; vizualizacija DAB-om, kontrastno bojanje hematoksilinom, povećanje 100x; Digitalno zumirani okvir predstavlja područje definirano crtkanim linijama; strijelica pokazuje VEGF pozitivne stanice u vezivnom tkivu koriuma; zvjezdica prikazuje rahlo vezivno tkivo ispod epitela u oporavku



Slika 22. Imunohistokemijski prikaz VEGF pozitivnih stanica desetog dana od ranjavanja; vizualizacija DAB-om, kontrastno bojanje hematoksilinom, povećanje 100x; Digitalno zumirani okvir predstavlja područje definirano crtkanim linijama; strijelica pokazuje VEGF pozitivne stanice u vezivnom tkivu koriuma

Na Slici 23 možemo primijetiti da nije uočena razlika u izražaju VEGF-a u kontrolnoj koži. Međutim, već drugog dana nakon indukcije rane može se primijetiti da je statistički značajno veći ($p < 0,05$) broj VEGF pozitivnih stanica kod oba soja u odnosu na odgovarajuće kontrole, što znači da je u ranoj fazi cijeljenja rana započela sinteza VEGF. Vrhunac sinteze VEGF je uočen četvrtog dana gdje također obje skupine miševa ima statistički značajno veći ($p < 0,05$) broj VEGF pozitivnih stanica u odnosu na kontrolu. Kod C57BL/6 miševa može se primijetiti da je broj VEGF pozitivnih stanica naglo pao već sedmog dana, te je manji od broja utvrđenog kod kontrolne skupine. Za razliku od tog soja, kod CD26^{-/-} miševa možemo vidjeti da je broj VEGF pozitivnih stanica i dalje statistički značajno veći ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu i to sedmog, desetog te petnaestog dana. U tih miševa se lijepo može uočiti kontinuirani rast i kontinuirani pad broja VEGF pozitivnih stanica što upućuje na bolji poticaj angiogeneze. Razlika između sojeva je uočena tijekom

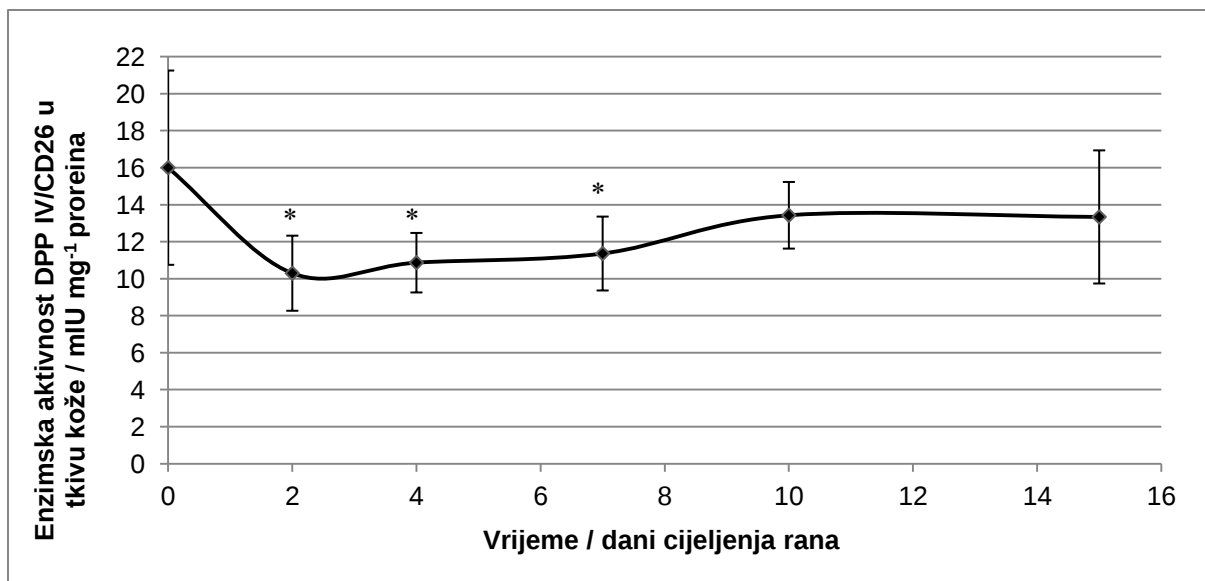
svih dana cijeljenja rana gdje $CD26^{-/-}$ miševi imaju statistički značajno veći ($p < 0,05$) broj VEGF pozitivnih stanica nego li C57BL/6 miševi.



Slika 23. Prikaz broja VEGF pozitivnih stanica po 0,1 mm² kod obje skupine eksperimentalnih životinja; a - statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu, b - statistička značajna razlika ($p < 0,05$) između sojeva

4.2. Enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u tkivu kože

Enzimska aktivnost DPP IV/CD26 u tkivu kože određena je kod C57BL/6 miša drugog, četvrtog, sedmog, desetog i petnaestog dana cijeljenja rana, te je uspoređena s kontrolnom skupinom (nultim danom, to jest kontrolnom kožom). Iz Slike 24. možemo primijetiti da se enzimski aktivnost DPP IV/CD26 u tkivu kože smanjuje nakon nastalog oštećenja, te je najniža drugog dana od ranjavanja. Nakon toga, enzimski aktivnost DPP IV/CD26 se postupno povećava tijekom ostalih dana cijeljenja rana. Daljnja statistička analiza je pokazala kako su vrijednosti enzimski aktivnosti DPP IV/CD26 drugog, četvrtog i sedmog dana od ranjavanja, statistički značajno niže ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu, to jest u odnosu na fiziološke vrijednosti. Petnaestog dana cijeljenja rana vrijednosti enzimski aktivnosti DPP IV/CD26 u području oštećene kože još uvijek ne poprimaju fiziološke vrijednosti, ali se ne razlikuju statistički od vrijednosti zapaženih kod zdrave kože.



Slika 24. Prikaz enzimске aktivnosti DPP IV/CD26 u tkivu kože C57BL/6 miševa tijekom različitih dana cijeljenja rana; * statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu (nulti dan - kontrolna koža)

5. RASPRAVA

Zacjeljivanje ranjenog tkiva prolazi kroz nekoliko faza kako bi došlo do potpunog ozdravljenja tkiva. Svaka faza ima svoju određenu ulogu koja pridonosi uspješnosti zacjeljenja rane. Proces započinje hemostazom (nultom fazom) koja je odgovorna za stvaranje privremenog matriksa za migraciju upalnih stanica i za skladištenje signalnih molekula (7). Potom slijedi upalna faza (faza I) u kojoj su dominantni neutrofili i makrofagi odgovorni za sprječavanje infekcija u rani, a makrofazi dodatno potiču stvaranje granulacijskog tkiva i iniciraju početak proliferacijske faze (faze II) (9, 10). Tijekom faze II dolazi do reepitelizacije, fibroplazije i angiogeneze (14), dok u završnoj fazi, odnosno fazi sazrijevanja (fazi III) dolazi do remodeliranja ekstracelularnog matriksa i kolagena kako bi došlo do konačnog formiranja tkiva, to jest ožiljka (24, 25).

U regulaciji navedenih faza sudjeluju različite signalne molekule kao što su citokini, kemokini i faktori rasta (75), te tri glavne skupine endoproteaza među koje ubrajamo metaloproteaze, katepsin-cistein proteaze i serinske proteaze (26). Član serinskih proteaza je i DPP IV/CD26 koja je upravo ciljna molekula ovog istraživanja (31). Za DPP IV/CD26 je dokazano da ima važnu ulogu u migraciji, adheziji i apoptozi stanica što upućuje na pretpostavku da ima potencijalnu važnu ulogu u procesu cijeljenja rana (64). Kako tijekom cijeljenja rana sudjeluju različite signalne molekule među kojima se nalaze neki od supstrata DPP IV/CD26, to upućuje da ovaj enzim putem njih može utječe na proces cijeljenja rana. S obzirom na to da još nije dovoljno istraženo na koji način ova molekula utječe na procese cijeljenja rana, cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj DPP IV/CD26 na ključne faktore angiogeneze, to jest HIF-1 α i VEGF-a, uspostavom pokusnog modela cijeljenja rana kod divljeg tipa i CD26 deficijentnih miševa. Nakon induciranja rane, kod oba soja pokusnih životinja pratili smo tijek cijeljenja rana kroz definirana vremenska razdoblja nakon ranjavanja različitim tehnikama.

Makroskopska analiza ukazala nam je da postoji određena razlika u cijeljenju rana između ispitanih sojeva. Kod CD26^{-/-} miševa već od četvrtog dana pa sve do petnaestog dana dolazi do relativno uspješnijeg cijeljenja rana. Kako bi kvantificirali navedena opažanja, učinjena je analiza postotka zatvaranja rane u cilju boljeg uvida u proces cijeljenja ranjenog tkiva kod ispitanih sojeva. Ti nam rezultati pokazuju da je veći postotak zatvaranja rane kod CD26^{-/-} miševa u odnosu na divlji tip tijekom svih definiranih dana cijeljenja ranjenog tkiva. Razlika među ispitanim sojevima najveća je četvrtog i sedmog dana, gdje je uočen statistički značajno veći ($p < 0,05$) postotak zatvaranja rane kod CD26^{-/-} miševa u odnosu na divlji tip. Kako bismo detaljnije utvrdili na koji način utječe nedostatak DPP IV/CD26 na ovaj proces provedena je i mikroskopska analiza na uzorcima tkiva koji su podvrgnuti histomorfometrijskoj, imunohistokemijskoj i patohistološkoj analizi.

Mikroskopskom analizom ranjenog tkiva kod oba soja miševa utvrđeno je da nakon drugog dana od ranjavanja nedostaje epitel, te da dolazi do infiltracije mononukleara u područje rane, što ukazuje na kraj nulte faze, a početak upalne faze. Također je kod oba soja ispitivanih životinja uočen na površini defekta tanak sloj fibrinskog ugruška. Kod oba soja miševa je uočeno da nakon četvrtog dana od ranjavanja na površini defekta se nalaze fibrinske naslage ispod kojih je vidljiva rubna proliferacija epitela koji je još uvijek u tom području tanak i bez vezivno-tkivnih papila. Razlika između ispitanih sojeva u reakciji tkiva na inducirano oštećenje tkiva uočeno je sedmog dana od ranjavanja. Tog dana je primijećeno da CD26^{-/-} miševi imaju veću debljinu epitela u odnosu na C57BL/6 miševe. Uočeno je i da CD26^{-/-} miševi u vezivnom tkivu koriuma imaju veći broj stanica i veću količinu međustaničnog matriksa što naposljetku dovodi do bržeg ulaska u proliferacijsku fazu. Navedeno potvrđuju i rezultati morfometrijske analize koji pokazuju da unatoč sporije regeneracije koriuma kod CD26^{-/-} miševa tijekom drugog i četvrtog dana u odnosu na C57BL/6 miševe, sedmog i desetog dana je primijećena statistički značajno veća ($p < 0,05$) debljina koriuma kod CD26^{-/-} miševa u odnosu na divlji tip. Desetog dana od ranjavanja može se primijetiti da se navedena razlika između sojeva smanjuje zbog kontrakcije rane i nastanka ožiljka, a petnaestog dana je uočena potpuna reepitelizacija i ponovna uspostava mišićnog sloja sluznice. Također, petnaestog dana je primijećeno da nije došlo do pojave dlaka i žlijezda lojnica. Ovi nam rezultati pokazuju da kod CD26^{-/-} miševa upalna faza traje kraće, brže dolazi do reepitelizacije, proliferacija stanica je izraženija, te dolazi do bržeg formiranja ožiljkastog tkiva.

Razlog uspješnijeg cijeljenja rana kod CD26^{-/-} miševa može se potražiti i u procesu angiogeneze, pa smo iz toga razloga u ovom istraživanju pratili utjecaj nedostatak DPP IV/CD26 na izražaj HIF-1 α i VEGF-a, dva najvažnija faktora za poticanje procesa angiogeneze.

Tijekom cijeljenja ranjenog tkiva dolazi do pojave hipoksije što uzrokuje aktivaciju transkripcijskog faktora HIF-1 koji se sastoji od α i β podjedinice, a jedino ekspresija α podjedinica ovisi o hipoksiji (21), što upućuje na činjenicu da HIF-1 α ima ključnu ulogu u procesu cijeljenja rana (22). Hipoksija je glavni pokretač ekspresije HIF-1 α u citoplazmi stanice koji u jezgri zajedno sa HIF-1 β formira aktivirani HIF-1 koji potiče sintezu VEGF-a, ali i SDF-1 α (20, 23). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se u kontrolnoj koži oba soja miševa nalazi približno jednak broj HIF-1 α pozitivnih stanica, a nakon dva dana od ranjavanja uočeno je statistički značajno manji ($p < 0,05$) broj HIF-1 α pozitivnih stanica kod oba soja u odnosu na kontrolu. Ovo nam može ukazati da u području rane nije još došlo do pojave hipoksije. Tek smo četvrtog dana od ranjavanja uočili statistički značajno veći ($p < 0,05$) broj HIF-1 α pozitivnih stanica kod oba soja miševa u odnosu na kontrolu, što nam ukazuje da je u rani došlo do pojave hipoksije što rezultira povećanom sintezom HIF-1 α kod

oba soja. Nadalje, rezultati nam pokazuju da postoji razlika između CD26^{-/-} i divljeg tipa miševa u izražaju HIF-1 α . Primijećeno je da četvrtog dana kod CD26^{-/-} miševa dolazi do naglog porasta broja HIF-1 α pozitivnih stanica te se taj broj kontinuirano smanjuje do petnaestog dana. S druge strane, kod C57BL/6 miševa taj broj nepravilno raste i pada i tek desetog dana od ranjavanja postiže maksimalnu vrijednost broja HIF-1 α pozitivnih stanica. Statistički značajna razlika između sojeva uočena je četvrtog i sedmog dana gdje CD26^{-/-} miševi imaju statistički značajno veći ($p < 0,05$) broj HIF-1 α pozitivnih stanica u odnosu na divlji tip. Ovi rezultati nam pokazuju da je sinteza HIF-1 α bolje regulirana kod CD26^{-/-} miševa što ukazuje i na činjenicu da hipoksični uvjeti u rani postupno nestaju, odnosno da se koncentracija kisika vraća u fiziološke vrijednosti. Kako se koncentracija kisika vraća u normalu, dolazi do vezanja kisika na HIF-1 α što ga blokira da vrši svoju funkciju (6).

Jedan od najvažnijih procesa cijeljenja rana jest angiogeneza koja će omogućiti normalnu cirkulaciju krvi u rani, te tako ukloniti hipoksične uvjete, odnosno stvorit će nove krvne žile koje će opskrbiti ranjeno tkivo hranjivim tvarima i kisikom kako bi moglo što uspješnije zacijeliti. Glavni poticaj za angiogenezu ima VEGF koji se oslobađa djelovanjem transkripcijskog faktora HIF-1 (14, 17, 20). Kako postoji poveznica između HIF-1 i VEGF-a, u ovom istraživanju smo pratili i izražaj VEGF-a. Dobiveni rezultati nam pokazuju da u kontrolnoj koži nema razlike između CD26^{-/-} miša i divljeg tipa u izražaju VEGF-a. Promjene u izražaju te molekule primijećene su drugog dana od ranjavanja, a osobito četvrtog dana gdje je kod oba soja uočen statistički značajno veći ($p < 0,05$) broj VEGF pozitivnih stanica u odnosu na kontrolu. Vrhunac sinteze VEGF-a je uočen četvrtog dana kod oba soja. Utvrđena je razlika u izražaju VEGF-a između CD26^{-/-} miševa i miševa divljeg tipa, koja je vidljiva tijekom svih dana cijeljenja rana: CD26^{-/-} miševi imaju statistički značajno veći ($p < 0,05$) broj VEGF pozitivnih stanica u odnosu na C57BL/6 miševe u ispitivanim intervalima cijeljenja rana. Zanimljivo je primijetiti kako kod C57BL/6 miševa nakon što četvrtog dana broj VEGF pozitivnih stanica dosegne maksimum, već sedmog dana taj broj naglo pada te doseže niže vrijednosti u odnosu na kontrolnu skupinu. S druge strane, kod CD26^{-/-} miševa možemo uočiti kontinuirani rast i kontinuirani pad broja VEGF pozitivnih stanica što nam upućuje da kod tih miševa dolazi do boljeg poticanja angiogeneze što ujedno može doprinijeti objašnjenju zbog čega kod CD26^{-/-} miševa dolazi do uspješnijeg cijeljenja rana. Kada usporedimo rezultate izražaja HIF-1 α i VEGF, kod CD26^{-/-} miševa možemo primijetiti kako se četvrtog, sedmog, desetog i petnaestog dana smanjuje broj HIF- α pozitivnih stanica, tako se smanjuje i broj VEGF pozitivnih stanica, dok kod C57BL/6 miševa nije takav slučaj. Ovo nam opažanje ukazuje na postojanje razlika u odvijanju angiogeneze u uvjetima nedostatka DPP IV/CD26.

Istraživanje koje je proveo Marfella sa suradnicima (86) pokazuje slične rezultate izražaja HIF-1 α i VEGF kod dijabetičkih bolesnika s kroničnim ulkusom stopala koji su

primjenjivali terapiju vildagliptina, inhibitora DPP IV/CD26 u kliničkoj primjeni. Njihovo istraživanje je pokazalo kako inhibicija DPP IV/CD26 poboljšava izlječenje kroničnih ulkusa stopala kao rezultat povećane ekspresije HIF-1 α i VEGF. Ovo se poklapa s rezultatima ovog istraživanja, gdje je također primijećena povećana ekspresija HIF-1 α i VEGF-a kod CD26^{-/-} miševa te je primijećeno uspješnije cijeljenje rana u uvjetima nedostatka DPP IV/CD26.

Kako bismo mogli bolje razumjeti rezultate koji se odnose na HIF-1 α i VEGF, potrebno je poznavati na koji način zapravo DPP IV/CD26 utječe na te molekule. Za DPP IV/CD26 je poznato da može utjecati na proces angiogeneze putem svojih supstrata i to enzimskim djelovanjem na NPY i SDF-1 α . Proteolitičkim djelovanjem DPP IV/CD26 odcepljuje dvije terminalne aminokiseline NPY te nastaje molekula NPY(3-36) koja je specifična za povezivanje na receptore Y2 i Y3 ali ne i na Y1 (79). NPY(3-36) preko tih receptora stimulira adheziju, migraciju i proliferaciju endotelnih stanica što je vrlo važno za angiogenezu (80). Osim toga, NPY može stimulirati VEGF, što pojačava angiogeni poticaj te što omogućuje bolje sazrijevanje novonastalih krvnih žila (79). SDF-1 α utječe na angiogenezu na način da preko svoga receptora CXCR4 na endotelnim stanicama potiče njihovu kemotaksiju, proliferaciju i migraciju (81), a dodatno tome može još pojačati VEGF-induciranu proliferaciju endotelnih stanica (82). Ekspresija SDF-1 α je regulirana zajedno s VEGF, od strane HIF-1 (79). Iz ovoga možemo pretpostaviti da DPP IV/CD26 djelovanjem na NPY može stimulirati VEGF, a preko SDF-1 α može smanjiti utjecaj VEGF-a. Nadalje, druga istraživanja pokazuju da DPP IV/CD26 preko svog supstrata GLP-1 može također utjecati na ekspresiju VEGF-a. Ta istraživanja su pokazala da GLP-1 može poboljšati proliferaciju i diferencijaciju endotelnih stanica tako što može utjecati na regulaciju HIF-1 α i sintezu VEGF-a (87, 88). Također je poznato da DPP IV/CD26 može utjecati na angiogenezu tako što djelovanjem na IP-10 i MIG smanjuje njihovu kemotaktičku sposobnost, a ostavlja im sposobnost da inhibiraju angiogenezu (76).

Naposljetku, u ovom smo istraživanju također određivali enzimsku aktivnost DPP IV/CD26 u tkivu kože kod C57BL/6 miševa u kontrolnoj koži te drugog, četvrtog, sedmog, desetog i petnaestog dana od indukcije rane. Rezultati ove analize na pokazuju da su vrijednosti enzimske aktivnosti DPP IV/CD26 drugog, četvrtog i sedmog dana statistički značajno niže ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu kožu. Ovo je zapažanje u skladu s rezultatima koji pokazuju sniženu enzimsku aktivnost DPP IV/CD26 u serumu i tkivu kod raznih upalnih procesa kao što je mišji model upalne bolesti crijeva (89). Osim regulacijskim mehanizmom, ova se pojava može djelomično objasniti i samom činjenicom destrukcije ranjenog tkiva.

Iz svega navedenog možemo donekle objasniti dobivene rezultate koji pokazuju povećanu ekspresiju HIF-1 α i VEGF-a kod CD26^{-/-} miševa zbog činjenice da određeni supstrati DPP IV/CD26 mogu efikasnije vršiti svoju funkciju u odsutnosti ove molekule zbog

njihovog duljeg vremena poluživota. Stoga, možemo pretpostaviti da inhibicija DPP IV/CD26 može poboljšati zacjeljivanje rana na način što proces angiogeneze postaje efikasniji, a što dovodi do uspješnije reparacije i regeneracije ranjenog tkiva. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pridonose boljem razumijevanju uloge DPP IV/CD26 u procesima cijeljenja rane te mogu doprinijeti razvoju novih terapijskih pristupa usmjerenih k poboljšanju zacjeljivanja oštećenog tkiva. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razjasnio utjecaj DPP IV/CD26 na učinke ostalih faktora u nastanku novih krvnih žila te regeneraciji i reparaciji tkiva.

6. ZAKLJUČCI

Iz rezultata dobivenih ovim istraživanjem proizlaze sljedeći zaključci:

1. U uvjetima nedostatka DPP IV/CD26 dolazi do statistički značajno većeg postotka zatvaranja rane ($p < 0,05$). Kod CD26^{-/-} miševa upalna faza traje kraće, brže dolazi do reepitelizacije, proliferacija stanica je izraženija, te dolazi do bržeg formiranja ožiljkastog tkiva;
2. Izražaj molekula VEGF i HIF-1 α u kontrolnoj koži ne razlikuje se između CD26^{-/-} i C57BL/6 životinja, ali nedostatak DPP IV/CD26 utječe na izražaj HIF1- α i VEGF tijekom procesa cijeljenja rana:
 - a. izražaj molekule HIF-1 α statistički je značajno viši ($p < 0,05$) četvrtog i sedmog dana cijeljenja rane kod CD26^{-/-} životinja;
 - b. izražaj molekule VEGF statistički značajno viši ($p < 0,05$) u svim ispitivanim danima cijeljenja rane kod CD26^{-/-} životinja u odnosu na divlji tip.
3. Vrijednosti enzimске aktivnosti DPP IV/CD26 drugog, četvrtog i sedmog dana cijeljenja rana kod C57BL/6 životinja statistički su značajno niže ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu kožu.

Dobiveni rezultati potvrđuju pretpostavku da DPP IV/CD26 ima značajnu ulogu u procesu cijeljenja rane i putem modulacije izražaja VEGF i HIF-1 α , ključnih faktora angiogeneze. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razjasnio utjecaj DPP IV/CD26 na učinke ostalih faktora u nastanku novih krvnih žila te regeneraciji i reparaciji tkiva.

7. LITERATURA

1. Lipozenčić J. Uloga kože, razvitak kože, pregled građe i funkcija kože. *In*: Lipozenčić J i sur. (eds) Dermatovenerologija. Treće izmijenjeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2008;5-9.
2. Martin P. Wound healing - aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997;276:75-81.
3. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Sur Clin North Am* 1997;77:509-28.
4. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 2009;37:1528-42.
5. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010;89:219-29.
6. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 2004;9:283-9.
7. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83:835-70.
8. Hantash BM, Zhao L, Knowles JA, Lorenz HP. Adult and fetal wound healing. *Front Biosci* 2008;13:51-61.
9. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008;16:585-601.
10. Harding KG, Morris HL, Patel GK. Science, medicine and the future: healing cronic wound. *BMJ* 2002;324:160-3
11. Peterson JM, Barbul A, Breslin RJ, Wasserkrug HL, Efron G. Significance of T-lymphocytes in wound healing. *Surgery* 1987;102:300-5.
12. Efron JE, Frankel HL, Lazarou SA, Wasserkrug HL, Barbul A. Wound healing and T-lymphocytes. *J Surg Res* 1990;48:460-3.
13. Gawronska-Kozak B, Bogacki M, Rim JS, Monroe WT, Manuel JA. Scarless skin repair in immunodeficient mice. *Wound Repair Regen* 2006;14:265-76.
14. Mendonça RJ, Coutinho-Netto J. Cellular aspects of wound healing. *An Bras Dermatol* 2009;84:257-62.
15. Damjanov I, Aralica G, Batelja Vuletić L, Seiwert S. Upala. *In*: Damjanov I i sur. (eds) Patologija. Četvrto prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2014;63-72.
16. Carmelito P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473:298-307.
17. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair. *Adv Wound Care* 2014;3:647-61.

18. Guyton AC. Fiziologija čovjeka i mehanizmi bolesti. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada 1995:133-4.
19. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998;152:1445-52.
20. Semenza GL. Regulation of hypoxia-induced angiogenesis: a chaperone escorts VEGF to the dance. *J Clin Invest* 2001;108:39-40.
21. Van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF- κ B. *Biochem J* 2008;412:477-84.
22. Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, Catrina AI, Grunler J, Lindberg S et al. Stabilization of HIF-1 α is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:19426-31.
23. Hong WX, Hu MS, Esquivel M, Liang GY, Rennert RC, McArdle A et al. The role of hypoxia-inducible factor in wound healing. *Adv Wound Car* 2014;3:390-9.
24. Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:2059-81.
25. Velner T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 2009;37:1528-42.
26. Van Hinsbergh VW, Engelse MA, Quax PH. Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:716-28.
27. Muller M, Trocme C, Lardy B, Morel F, Halimi S, Benhamou PY. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet Med* 2008;25:419-26.
28. Seo DW, Li H, Wingfield PT, Diaz T, Salloum R, Wei BY et al. TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell* 2003;114:171-80.
29. Oh J, Seo DW, Diaz T, Wei B, Ward Y, Ray JM et al. Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. *Cancer Res* 2004;64:9062-9.
30. Qi JH, Ebrahim Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M et al. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med* 2003;9:407-15.
31. Yu DM, Yao TW, Chowdhury S, Nadvi NA, Osborne B, Church WB et al. The dipeptidyl peptidase IV family in cancer and cell biology. *FEBS J* 2010;277:1126-44.
32. Wesley UV, McGroarty M, Momoyouni A. Dipeptidyl peptidase inhibits malignant phenotype of prostate cancer cells by blocking basic fibroblast growth factor signaling pathway. *Cancer Res* 2005;65:1325-34.

33. De Meester I, Koroma S, Van Damme J, Scharpé S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol Today* 1999;20:367-75.
34. Hopsu-Havu VK, Glenner GG. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie* 1966;7:197-201.
35. Koivisto V. Discovery of dipeptidyl-peptidase IV - a 40 year journey from bench to patient. *Diabetologia* 2008;51:1088-9.
36. Lojda Z. Studies on glycyl-proline naphthylamidase. I. Lymphocytes. *Histochemistry* 1977;54:299-309.
37. Küllertz G, Fischer G, Barth A. [Catalytic mechanism of dipeptidyl-peptidase IV]. *Acta Biol Med Ger* 1978;37:559-67.
38. Hanski C, Hunle T, Reutter W. Involvement of plasma membrane dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated adhesion of cells on collagen. *Bio Chem Hoppe Seyler* 1985;366:1169-76.
39. Morrison ME, Vijayasaradhi S, Engelstein D, Albino AP, Houghton AN. A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. *J Exp Med* 1993;177:1135-43.
40. Ishii T, Ohnuma K, Murakami A, Takasawa N, Kobayashi S, Dang NH et al. CD26-mediated signaling for T cell activation occurs in lipid rafts through its association with CD45RO. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12138-43.
41. Ogata S, Misumi Y, Ikehara Y. Primary structure of rat liver dipeptidyl peptidase IV deduced from its cDNA and identification of the NH₂-terminal signal sequence as the membrane-anchoring domain. *J Bio Chem* 1989;264:3596-601.
42. Misumi Y, Hayashi Y, Arakawa F, Ikehara Y. Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface. *Biochim Biophys Acta* 1992;1131:333-6.
43. Ohnuma K, Morimoto C. DPP4 (Dipeptidyl-peptidase 4). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2013;17:310-12.
44. Abbott CA, Baker E, Sutherland GR, McCaughan GW. Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene. *Immunogenetics* 1994;40:331-8.
45. Batičić Pučar L, Detel D, Varljen J. Dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV/CD26) i upalne bolesti crijeva. *Arh Hig Rada Toksikol* 2012;63:75-100.
46. Engel M, Hoffmann T, Wagner L, Wermann M, Heiser U, Kiefersauer R et al. The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5063-8.

47. Aertgeerts K, Ye S, Tennant MG, Kraus ML, Rogers J, Sang BC et al. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation. *Protein Sci* 2004; 13:412-21.
48. Bjelke JR, Christensen J, Branner S, Wagtmann N, Olsen C, Kanstrup AB et al. Tyrosine 547 constitutes as essential part of the catalytic mechanism of dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem* 2004;279:34691-7.
49. Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003;40:209-94.
50. Durinx C, Lambeir AM, Bosmans E, Falmagne JB, Berghmans R, Haemers A et al. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur J Biochem* 2000;267;267:5608-13.
51. Nagatsu T, Hino M, Fuyamada H, Hayakawa T, Sakakibara S, Nakagawa Y et al. New chromogenic substrates for X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase. *Anal Biochem* 1974;74:466-76.
52. Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:1723-47.
53. Riemann D, Hansen GH, Niels-Christiansen L, Thorsen E, Immerdal L, Santos AN et al. Caveolae/lipid rafts in fibroblast-like synoviocytes: ectopeptidase-rich membrane microdomains. *Biochem J* 2001;354:47-55.
54. Boonacker E, Van Noorden CJ. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur J Cell Biol* 2003;82:53-73.
55. Van Damme J, Struyf S, Wuyts A, Van Coillie E, Menten P, Schols D et al. The role of CD26/DPP IV in chemokine processing. *Chem Immunol* 1999;72:42-56.
56. Pauly RP, Rosche F, Wermann M, McIntosh CH, Pederson RA, Demuth HU. Investigation of glucose-dependent insulintropic polypeptide-(1-42) and glucagon-like peptide-1-(7-36) degradation in vitro by dipeptidyl peptidase IV using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. A novel kinetic approach. *J Biol Chem* 1996;271:23222-9.
57. Deacon CF. Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1. *Diabetes* 2004;53:2181-9.
58. Kryemann B, Ghatei MA, Williams G, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* 1987;2:1300-4.
59. Franco R, Valenzuela A, Lluís C, Blanco J. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol Rev* 1998;161:27-42.

60. Iwaki-Egawa S, Watanabe Y, Fujimoto Y. CD26/dipeptidyl peptidase IV does not work as an adenosine deaminase-binding protein in rat cells. *Cell Immunol* 1997;178:180-6.
61. Pacheco R, Lluís C, Franco R. Role of CD26-adenosine deaminase interaction in the T cell-mediated immunity. *Immunol* 2005;24:235-45.
62. Weihofen WA, Liu J, Reutter W, Saenger W, Fan H. Crystal structure of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in complex with adenosine deaminase reveals a highly amphiphilic interface. *J Biol Chem* 2004;279:43330-5.
63. Herrera C, Morimoto C, Blanco J, Mallol J, Arenzana F, Lluís C et al. Comodulation of CXCR4 and CD26 in human lymphocytes. *J Biol Chem* 2001;276:19532-9.
64. Wang XM, Yu DM, McCaughan GW, Gorrel MD. Extra-enzymatic roles of DP-IV and FAP in cell adhesion and migration on collagen and fibronectin. *Adv Exp Med Biol* 2006;575:213-22.
65. Cheng W, Yan-hua R, Fang-gang N, Guo-az Z. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury. *Afr J Biotechnol* 2011;10:2524-9.
66. Löster K, Zeilinger K, Schuppan D, Reutter W. The cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD26) is the collagen-binding site. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;217:341-8.
67. Lenselink EA. Role of fibronectin in normal wound healing. *Int Wound J* 2015;12:313-6.
68. Ohnuma K, Takahashi N, Yamochi T, Hosono O, Dang NH, Morimoto C. Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human T cell activation and function. *Front Biosci* 2008;13-2299-310.
69. Fleischer B. CD26: a surface protease involved in T-cell activation. *Immunol Today* 1994;15:180-4.
70. Bühling F, Junker U, Reinhold D, Neubert K, Jäger L, Ansorge S. Functional role of CD26 on human B lymphocytes. *Immunol Lett* 1995;45:47-51.
71. Kahne T, Lendeckel U, Wrenger S, Neubert K, Ansorge S, Reinhold D. Dipeptidyl peptidase IV: a cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (review). *Int J Mol Med* 1999;4:3-15.
72. Gorrell MD. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clin Sci* 2005;108:277-92.
73. Henry LR, Lee HO, Lee JS, Klein-Szanto A, Watts P, Ross EA et al. Clinical implications of fibroblast activation protein in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:1736-41.

74. Yu DM, Wang XM, McCaughan GW, Gorrell MD. Extraenzymatic functions of the dipeptidyl peptidase IV-related proteins DP8 and DP9 in cell adhesion, migration and apoptosis. *FEBS J* 2006;273:2447-60.
75. Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012;26:812-20.
76. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation and pain. *Int Anesthesiol Clin* 2007;45:27-37.
77. Shah JMY, Omar E, Pai DR, Sood S. Cellular events and biomarkers of wound healing. *Indian J Plast Surg* 2012;45:220-8.
78. Bauvois B. Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis? *Oncogene* 2004;23:317-29.
79. Matheeußen V, Jungraithmayr W, De Meester I. Dipeptidyl peptidase 4 as a therapeutic target in ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Ther* 2012;136:267-82.
80. Zukowska Z, Grant DS, Lee EW. Neuropeptide Y: a novel mechanism for ischemic angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13:86-92.
81. Gilltzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* 2001;69:513-21.
82. Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Escencay M, Mendez O et al. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest* 2006;86:1221-32.
83. Peters T, Sindrilaru A, Hinz B, Hinrichs R, Menke A, Al-Azzeh EA et al. Wound-healing defect of CD18(-/-) mice due to a decrease in TGF-beta1 and myofibroblast differentiation. *EMBO J* 2005;24:3400-10.
84. Straino S, Di Carlo A, Mangoni A, De Mori R, Guerra L, Maurelli R et al. High-mobility group box 1 protein in human and murine skin: involvement in wound healing. *J Invest Dermatol* 2008;128:1545-53.
85. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
86. Marfella R, Sasso FC, Rizzo MR, Paolisso P, Barbieri M, Padovano V et al. Dipeptidyl peptidase 4 inhibition may facilitate healing of chronic foot ulcers in patients with type 2 diabetes. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:892706.
87. Xiao-Yun X, Zhao-Hui M, Ke C, Hong-Hui H, Yan-Hong X. Glucagon-like peptide-1 improves proliferation and differentiation of endothelial progenitor cells via upregulating VEGF generation. *Med Sci Monit* 2011;17:BR35-41.
88. Van de Velde S, Hogan MF, Montminy M. Mtor links incretin signaling to HIF induction in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:16876-82.

89. Detel D, Pugel E, Pucar L, Buljevic S, Varljen J. Development and resolution of colitis in mice with target deletion of dipeptidyl peptidase IV. *Exp Physiol* 2012;97:486-96.

8. ŽIVOTOPIS

Antonijo Grčić, univ. bacc. sanit. ing.

Datum i mjesto rođenja:

17. kolovoz 1989., Rijeka, Republika Hrvatska

Obrazovanje:

1996.-2000.: Osnovna škola „Belveder“, Rijeka

2000.-2004.: Osnovna škola „Kozala“, Rijeka

2004.-2008.: Kemijsko-grafička škola, Rijeka

Kemijska tehnologija A - Kemijski tehničar

2008.: Narodno učilište Rijeka; Ministarstvo unutarnjih poslova, Republika Hrvatska

Osposobljavanje za obavljanje poslova privatne zaštite - zaštitar

2012.-2015.: Medicinski fakultet Rijeka

Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva

2015.-2017.: Medicinski fakultet Rijeka

Diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva

Zaposlenja:

2008.-2011.: Protect Rijeka d.o.o.

2016.: Europske sveučilišne igre Zagreb - Rijeka 2016

Znanstveni rad:

Batičić Pučar L, **Grčić Antonijo**, Pernjak Pugel E, Detel D, Varljen J. Proces cijeljenja rane i dipeptidil-peptidaza IV. Med Flum 2017;53:4-15.

Završni rad:

Grčić Antonijo: „Utjecaj nedostatka dipeptidil-peptidate IV (DPP IV/CD26) na proces cijeljenja rana u miša.“ Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci. Mentori: prof.dr.sc. Jadranka Varljen, dr.sc. Lara Batičić Pučar. Datum obrane završnog rada: 20.07.2015.