



Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Maja Antolić

**REGENERACIJA SLUZNICE DEBELOG
CRIJEVA NA MODELU MIŠJEG KOLITISA
PROUZROČENOG NATRIJ DEKSTRAN
SULFATOM**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Maja Antolić

**REGENERACIJA SLUZNICE DEBELOG
CRIJEVA NA MODELU MIŠJEG KOLITISA
PROUZROČENOG NATRIJ DEKSTRAN
SULFATOM**

DOKTORSKI RAD

Mentorica: prof. dr. sc. Andrea Gudan Kurilj

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

Faculty of Veterinary Medicine

Maja Antolić

**REGENERATION OF THE COLON
MUCOSA IN A MURINE COLITIS MODEL
CAUSED BY DEXTRAN SULFATE
SODIUM**

DOCTORAL DISSERTATION

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

Faculty of Veterinary Medicine

Maja Antolić

**REGENERATION OF THE COLON
MUCOSA IN A MURINE COLITIS MODEL
CAUSED BY DEXTRAN SULFATE
SODIUM**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: prof. dr. sc. Andrea Gudan Kurilj

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

IZJAVA

Ja, Maja Antolić, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mogega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/-la drugim izvorima od onih navedenih u radu.

(potpis studenta)

Zagreb, 2026.

Doktorska disertacija predana je Fakultetskom vijeću Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za stjecanje doktorata znanosti iz područja veterinarskih znanosti. Rad predstavljen u ovoj doktorskoj disertaciji proveden je u tvrtki Selvita d.o.o., a pod mentorstvom prof. dr. sc. Andree Gudan Kurilj, PhD, DipECVP sa Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

O MENTORICI

Prof. dr. sc. Andrea Gudan Kurilj

Rođena je 22. listopada 1974. u Zaboku. Osnovnu školu pohađala je u Velikom Trgovišću, a srednju školu za medicinske sestre u Zagrebu, gdje je maturirala 1993. godine. Iste godine upisala je Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, gdje je diplomirala 2001. godine. Poslijediplomski doktorski studij veterinarske medicine, smjer patološka anatomija, upisala je 2002. godine, a doktorirala je 2009. godine.

U rujnu 2001. godine zaposlena je kao znanstveni novak u Zavodu za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Stručni, nastavni i znanstveni rad nastavila je na istom Zavodu, gdje je 2003. godine izabrana u suradničko zvanje asistenta. U suradničko zvanje višeg asistenta izabrana je 2009. godine, u zvanje docenta 2011., izvanrednog profesora 2016. godine te redovitog profesora 2021. godine. Sudjeluje u održavanju svih oblika nastave u okviru integriranog prijediplomskog i diplomskog studija veterinarske medicine te na nekoliko predmeta specijalističkog i dokorskog studija. Voditelj je poslijediplomskog specijalističkog studija „Uzgoj i patologija laboratorijskih životinja“. Dosad je u suautorstvu objavila sveučilišni priručnik u elektroničkom izdanju „Bolesti i liječenje pasa i mačaka“ (2011.) i sveučilišni udžbenik „Osnove razudbe domaćih životinja“ (2016.).

Radi stručnog i znanstvenog usavršavanja boravila je u zimskom semestru ak. god. 2004./2005. na Institutu za veterinarsku patologiju Sveučilišta u Zürichu. Usavršavala se i u ljetnim školama veterinarske patologije u organizaciji European College of Veterinary Pathologists (ECVP) (Helsinki, Finska, 2006.; Zaragoza, Španjolska, 2009.; Zürich, Švicarska, 2010.; Dublin, Irska, 2013.). Od siječnja 2013. do siječnja 2014. godine ponovno odlazi na Institut za veterinarsku patologiju Sveučilišta u Zürichu, gdje prolazi rezident trening u svrhu pripreme za polaganje ECVP certifikacijskog ispita, koji je uspješno položila 2015. godine i stekla titulu dipl. ECVP. Nakon položenog ispita prof. A. Gudan Kurilj napisala je rezidentni program edukacije, koji je prihvatilo Vijeće ECVP-a, te je 2016. godine Zavod za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu postao službeni centar za edukaciju kandidata za pristupanje ECVP certifikacijskom ispitu.

Samostalno ili u suradnji s drugim autorima objavila je više od 150 radova u znanstvenim i stručnim časopisima te zbornicima s domaćih i međunarodnih skupova. Bila je suradnica na

znanstvenim projektima koje je financiralo Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa pod nazivima: „Komparativna dijagnostika, morfometrija i analiza tumora ljudi i životinja“ te „Učestalost i distribucija animalnih tumora u Republici Hrvatskoj“ (2007. – 2013.). Također je bila suradnica na FP7 ERA Chair projektu „VetMedZg“ – „Upgrading the research performance in molecular medicine at the Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb“ (2014. – 2019.) u sklopu radnog paketa 3: Jačanje istraživačkih kapaciteta u usporednoj analizi tumora te na projektu Hrvatske zaklade za znanost – *Anisakis spp.* Genomic Epidemiology (2014. – 2018.). Prof. dr. sc. Andrea Gudan Kurilj bila je voditeljica projekta „Unapređenje stručne prakse na farmskim životinjama i konjima na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu – VETFARM“, UP.03.1.1.04 (2020. – 2023.). Osim navedenoga, prof. dr. sc. A. Gudan Kurilj sudjeluje i u istraživanjima koja koriste laboratorijske životinje, i to u svrhu procjene histopatoloških lezija. Od 2012. godine suradnica je na provedbi „Tečaja za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama i životinjama za proizvodnju bioloških pripravaka“ u organizaciji Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Članica je Europskog koledža veterinarske patologije, Europskog udruženja veterinarskih patologa i Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama. Od 2005. do 2009. godine bila je članica Uredničkog odbora znanstveno-stručnog časopisa Hrvatski veterinarski vjesnik, a od 2018. do 2026. godine u svojstvu pomoćnog urednika bila je članica Uredničkog odbora znanstvenog časopisa Veterinarski arhiv.

Do sada je aktivno sudjelovala u radu nekoliko povjerenstava i vijeća Veterinarskog fakulteta, i to Povjerenstva za međunarodnu suradnju, Povjerenstva za odlikovanje, Povjerenstva za integrirani prijediplomski i diplomski studij, Povjerenstva za knjižničnu i izdavačku djelatnost te Vijeća doktorskog studija i Vijeća specijalističkih studija. Od ožujka 2019. do listopada 2022. godine obnašala je dužnost prodekanice za integrirani studij i studente, a trenutačno obnaša dužnost predstojnice Zavoda za veterinarsku patologiju.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA U PROTEKLIH PET GODINA

PUVAČA, N., N. LEMO, F. BANOVIĆ, **A. GUDAN KURILJ** (2026): Comparative Histopathological Characterisation of Sebaceous Adenitis in Affected Poodle, Poodle-Related Breeds and Japanese Akita Dogs: A Retrospective, Blinded Study. *Vet. Derm.* 37:386–394
DOI: [org/10.1111/vde.70055](https://doi.org/10.1111/vde.70055).

KONJEVIĆ, D.; N. ŠKVORC, M. BUJANIĆ, J. ČURLÍK, A. GAŠPAR, I. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, **A. GUDAN KURILJ** (2026): Red Deer (*Cervus elaphus*) Fascioloidosis: From Liver Pathology to Regeneration. *Life*. 16, 502, 1-9.
DOI: [10.3390/life16030502](https://doi.org/10.3390/life16030502).

ERAGHI, V., I. CIPRIĆ, N. SERDAR, A. JONKER, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, D. VLAHOVIĆ, I. MIHOKOVIĆ BUHIN, I. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, B. ARTUKOVIĆ, D. HUBER, M. MATASOVIĆ, M. HOHŠTETER, **A. GUDAN KURILJ** (2025): Feline Lymphoma in Focus: Examining the Patterns and Types in Croatia's Pathological Records. *Vet. Sci.* 12, 10; 1-12.
DOI: [10.3390/vetsci12100986](https://doi.org/10.3390/vetsci12100986).

LANG BALIJA, M., M. JAGUŠIĆ, E. GAMULIN, R. JUG, I. BUTKOVIĆ, S. LUKAČEVIĆ MATELJAK, T. KURTOVIĆ, D. VNUK, **A. GUDAN KURILJ**, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, B. HALASSY, D. FORČIĆ (2025): Spontaneous Canine Mammary Tumors as a Platform for Human Breast Cancer Virotherapy Development. The Annual Meeting of the Croatian Immunological Society 2025. Njivice: Croatian Immunological Society (Hrvatsko imunološko društvo), 2025. str. 40-40.

LANG BALIJA, M., R. JUG, M. JAGUŠIĆ, E. GAMULIN, D. VNUK, **A. GUDAN KURILJ**, I. BUTKOVIĆ, B. HALASSY, D. FORČIĆ (2025): The Oncolytic Potential of the Human Virus in Canine Tumors. 9th European Congress of Virology. Cavtat, Hrvatska, 27.04.2025-30.04.2025.

ERAGHI, V., L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, M. MATASOVIĆ, D. VLAHOVIĆ, D. HUBER, **A. GUDAN KURILJ**, I. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, B. ARTUKOVIĆ, I. BUHIN MIHOKOVIĆ, I. CIPRIĆ, M. HOHŠTETER (2025): Canine lymphoma in Croatia: a fourteen-year retrospective study. BMC Veterinary Research, 21, 1; 172, 7.
DOI: 10.1186/s12917-025-04634-x.

ŠKVORC, N., M. BUJANIĆ, K. SEVERIN, L. ŠERIĆ JELASKA, M. PALIĆ, **A. GUDAN KURILJ**, S. KUŽIR, D. KONJEVIĆ (2024): Red deer (*Cervus elaphus*) antler myiasis caused by *Prochyliza nigrimanus* (Meigen 1826). Parasitol. Res. 123, 400.
DOI: 10.1007/s00436-024-08421-9.

ĐURAS, M., M. KOLENC, T. GOMERČIĆ, **A. GUDAN KURILJ**, A. GALOV, A; K. KORPES (2024): Intentional harm in marine mammals stranded dead in the Adriatic Sea, Croatia, 1990-2023. Diseases of aquatic organisms, 160, 75-93.
DOI: 10.3354/dao03826.

HUBER, D., K. SEVERIN, D. VLAHOVIĆ, S. KRIŽANAC, S. MOFARDIN, I. MIHOKOVIĆ BUHIN, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, I. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, **A. GUDAN KURILJ**, B. ARTUKOVIĆ, M. HOHŠTETER (2024): Cancer morbidity in Croatian cats: Retrospective study on spontaneously arising tumors (2009–2019). Topics in Companion Animal Medicine, 58, 1-7.
DOI: 10.1016/j.tcam.2023.100841.

REIL, I., S. DUVNJAK, S. ŠPIČIĆ, G. KOMPES, A. BAGARIĆ, M. ĐURAS, **A. GUDAN KURILJ**, M. LUKAČ, M. JELIĆ, M. ZDELAR-TUK (2024): Isolation of Multidrug-Resistant *Mycobacterium Avium* Subsp. *Avium* from a Wild Eurasian Otter (*Lutra Lutra*). Antibiotics, 13, 7; 591-601.
DOI: 10.3390/antibiotics13070591.

BRNIĆ, D., D. VLAHOVIĆ, **A. GUDAN KURILJ**, N. MALTAR-STRMEČKI, I. LOJKIĆ, V. KUNIĆ, L. JEMERŠIĆ, I. BAČANI, G. KOMPES, R. BECK, T. MIKULETIĆ, A. STEYER (2023): The impact and complete genome characterisation of viruses involved in outbreaks of gastroenteritis in a farrow-to-finish holding. Scientific reports, 13, 18780, 14.
DOI: 10.1038/s41598-023-45994-4.

LANG BALIJA, M., A. ŠTIMAC, T. KOŠUTIĆ GULIJA, **A. GUDAN KURILJ**, A. BEKAVAC, A. PLEĆAŠ, B. HALASSY, M. JAGUŠIĆ, D. FORČIĆ (2023): Evaluation of the interactions between mumps virus and guinea pig. *Journal of virology*, 97, 4; e00359-23, 17. DOI: 10.1128/jvi.00359-23.

PETAK, A., I. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, **A. GUDAN KURILJ**, N. LEMO (2022): A case of cutaneous bullous mastocytosis in a Yorkshire terrier puppy. *Vet. Derm.* 33, 4; 352-356. DOI: 10.1111/vde.13074

LANG BALIJA, M., **A. GUDAN KURILJ**, M. JAGUŠIĆ, D. FORČIĆ (2022): Mumps virus infection of guinea pigs. *Annual meeting of the Croatian Immunological Society Book of Abstracts*. 2022. str. 66-66

ZAHVALE

Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Andrei Gudan Kurilj na stručnoj pomoći, korisnim savjetima i kontinuiranom vodstvu tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se svojoj dragoj dugogodišnjoj voditeljici i internoj mentorici dr. sc. Snježani Čužić na usmjeravanju, pomoći, podršci i suradnji tijekom cijele moje znanstvene karijere, kao i na predloženim idejama tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem kolegama Viktoriji Pogačić, Ivanu Ditrihu, dr. sc. Anamariji Markoti i Anni Volaj-Bijelić na pomoći u eksperimentalnom dijelu istraživanja te kolegicama Ani Bosak, Gordani Jelić, Mireli Janjić, Nori Pavičić, Ani Peris Jurinjak i Sonji Vidović Iviš na pomoći u laboratorijskom radu i podršci. Hvala dr. sc. Vidi Eraghi i dr. sc. Ivanu Iviću na pomoći u statističkoj obradi podataka, kao i kolegama Anji Ognjenović, Vuku Milutinoviću i dr. sc. Hrvoju Brzici na razumijevanju i podršci na poslu.

Zahvaljujem prijateljima na podršci i ohrabrenju, a posebno mom zaručniku Marku na neprekidnoj podršci, strpljenju i razumijevanju tijekom cijelog procesa pisanja ovog rada, kao i na tome što je bio uz mene u svakom trenutku kada je to bilo najpotrebnije.

Na kraju, iskreno i duboko zahvaljujem svojoj obitelji – majci Dragici, sestri Tei, nećakinji Tamari, nećaku Filipu i šogoru Viktoru – na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i razumijevanju tijekom cijelog mog studija, a posebno svom ocu Stjepanu, čija me uspomena i danas prati te mi daje snagu i potporu na svakom koraku.

SAŽETAK

Ulcerozni kolitis je kronična relapsirajuća bolest debelog crijeva obilježena kontinuiranom upalom i oštećenjem sluznice, a pokazuje izražene spolne razlike te regionalnu heterogenost. Eksperimentalni model kolitisa induciran natrij dekstran sulfatom (eng. *DSS*) u miševa široko se koristi za proučavanje mehanizama humane bolesti. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati spolno i regionalno ovisne razlike u upali i oštećenju epitela debelog crijeva, kao i u proliferaciji, regeneraciji i diferencijaciji epitelnih stanica tijekom akutnog DSS-induciranog kolitisa s fazom oporavka. Dodatno je analizirana ekspresija proteina uskih spojeva kladina-2 (CLDN2) u kontekstu epitelne regeneracije. Istraživanje je provedeno na ženkama i mužjacima miševa soja C57Bl/6, podijeljenima u kontrolne i eksperimentalne skupine, pri čemu je kolitis induciran primjenom 1,7 % DSS-a tijekom šest dana, a analize su provedene u više vremenskih točaka nakon prestanka tretmana. Tkivo debelog crijeva analizirano je histopatološkim ocjenjivanjem, digitalnom patologijom i morfometrijom. Analizirane su četiri histopatološke zone: erozija/ulceracija, displastična regeneracija, upaljena i vidljivo neoštećena sluznica. Statistička obrada provedena je odgovarajućim modelima uz razinu značajnosti $p < 0,05$. U fiziološkim uvjetima ženke pokazuju veću bazalnu proliferaciju te veći udio matičnih i sekretornih stanica, dok mušjaci imaju izraženiju apsorptivnu diferencijaciju. Proksimalni dio debelog crijeva karakterizira veća proliferacija i veća ekspresija CLDN2, dok distalni dio pokazuje viši stupanj diferencijacije epitela. Primjena DSS-a dovodi do akutne upale s ulceracijama, dok tijekom oporavka dolazi do epitelne displazije, reepitelizacije i obnove sluznice. Ženke pokazuju blažu upalu, manje oštećenje epitela i bržu regeneraciju uz raniju aktivaciju proliferacijskih i matičnih stanica u odnosu na mužjake. Distalno debelo crijevo razvija teža epitelna oštećenja i sporije se oporavlja u usporedbi s proksimalnim dijelom. Ekspresija CLDN2 značajno je povišena tijekom upalne faze u proksimalnom dijelu debelog crijeva i pozitivno korelira s proliferacijom epitela. Spol i anatomska lokalizacija promjena značajno utječu na tijek upale i regeneraciju u DSS-modelu kolitisa: ženke i proksimalni dio debelog crijeva pokazuju veću otpornost i regeneracijski kapacitet, dok su mušjaci i distalni dio osjetljiviji na oštećenja. CLDN2 se ističe kao potencijalni regulator epitelne regeneracije i moguća terapijska meta u upalnoj bolesti crijeva.

Ključne riječi: IBD, miševi, DSS-inducirani kolitis model s oporavkom, spolne i segmentalne razlike, proliferacija, regeneracija, diferencijacija, sekretorni epitel, apsorptivni epitel, CLDN2.

EXTENDED SUMMARY

Introduction

Inflammatory bowel disease is a chronic inflammatory disorder of the colon that affects millions of people worldwide, and its prevalence continues to rise, particularly in industrialized countries. In ulcerative colitis, inflammation typically begins in the rectum and extends proximally in a continuous pattern, with the distal colon generally exhibiting the most severe histological damage. Macroscopic and histological changes such as inflammation, edema, ulcerations, epithelial disruption, crypt abscesses, and goblet cell depletion are more pronounced in the distal than in the proximal colon, highlighting segment-specific pathology with important diagnostic and clinical implications. This disease affects both sexes, but evidence shows sex-related differences in epidemiology, disease phenotype, extent, treatment response, and outcomes, with men more often developing extensive disease and requiring colectomy, and women more frequently presenting with proctitis and needing repeated systemic corticosteroid therapy.

The mouse colon shares the fundamental structural organization of the human colon but displays even more pronounced proximal-to-distal heterogeneity, which is particularly evident in the differing crypt morphology, mucin composition, and regional immune regulation. In experimental research, dextran sulfate sodium (DSS) is widely used to induce colitis in mice, as it disrupts epithelial tight junctions, increases barrier permeability, and causes epithelial ulceration resembling the acute and regenerative phases of human disease. In DSS-induced colitis, epithelial damage disrupts the balance between proliferation, differentiation, and apoptosis, beginning with direct toxic injury to colonocytes, followed by immune activation, inflammatory mediator release, crypt destruction, and peak epithelial loss during the acute phase, after which regenerative signaling pathways such as Wnt/ β -catenin and Notch drive stem cell-mediated repair and partial restoration of mucosal architecture, although severe or repeated injury may lead to dysregulated regeneration and carcinogenesis. Epithelial restoration in ulcerative colitis involves coordinated processes of restitution, repair, re-epithelialization, and regeneration, in which initial rapid wound closure by cell migration is followed by proliferation and differentiation of stem and progenitor cells to re-establish crypt structure and mucosal function, with successful integration of these mechanisms being essential for remission and the maintenance of intestinal barrier integrity.

During the recovery phase following DSS exposure, activation of colon crypt base stem cells, epithelial proliferation, and re-establishment of mucosal architecture occur, offering an opportunity to study epithelial regeneration in a controlled and reproducible manner.

Sex- and colon region-specific differences in the differentiation of secretory and absorptive progenitor and mature epithelial cells following DSS-induced injury and during recovery remain insufficiently characterized. Sex significantly influences disease severity, inflammatory response, and epithelial regeneration in DSS-induced colitis, with female mice showing milder crypt damage, reduced inflammatory infiltration, preserved epithelial structure, and enhanced glucocorticoid receptor-mediated responses, whereas males exhibit more severe ulceration and increased activation of NF- κ B-related pathways. DSS-induced colon injury is most severe in the distal colon, where lesions, crypt destruction, loss of goblet cells, and intense inflammatory infiltration are consistently observed, whereas the proximal colon is relatively protected, highlighting segment-specific susceptibility and limiting direct translation to human disease.

Claudin-2 (CLDN2), a tight-junction protein involved in regulating paracellular permeability to ions and water, is markedly upregulated during inflammation in both humans and DSS-treated mice. This increase is associated not only with epithelial leakiness but also with enhanced epithelial proliferation, suggesting a potential role for CLDN2 in mucosal regeneration. Its elevated expression at the crypt base, where new epithelial cells originate, raises the question of whether CLDN2-positive cells may contribute directly to epithelial renewal following injury.

Aim of the study

The general aim of this study is to investigate inflammation, epithelial injury and regeneration, and the proliferation and differentiation of secretory and absorptive epithelial cells in a mouse model of DSS-induced acute colitis with recovery. The specific objectives are to compare histopathological and morphometric outcomes during two weeks of recovery between DSS-treated mice and negative controls, and between female and male C57Bl/6N mice in proximal and distal colon segments. Additional aims include examining sex- and region-dependent dynamics of proliferation and differentiation of secretory and absorptive epithelial cells, and assessing CLDN2 expression in relation to stem, secretory, and absorptive progenitor cell dynamics to clarify its role in epithelial regeneration after DSS-induced colitis.

Materials and methods

Experiments were conducted at Selvita d.o.o. in accordance with EU Directive 2010/63/EU and national legislation, under the oversight of the CARE-Zg institutional animal ethics committee, with all efforts made to minimize animal suffering. After one week of acclimatization, C57Bl/6 specific pathogen free (SPF) female and male mice were randomly assigned to ten groups, and colitis was induced using 1.7% DSS in drinking water for six days. Negative control groups received water only, and animals were sacrificed at predefined time points: D1, D6, D11 and D16 after the final DSS administration. Following anesthesia and euthanasia, colon tissues were collected, measured, weighed and processed for histopathological assessment. Tissues were formalin-fixed, embedded in paraffin, sectioned, and prepared for histological and immunohistochemical staining. H&E, PAS, and AB-PAS staining methods were used alongside immunohistochemistry for Ki67, LGR5, CLDN2, ATOH1, CHGA, DCLK1, HES1, CA2, and PAN-CK. Histopathological scoring of inflammation and epithelial damage was performed on H&E- and PAS-stained histology slides, while AB-PAS staining and immunohistochemical analyses of Ki67, LGR5, CLDN2, ATOH1, CHGA, DCLK1, HES1, and CA2 were conducted using Visiopharm software. Morphometric assessment of epithelial injury and re-epithelialization on PAN-CK-stained colon slides was carried out in Zen software. For analytical purposes, colon tissue was divided into four different histopathological entities: an erosion/ulcer zone with epithelial loss or early healing, a dysplastic regeneration zone with epithelial hyperplasia, dysplasia and distorted crypts, an inflamed mucosa zone showing inflammation without epithelial abnormalities and a visibly intact mucosa zone without inflammation or structural changes. Results were compared separately in the proximal and distal colon parts between females and males at the same time points, and across all four time points in comparison with the negative control group. Statistical analyses included mixed-effects models, two-way ANOVA tests, and Pearson's correlation, with significance set at $p < 0.05$.

Results

In the negative control group, female mice displayed higher baseline levels of proliferative cells, colonic crypt-base stem cells, secretory progenitors, and enteroendocrine cells, suggesting a tendency toward secretory differentiation in the colon, whereas the greater presence of HES1-positive cells in males supported a shift toward absorptive differentiation. In the negative

control group, the proximal colon segments showed increased proliferation, CLDN2 and DCLK1 expression, but secretory and absorptive epithelial cell differentiation was more pronounced in the distal colon.

After DSS administration, females regained their initial body weight and colon mass more rapidly than males. Day 1 after DSS withdrawal was characterized by basal lymphoplasmacytosis, diffuse lamina propria inflammation, erosions and ulcers, crypt loss, and epithelial hyperproliferation with low-grade dysplasia. By days 6 and 11, inflammation and ulceration expanded, with aberrant crypt regeneration, goblet cell loss, and re-epithelialization. In the final stage, inflammation extended into surrounding tissue, with lymphatic dilation, fibrosis, and high-grade dysplasia. The proportion of visibly intact mucosa was significantly higher in females in the proximal colon compared with D1 after the last DSS administration and overall showed a trend toward greater preservation in females in both segments, whereas males often lacked this zone entirely in the distal colon. The most pronounced histopathological alterations occurred within the dysplastic regeneration zone in both sexes and segments. Histological scoring demonstrated that females exhibited milder inflammation and less epithelial damage than males; ulcerations were smaller and re-epithelialization progressed more rapidly in females and in the proximal colon relative to males and the distal colon segment. Regeneration was also faster in females, marked by the earlier appearance of proliferating cells and basal crypt stem cells, whereas these processes were delayed in males. CLDN2 expression was consistently higher in the proximal than in the distal colon, both in the negative control group and following DSS exposure. At the end of the 16-day post-DSS period, males showed a greater number of secretory progenitors than females in both colon segments. Enteroendocrine cells increased only on D1 after DSS withdrawal, especially in the distal colon in both sexes, after which their area steadily declined. The number of tuft cells decreased in both sexes after DSS, but only in females did a gradual recovery occur in the proximal colon by D16. Goblet cell area decreased in both sexes and in both segments following DSS administration. The number of absorptive progenitor cells increased in both colon segments and both sexes, while the population of mature absorptive epithelial cells decreased after DSS treatment.

Discussion

This study demonstrates pronounced sex- and segment-specific differences in the organization, injury response, and regeneration of the colonic epithelium in healthy mice and in a DSS-induced colitis model.

In female mice, higher basal levels of Ki67-, LGR5-, and ATOH1- positive cells and a greater CHGA-positive area indicate a larger reservoir of stem and secretory cells and greater epithelial regeneration capacity. Males show a higher proportion of absorptive progenitors and mature colonocytes in the healthy colon, likely due to stronger Notch-Hes1 activity. The proximal colon exhibits higher proliferation and greater CLDN2 expression, while the distal colon contains more differentiated secretory and absorptive cells in negative control group colon samples. The number of tuft cells is negatively associated with the number of mature absorptive cells and positively associated with the number of goblet cells, reflecting their influence through the IL-25/ILC2/IL-13 axis.

DSS-induced colitis resulted in heterogeneous mucosal damage, with more severe injury and delayed regeneration in the distal colon and most severely affected the area adjacent to ulcerations. Females recovered more rapidly, with milder inflammation and faster re-epithelialization, whereas males developed more pronounced and long-lasting damage, particularly in the distal colon. Estrogens, acting through ER α , ER β and GPER1 receptors, likely contribute to the more effective modulation of the inflammatory response in females. The distal colon is more susceptible to DSS due to interactions between DSS and short-chain fatty acids that promote greater inflammatory activation. After induction of DSS-colitis, females showed a faster rise in Ki67- and LGR5-positive cells, indicating earlier activation of stem cells and a more efficient regenerative response, while males responded later and more slowly. In the late recovery phase, males displayed a higher number of ATOH1-positive cells, reflecting a stronger secretory response that could be driven by more intense inflammation. Enteroendocrine cells increased immediately after DSS exposure in the female colon, then declined; goblet cells were reduced in both sexes, consistent with the loss of the mucosal barrier typical of colitis, and tuft cells recovered only in females, whereas males showed no clear replenishment of this population, suggesting more effective epithelial regeneration in females.

CLDN2 increased as part of the epithelial inflammatory and regenerative adaptation; in the healthy colon, CLDN2 was present in the lower and middle thirds of the crypts with no sex differences, but after DSS exposure, its expression markedly increased and partially shifted to the cytoplasm, especially in areas of dysplastic regeneration. This increase appeared earlier and more strongly in healthy and DSS-treated proximal colon tissue and was well aligned with epithelial proliferation; CLDN2 expression correlated with Ki67-positive cells, supporting its role in epithelial regeneration via the EGFR/CLDN2 signaling pathway. CLDN2 expression increased during epithelial regeneration, especially within regenerating crypts, and correlated with chemosensory cell populations, suggesting a role in adaptive epithelial repair beyond barrier dysfunction.

Conclusions

Under physiological conditions, the colonic epithelium displays pronounced sex- and region-dependent differences. Females exhibit a more robust stem cell and proliferative as well as secretory profile, whereas males preferentially show absorptive epithelial differentiation. At the regional level, the proximal colon demonstrates higher basal proliferative activity and regenerative capacity compared with the distal segment.

Following DSS-induced injury, these intrinsic differences become more apparent; females recover more rapidly, as reflected in faster restoration of body weight and colon length, reduced inflammation and epithelial damage in the colon, smaller ulcerative lesions, and accelerated re-epithelialization. They also retain a larger proportion of intact mucosa, particularly in the proximal colon. In contrast to females, males, most notably in the distal region, exhibit more extensive epithelial damage and delayed regeneration. Correspondingly, females re-establish epithelial proliferation, the basal crypt stem cell reservoir, and tuft cell populations earlier, whereas males show a postponed regenerative response dominated by an expansion of secretory progenitors. Temporal shifts in enteroendocrine and goblet cell populations illustrate the complexity of the epithelial response to injury, which again supports a female-biased regenerative advantage. Region-specific patterns further underscore differential susceptibility: the proximal colon is consistently more resistant to DSS-induced injury and demonstrates superior regenerative potential. Sustained higher CLDN2 expression in this segment supports the existence of distinct

differentiation programs along the colon. Collectively, these findings indicate that both sex and anatomical location critically modulate epithelial homeostasis and repair under inflammatory conditions, with females and the proximal colon demonstrating greater resilience, while males and the distal colon are more vulnerable to severe damage and delayed recovery. These findings may also have translational implications for the treatment of ulcerative colitis in humans, particularly in optimizing therapy selection based on sex and the extent of colonic involvement.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA.....	3
2.1. ANATOMIJA I HISTOLOGIJA DEBELOG CRIJEVA	3
2.1.1. Anatomija i histologija debelog crijeva čovjeka.....	3
2.1.2. Anatomija i histologija debelog crijeva miša	6
2.2. DIFERENCIJACIJA EPITELNIH STANICA U ZDRAVOM DEBELOM CRIJEVU	9
2.2.1. IHC LGR5 obilježene matične stanice baze kripe debelog crijeva	9
2.2.2. Tranzitno-amplificirajuće epitelne stanice debelog crijeva	10
2.2.3. Diferencijacija sekretornih epitelni stanica debelog crijeva	10
2.2.4. Diferencijacija apsorptivnih epitelni stanica debelog crijeva.....	13
2.3. ULCEROZNI KOLITIS KOD LJUDI.....	16
2.3.1. Makroskopske i histopatološke promjene debelog crijeva u ulceroznom kolitisu	16
2.3.2. Spolne razlike u ulceroznom kolitisu	18
2.3.3. Regionalne razlike u ulceroznom kolitisu	19
2.4. DSS-INDUCIRANI MODEL KOLITISA KOD MIŠEVA.....	20
2.4.1. Makroskopske i histopatološke promjene debelog crijeva miševa nakon primjene DSS-a.....	21
2.4.2. Spolne razlike u DSS-induciranom kolitisu miševa	24
2.4.3. Regionalne razlike u DSS-induciranom kolitisu miševa	24
2.5. OBNOVA I DIFERENCIJACIJA EPITELA DEBELOG CRIJEVA NAKON OŠTEĆENJA	25
2.5.1. Mehanizmi oštećenja epitela debelog crijeva.....	25
2.5.2. Mehanizmi obnove epitela debelog crijeva.....	26
2.5.3. Diferencijacija epitelni stanica u ulceroznom kolitisu i DSS-induciranom kolitisu miševa.....	29
2.6. ULOGA CLDN2 U REGENERACIJI EPITELA DEBELOG CRIJEVA NAKON PRIMJENE DSS-A	31
3. OBRAZLOŽENJE TEME	32
3.1. HIPOTEZA	32
3.2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	32
4.. MATERIJALI I METODE.....	33
4.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE.....	33
4.2. EKSPERIMENTALNI DIZAJN	34
4.3. PRIPREMA HISTOLOŠKIH UZORAKA DEBELOG CRIJEVA	36
4.3.1. Popis uređaja i kemikalija	37
4.3.2. Fiksacija i uklapanje tkiva debelog crijeva	39
4.3.3. Metode histokemijskog bojenja.....	39
4.3.4. Metode imunohistokemijskog bojenja	40
4.4. ANALIZA HISTOLOŠKIH UZORAKA DEBELOG CRIJEVA.....	43

4.4.1. Metoda histopatološkog ocjenjivanja.....	43
4.4.2. Metoda digitalne patološke analize	49
4.4.3. Metoda morfometrijske analize oštećenja epitela i reepitelizacije	50
4.5. REPREZENTATIVNE HISTOLOŠKE SLIKE	52
4.6. STATISTIČKA ANALIZA	53
4.6.1. Statistička analiza <i>in vivo</i> rezultata.....	53
4.6.2. Statistička analiza rezultata histopatološkog ocjenjivanja.....	53
4.6.3. Statistička analiza rezultata dobivenih digitalnim patološkim softverom	53
4.6.4. Statistička analiza rezultata dobivenih morfometrijom	54
5. REZULTATI	55
5.1. <i>IN VIVO</i> REZULTATI.....	55
5.1.1. Uginuća životinja tijekom studije.....	55
5.1.2. Apsolutna i relativna tjelesna masa životinja	55
5.1.3. Duljina, masa, omjer mase i duljine debelog crijeva.....	57
5.2. HISTOPATOLOŠKE ZONE DEBELOG CRIJEVA NAKON PRIMJENE DSS-A	59
5.3. HISTOPATOLOŠKE PROMJENE U DEBELOM CRIJEVU NAKON PRIMJENE DSS-A	61
5.3.1. Histopatološke promjene na D1 nakon posljednje primjene DSS-a.....	61
5.3.2. Histopatološke promjene na D6 nakon posljednje primjene DSS-a.....	62
5.3.3. Histopatološke promjene na D11 nakon posljednje primjene DSS-a	63
5.3.4. Histopatološke promjene na D16 nakon posljednje primjene DSS-a.....	64
5.4. HISTOPATOLOŠKO OCJENJIVANJE PREPARATA DEBELOG CRIJEVA.....	67
5.4.1. Zona vidljivo neoštećene sluznice.....	67
5.4.2. Zona upaljene sluznice	68
5.4.3. Zona displastične regeneracije	69
5.4.4. Zona erozije/ulkusa	70
5.5. BAZALNE VRIJEDNOSTI EPITELNIH BILJEGA DEBELOG CRIJEVA	71
5.5.1. Epitelni biljezi baze kriptе debelog crijeva	71
5.5.2. Sekretorne epitelne stanice debelog crijeva.....	73
5.5.3. Apsorptivne epitelne stanice debelog crijeva	75
5.6. LOKALIZACIJA I INTENZITET EKSPRESIJE EPITELNIH BILJEGA DEBELOG CRIJEVA	77
5.6.1. Epitelni biljezi baze kriptе debelog crijeva	77
5.6.2. Sekretorne epitelne stanice debelog crijeva.....	79
5.6.3. Apsorptivne epitelne stanice debelog crijeva	81
5.6.4. IHC PAN-CK bojenje.....	82
5.7. DIGITALNA PATOLOŠKA ANALIZA EPITELNIH BILJEGA BAZE KRIPTЕ DEBELOG CRIJEVA ..	85
5.7.1. Zona vidljivo neoštećene sluznice.....	85
5.7.2. Zona upaljene sluznice	88

5.7.3. Zona displastične regeneracije	91
5.8. DIGITALNA ANALIZA SEKRETORNIH EPITELNIH STANICA DEBELOG CRIJEVA	94
5.8.1. Zona vidljivo neoštećene sluznice.....	94
5.8.2. Zona upaljene sluznice	98
5.8.3. Zona displastične regeneracije	102
5.9. DIGITALNA ANALIZA APSORPTIVNIH EPITELNIH STANICA DEBELOG CRIJEVA	106
5.9.1. Zona vidljivo neoštećene sluznice.....	106
5.9.2. Zona upaljene sluznice	108
5.9.3. Zona displastične regeneracije	110
5.10. ANALIZA POVEZANOSTI EPITELNIH BILJEGA DEBELOG CRIJEVA	120
5.10.1. Povezanost epitelnih biljega negativne kontrolne skupine	121
5.10.2. Povezanost epitelnih biljega zone vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva	125
5.10.3. Povezanost epitelnih biljega zone upaljene sluznice debelog crijeva.....	129
5.10.4. Povezanost epitelnih biljega zone displastične regeneracije debelog crijeva.....	133
5.11. MORFOMETRIJSKA ANALIZA OŠTEĆENJA EPITELA I REEPITELIZACIJE.....	137
5.11.1. Morfometrijska analiza oštećenja epitela	137
5.11.2. Morfometrijska analiza reepitelizacije	138
6. RASPRAVA.....	140
6.1. BAZALNE VRIJEDNOSTI EPITELNIH BILJEGA DEBELOG CRIJEVA	140
6.1.1. Razlike u zastupljenosti epitelnih stanica kripe debelog crijeva između mužjaka i ženki miševa . Error! Bookmark not defined.	
6.1.2. Razlike u zastupljenosti epitelnih stanica kripe debelog crijeva između proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva	141
6.2. DSS-INDUCIRANI MODEL KOLITISA KOD MIŠEVA.....	143
6.2.1. Upala, oštećenje i reepitelizacija debelog crijeva.....	143
6.2.2. Proliferacija i diferencijacija sekretornih i apsorptivnih epitelnih stanica debelog crijeva	145
6.2.3. Uloga CLDN2 u regeneraciji epitela debelog crijeva.....	149
7. ZAKLJUČCI	151
8. POPIS LITERATURE.....	153
9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNASTVENIH RADOVA ...	180
9.1. ŽIVOTOPIS	180
9.2. LISTA PUBLIKACIJA	181
9.2.1. Znanstveni radovi objavljeni u časopisima	181
9.2.2. Kongresni znanstveni radovi.....	182

SLIKE

Slika 1 Regionalne razlike u strukturi i funkciji debelog crijeva čovjeka	5
Slika 2 Razlike u histološkoj građi proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva miša, H&E.....	8
Slika 3 Ilustrativni prikaz populacije epitelnih stanica	15
Slika 4 Ilustrativni prikaz djelovanja DSS-a na sluznicu debelog crijeva miša.....	21
Slika 5 Ilustrativni prikaz imunoloških promjena u upalnoj bolesti crijeva	28
Slika 6 Metoda histopatološkog ocjenjivanja na uzorcima debelog crijeva miša, H&E	44
Slika 7 Metoda digitalne patološke analize uzoraka debelog crijeva miša, IHC Ki67	50
Slika 8 Metoda morfometrijske analize oštećenja epitela i reepitelizacije debelog crijeva, IHC PAN-CK	51
Slika 9 Apsolutna i relativna tjelesna masa miševa	56
Slika 10 Duljina, masa, omjer mase i duljine debelog crijeva miševa.....	58
Slika 11 Histopatološki udio pojedinih zona u proksimalnom i distalnom dijelu debelog crijeva ženki i mužjaka	60
Slika 12 Histopatološke promjene u debelom crijevu na D1 nakon posljednje primjene DSS-a	61
Slika 13 Histopatološke promjene u debelom crijevu na D6 nakon posljednje primjene DSS-a	62
Slika 14 Histopatološke promjene u debelom crijevu na D11 nakon posljednje primjene DSS-a	63
Slika 15 Histopatološke promjene u debelom crijevu na D16 nakon posljednje primjene DSS-a	64
Slika 16 Reprezentativne slike proksimalnog i distalnog debelog crijeva ženki, H&E.....	65
Slika 17 Reprezentativne slike proksimalnog i distalnog debelog crijeva mužjaka, H&E.....	66
Slika 18 Histopatološko ocjenjivanje zone vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva.....	67
Slika 19 Histopatološko ocjenjivanje zone upaljene sluznice debelog crijeva	68
Slika 20 Histopatološko ocjenjivanje zone displastične regeneracije debelog crijeva.....	69
Slika 21 Histopatološko ocjenjivanje zone erozije/ulkusa debelog crijeva	70
Slika 22 Reprezentativne slike debelog crijeva obojene IHC metodom na Ki67, LGR5 i CLDN2	72
Slika 23 Reprezentativne slike debelog crijeva obojene na IHC ATOH1, CHGA i DCLK1 i AB-PAS.....	74
Slika 24 Reprezentativne slike debelog crijeva obojene IHC metodom na HES1 i CA2	75
Slika 25 Kvantifikacija epitelnih biljega negativne kontrolne skupine u debelom crijevu.....	76
Slika 26 IHC bojenje na Ki67, LGR5 i CLDN2.....	78
Slika 27 IHC bojenje na ATOH1, CHGA, DCLK1 i histokemijsko bojenje na AB-PAS.....	80

Slika 28 IHC bojenje na HES1 i CA2.....	81
Slika 29 IHC bojenje na PAN-CK.....	82
Slika 30 Kvantifikacija Ki67-pozitivnih stanica u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva.....	85
Slika 31 Kvantifikacija LGR5-pozitivnih stanica u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva.....	86
Slika 32 Kvantifikacija CLDN2-pozitivne površine u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva.....	87
Slika 33 Kvantifikacija Ki67-pozitivnih stanica u zoni upaljene sluznice debelog crijeva	88
Slika 34 Kvantifikacija LGR5-pozitivnih stanica u zoni upaljene sluznice debelog crijeva	89
Slika 35 Kvantifikacija CLDN2-pozitivne površine u zoni upaljene sluznice debelog crijeva	90
Slika 36 Kvantifikacija Ki67-pozitivnih stanica u zoni displastične regeneracije debelog crijeva.....	91
Slika 37 Kvantifikacija LGR5-pozitivnih stanica u zoni displastične regeneracije debelog crijeva.....	92
Slika 38 Kvantifikacija CLDN2-pozitivne površine u zoni displastične regeneracije debelog crijeva	93
Slika 39 Kvantifikacija ATOH1-pozitivnih stanica u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva.....	94
Slika 40 Kvantifikacija CHGA-pozitivne površine u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva	95
Slika 41 Kvantifikacija DCLK1-pozitivnih stanica u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva.....	96
Slika 42 Kvantifikacija AB-PAS-pozitivne površine u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva	97
Slika 43 Kvantifikacija ATOH1-pozitivnih stanica u zoni upaljene sluznice debelog crijeva	98
Slika 44 Kvantifikacija CHGA-pozitivne površine u zoni upaljene sluznice debelog crijeva.....	99
Slika 45 Kvantifikacija DCLK1-pozitivnih stanica u zoni upaljene sluznice debelog crijeva	100
Slika 46 Kvantifikacija AB-PAS-pozitivne površine u zoni upaljene sluznice debelog crijeva.....	101
Slika 47 Kvantifikacija ATOH1-pozitivnih stanica u zoni displastične regeneracije debelog crijeva	102
Slika 48 Kvantifikacija CHGA-pozitivne površine u zoni displastične regeneracije debelog crijeva.....	103
Slika 49 Kvantifikacija DCLK1-pozitivnih stanica u zoni displastične regeneracije debelog crijeva.....	104
Slika 50 Kvantifikacija AB-PAS-pozitivne površine u zoni displastične regeneracije debelog crijeva	105
Slika 51 Kvantifikacija HES1-pozitivnih stanica u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva	106
Slika 52 Kvantifikacija CA2-pozitivne površine u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva.....	107
Slika 53 Kvantifikacija HES1-pozitivnih stanica u zoni upaljene sluznice debelog crijeva.....	108
Slika 54 Kvantifikacija CA2-pozitivne površine u zoni upaljene sluznice debelog crijeva	109
Slika 55 Kvantifikacija HES1-pozitivnih stanica u zoni displastične regeneracije debelog crijeva.....	110

Slika 56 Kvantifikacija CA2-pozitivne površine u zoni displastične regeneracije debelog crijeva.....	111
Slika 57 Reprezentativne histološke slike proksimalnog debelog crijeva ženki na D1 nakon posljednje primjene DSS-a	112
Slika 58 Reprezentativne histološke slike distalnog debelog crijeva mužjaka na D1 nakon posljednje primjene DSS-a	113
Slika 59 Reprezentativne histološke slike distalnog debelog crijeva ženki na D6 nakon posljednje primjene DSS-a	114
Slika 60 Reprezentativne histološke slike proksimalnog debelog crijeva mužjaka na D6 nakon posljednje primjene DSS-a.....	115
Slika 61 Reprezentativne histološke slike proksimalnog debelog crijeva ženki na D11 nakon posljednje primjene DSS-a	116
Slika 62 Reprezentativne histološke slike distalnog debelog crijeva mužjaka na D11 nakon posljednje primjene DSS-a	117
Slika 63 Reprezentativne histološke slike distalnog debelog crijeva ženki na D16 nakon posljednje primjene DSS-a	118
Slika 64 Reprezentativne histološke slike proksimalnog debelog crijeva mužjaka na D16 nakon posljednje primjene DSS-a.....	119
Slika 65 Udio duljine epitela debelog crijeva zahvaćenog ulceracijom.....	137
Slika 66 Udio novoformiranog epitela iznad ulceriranih područja.....	138
Slika 67 Prikaz ulceracija i reepitelizacije u debelom crijevu miševa, IHC PAN-CK.....	139

TABLICE

Tablica 1 Histološke razlike između regeneracije, displazije niskog i visokog stupnja u ulceroznom kolitisu ljudi...	18
Tablica 2 Histopatološke razlike između akutnog, faze oporavka i kroničnog DSS-induciranog kolitisa kod miša...	23
Tablica 3 Eksperimentalni dizajn	35
Tablica 4 Popis uređaja.....	37
Tablica 5 Popis kemikalija.....	38
Tablica 6 Popis antitijela za imunohistokemijsko bojenje.....	42
Tablica 7 Histopatološko ocjenjivanje zone erozije/ulkusa debelog crijeva miševa nakon primjene DSS-a	45
Tablica 8 Histopatološko ocjenjivanje zone displastične regeneracije debelog crijeva miševa nakon primjene DSS-a	46
Tablica 9 Histopatološko ocjenjivanje zone upaljene sluznice debelog crijeva miševa nakon primjene DSS-a	47
Tablica 10 Histopatološko ocjenjivanje zone vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva miševa nakon primjene DSS-a.....	48
Tablica 11 Prikaz povećanja u Zen softveru s mjernom skalom (μm)	52
Tablica 12 Lokalizacija i intenzitet ekspresije epitelnih biljega	83
Tablica 13 Raspon i jakost korelacije (r).....	120
Tablica 14 Povezanost epitelnih biljega u negativnoj kontroli proksimalnog dijela debelog crijeva ženki.....	121
Tablica 15 Povezanost epitelnih biljega u negativnoj kontroli distalnog dijela debelog crijeva ženki.....	122
Tablica 16 Povezanost epitelnih biljega u negativnoj kontroli proksimalnog dijela debelog crijeva mužjaka.....	123
Tablica 17 Povezanost epitelnih biljega u negativnoj kontroli distalnog dijela debelog crijeva mužjaka.....	124
Tablica 18 Povezanost epitelnih biljega u zoni vidljivo neoštećene sluznice proksimalnog dijela debelog crijeva ženki	125
Tablica 19 Povezanost epitelnih biljega u zoni vidljivo neoštećene sluznice distalnog dijela debelog crijeva ženki	126
Tablica 20 Povezanost epitelnih biljega u zoni vidljivo neoštećene sluznice proksimalnog dijela debelog crijeva mužjaka.....	127
Tablica 21 Povezanost epitelnih biljega u zoni vidljivo neoštećene sluznice distalnog dijela debelog crijeva mužjaka	128
Tablica 22 Povezanost epitelnih biljega u zoni upaljene sluznice proksimalnog dijela debelog crijeva ženki.....	129
Tablica 23 Povezanost epitelnih biljega u zoni upaljene sluznice distalnog dijela debelog crijeva ženki.....	130

Tablica 24 Povezanost epitelnih biljega u zoni upaljene sluznice proksimalnog dijela debelog crijeva mužjaka.....	131
Tablica 25 Povezanost epitelnih biljega u zoni upaljene sluznice distalnog dijela debelog crijeva mužjaka.....	132
Tablica 26 Povezanost epitelnih biljega u zoni displastične regeneracije proksimalnog dijela debelog crijeva ženki	133
Tablica 27 Povezanost epitelnih biljega u zoni displastične regeneracije distalnog dijela debelog crijeva mužjaka	134
Tablica 28 Povezanost epitelnih biljega u zoni displastične regeneracije proksimalnog dijela debelog crijeva mužjaka	135
Tablica 29 Povezanost epitelnih biljega u zoni displastične regeneracije distalnog dijela debelog crijeva mužjaka	136

POPIS KRATICA

AB-PAS	Alcian blue-periodic acid-Schiff
ATOH1	Atonal homolog 1
CA2	Carbonic anhydrase 2
CBC	Crypt basal cells
CD	Crohnova bolest
CHGA	kromogranin A
CLDN2	klaudin-2
CXCL1	kemokinski ligand 1 s C-X-C motivom
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DCLK1	Doublecortin like kinase 1
DSS	natrij dekstran sulfat
Fcγbp	Fcγ-binding protein
FITC-dekstran	fluorescein-izotiocijanat-dekstran
GPCR	receptori vezani s G-proteinima
H&E	hematoksilin i eozin
HES1	Hairy and enhancer of split 1
HRP	peroksidaza hrena
IFN-γ	interferon gamma
IgG	imunoglobulin G
IHC	imunohistokemija
IL-1β	interleukin-1β
IL-6	interleukin-6

IL-10	interleukin-10
IL-13	interleukin-13
IL-17A	interleukin-17A
IL-22	interleukin-22
IL-23	interleukin-23
kDa	kilodaltoni
LGR5	receptor povezan s G proteinom koji sadrži ponavljanje bogato leucinom 5
MALT	limfno tkivo pridruženo sluznici
MLCK	kinaza lakog lanca miozina
MUC2	mucin 2
PAN-CK	pancitokeratin
PAS	periodična kiselina–Schiff
PBS	fosfatni pufer
RELM β	molekula slična rezistinu β
REML	ograničena procjena maksimalne vjerodostojnosti
Rspo	R-spondin
TFF	obitelj trefoil faktora
Th1	pomoćničke T stanice tip 1
Th17	pomoćničke T stanice tip 17
TNF- α	faktor nekroze tumora-alfa
UC	ulcerozni kolitis
WAE cells	epitelne stanice povezane s cijeljenjem rane
Wnt	Wingless (Wg) + Int-1

1. UVOD

Upalna bolest crijeva trenutačno pogađa oko pet milijuna ljudi u zapadnom svijetu, a njezina incidencija nastavlja rasti u industrijaliziranim zemljama (ANANTHAKRISHNAN i sur., 2020.). Tijekom posljednjih desetljeća epidemiološki obrazac bolesti znatno se promijenio; najviša incidencija i prevalencija, koje su tradicionalno bilježene u Sjevernoj Americi te sjevernoj i zapadnoj Europi, sada su se stabilizirale ili dosegnule plato, zahvaljujući boljem liječenju i posljedičnom duljem preživljenju oboljelih. Suprotno tome, tranzicijske zemlje Azije, Južne Amerike i Afrike bilježe nagli porast incidencije, što snažno upućuje na ulogu okolišnih čimbenika, urbanizacije i zapadnjačkog načina života u razvoju bolesti (NG i sur., 2017.). Ovi dinamični epidemiološki trendovi predstavljaju javnozdravstveni izazov i dodatno naglašavaju potrebu za razvojem preventivnih strategija, unapređenjem zdravstvenog planiranja te razvojem ciljanih terapijskih pristupa prilagođenih različitim populacijama ljudi (LE BERRE i sur., 2023.).

U istraživanju ulceroznog kolitisa, kao dijela upalne bolesti crijeva, razvijeni su različiti eksperimentalni animalni modeli koji omogućuju proučavanje patogeneze bolesti i mehanizama oštećenja crijevnog epitela, među kojima se najčešće koristi model induciran natrij dekstran sulfatom (eng. dextran sulfate sodium, DSS) (OKAYASU i sur., 1990.). Ovaj model pouzdano oponaša ključne značajke upale i oštećenja sluznice debelog crijeva (WIRTZ i sur., 2017.), međutim, unatoč njenoj širokoj primjeni u istraživanjima, mehanizmi koji reguliraju diferencijaciju epitelnih stanica tijekom akutne faze upale i oporavka još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, osobito u kontekstu spolnih razlika u debelom crijevu. Također, nedovoljno su istražene razlike između proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva u odgovoru epitela na oštećenje, kako u eksperimentalnim DSS-modelima na miševima, tako i kod ljudi s ulceroznim kolitisom.

Protein kladin-2 (CLDN2) regulira paracelularnu propusnost epitela za vodu i male katione te je slabo izražen u zdravom debelom crijevu (ROSENTHAL i sur., 2010.), dok je njegova ekspresija značajno povećana u upalnim stanjima poput ulceroznog kolitisa i modela kolitisa na miševima induciranog DSS-om, što se povezuje s povećanom permeabilnošću i proliferacijom epitelnih stanica (PRASAD i sur., 2005.; AHMAD i sur., 2014.). Budući da je CLDN2 posebno

izražen u bazi kripti gdje se nalaze i matične epitelne stanice, ovaj protein bi mogao imati ulogu u proliferaciji i diferencijaciji epitela nakon upalnog oštećenja.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. ANATOMIJA I HISTOLOGIJA DEBELOG CRIJEVA

2.1.1. Anatomija i histologija debelog crijeva čovjeka

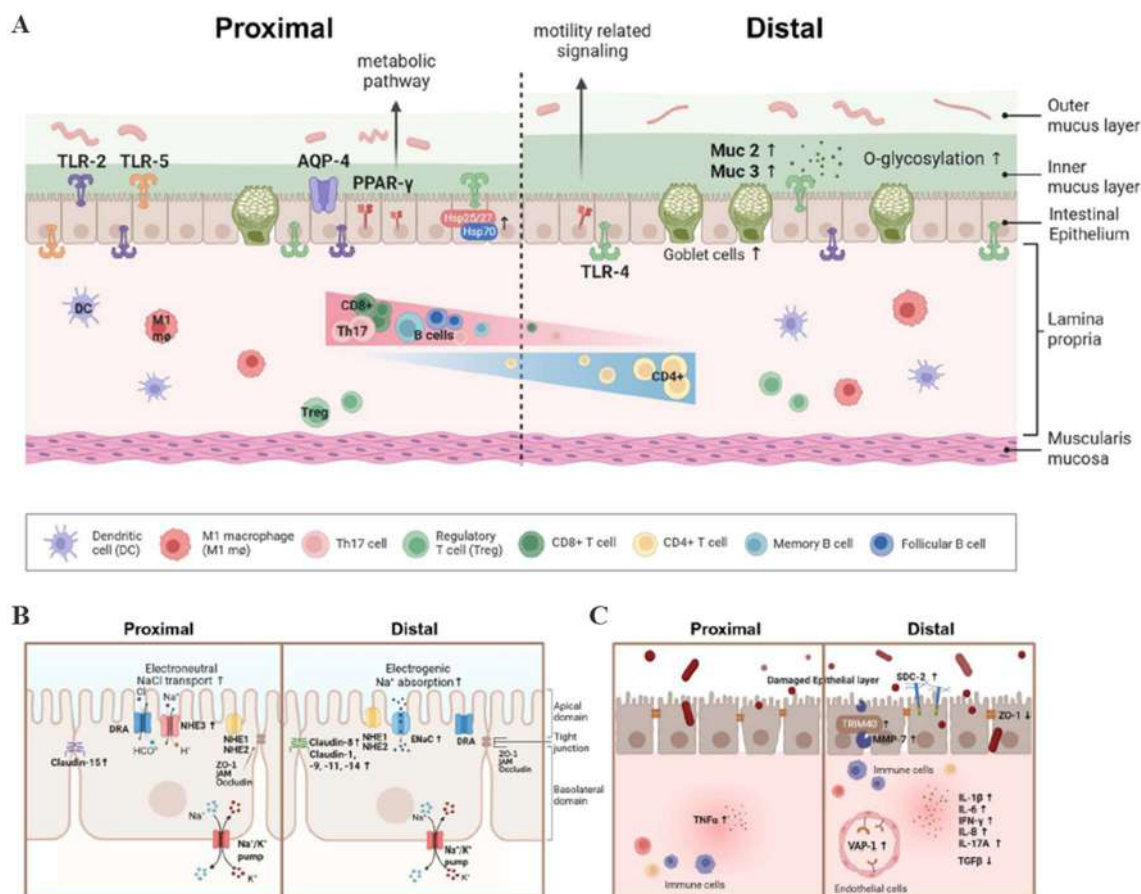
Debelo crijevo kod ljudi (lat. *colon*) anatomski se dijeli na šest glavnih segmenata: cekum (lat. *caecum*), uzlazno (lat. *colon ascendens*), poprečno (lat. *colon transversum*), silazno (lat. *colon descendens*), zavijeno (lat. *colon sigmoideum*) i ravno debelo crijevo (lat. *rectum*) (STANDRING, 2021.). Glavna funkcija debelog crijeva je apsorpcija vode i elektrolita te formiranje i transport fekalnog sadržaja. Zid debelog crijeva sastoji se od četiri osnovna sloja: sluznice (lat. *tunica mucosa*), submukoze (lat. *tunica submucosa*), mišićnog sloja (lat. *tunica muscularis*) i seroze (lat. *tunica serosa*). Sluznicu čini jednoslojni cilindrični epitel s brojnim kriptama Lieberkühnovog tipa koje se protežu od luminalne površine kroz sloj lamine proprije (TREUTING i sur., 2018.). Epitelne stanice obuhvaćaju nekoliko glavnih tipova: apsorptivne stanice te nekoliko vrsta sekretornih stanica: vrčaste, enteroendokrine, crijevne kemosenzorne (eng. *tuft cells*) te rijetke Panethove stanice koje se povremeno pojavljuju u bazi kripti debelog crijeva (CLEVERS i sur., 2013.; BARKER i sur., 2014.). U bazi svake kripe nalazi se proliferativna zona s matičnim i progenitorskim stanicama odgovornima za stalnu obnovu epitela (BARKER i sur., 2008.). Sloj lamine proprije sluznice sadrži rahlo vezivno tkivo kao i bogatu mrežu fibroblasta, imunoloških stanica i krvnih žila, koje zajedno održavaju homeostazu epitela. U ovom sloju sluznice česta je fiziološka pojava organiziranog limfnog tkiva, tzv. limfno tkivo vezano uz sluznicu (eng. *mucosa-associated lymphoid tissue*, MALT). Submukoza se također sastoji od Meissnerovog plexusa živaca te vezivnog tkiva unutar kojeg su krvne i limfne žile. Mišićni sloj sastoji se od unutarnjeg kružnog sloja te vanjskog uzdužnog, koji je organiziran u tri mišićne vrpce (lat. *taeniae coli*), karakteristične za humano debelo crijevo. Između ova dva mišićna sloja nalazi se još i Auerbachov živčani splet. Vanjski sloj debelog crijeva unutar trbušne šupljine čini seroza, dok su dijelovi crijeva izvan peritoneuma prekriveni adventicijom (PAWLINA i ROSS, 2018.).

U fiziološkom stanju ne postoje makroskopske i histološke razlike između spolova, dok su razlike prisutne između segmenata debelog crijeva. Embriološki, proksimalni dio debelog crijeva, koji obuhvaća cekum, uzlazni i desni kolon, razvija se iz srednjeg crijeva, dok se distalni dio razvija iz zadnjeg crijeva, a uključuje lijevi, silazni i zavijeni kolon te rektum. Srednje i zadnje

crijevo potječu iz istih embrionalnih listića, endoderma koji formira sluznicu i žlijezde unutarnjeg sloja probavnog trakta te mezoderma iz kojeg nastaju mišićno, vezivno i živčano tkivo (SADLER, 2024.). Unatoč sličnoj embrionalnoj građi, vaskularizacija, inervacija i imunološka organizacija razlikuju se između proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva kod čovjeka. Naime, proksimalni dio debelog crijeva krvlju opskrbljuju grane *arteriae mesentericae superioris*, dok distalni dio opskrbljuje *arteria mesenterica inferior*, što utječe na regionalnu osjetljivost na upalne i ishemične procese (SKINNER i sur., 2023.). Fiziološki, proksimalni dio debelog crijeva prvenstveno sudjeluje u apsorpciji vode, elektrolita i kratkolančanih masnih kiselina nastalih fermentacijom, dok distalni dio ima ključnu ulogu u skladištenju i izlučivanju fecesa (TREUTING i sur., 2018.). Između proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva postoji razlika u limfnoj drenaži; limfa iz uzlaznog debelog crijeva i većeg dijela poprečnog debelog crijeva teče prema superiornim mezenteričnim limfnim čvorovima (ileokolični, desni količni, srednji količni i mezenterični lanci), dok limfa iz silaznog, sigmoidnog debelog crijeva i gornjeg dijela rektuma drenažom ide prema inferiornim mezenteričnim i pararektalnim limfnim čvorovima. Donji dio rektuma i analni kanal imaju dodatne lateralne spojeve prema unutarnjim ilijačnim i mezenteričnim limfnim čvorovima (MIKHAEEL i KHAN, 2023.). Nadalje, sloj lamine proprije distalnog debelog crijeva pokazuje sklonost intenzivnijem imunološkom odgovoru u odnosu na proksimalni dio zbog veće gustoće limfocita i makrofaga, što odražava regionalne razlike u mikrobioti i antigenskoj stimulaciji (MOWAT i AGACE, 2014.).

Histološki, mukozu svih segmenata oblaže jednoslojni cilindrični epitel s kriptama Lieberkühnova tipa, no gustoća kripti i broj vrčastih stanica varira; proksimalni dio ima širi lumen i dublje kripte s manjim udjelom vrčastih stanica, dok distalni karakterizira veći broj vrčastih stanica s kraćim kriptama (BIRCHENOUGH i sur., 2015.). Udio zrelih epitelnih stanica ili kolonocita veći je u proksimalnom dijelu debelog crijeva nego u distalnom dijelu, što doprinosi izraženijoj apsorpcijskoj ulozi (HICKEY i sur., 2023.). Distalni dio debelog crijeva ima deblji sloj unutarnjeg dijela sluznice, gušći sloj glikoproteina i proteoglikana između epitela i mukoznog sloja te veću ekspresiju MUC2 i MUC3 proteina u usporedbi s proksimalnim dijelom, što mu pruža snažniju zaštitu epitelne barijere i manju osjetljivost na upalu (SUNG i sur., 2025.). Također, više je enzima uključenih u O-glikozilaciju mucina prema distalnom dijelu debelog crijeva, što znači veću izmjenu mucina ako za to dođe do potrebe (VAN DER POST i HANSSON, 2014.). Raspodjela imunoloških stanica razlikuje se duž debelog crijeva. Proksimalno debelo crijevo

sadrži više Th17 stanica, memorijskih T- i folikularnih B-limfocita te CD8⁺ T-limfocita, dok su CD4⁺ T-limfociti izraženiji u distalnom dijelu (SUNG i sur., 2025.). Ove segmentalne razlike upućuju na funkcionalno različite imunološke odgovore i mogu utjecati na regionalnu osjetljivost debelog crijeva na upalne procese (Slika 1).



Slika 1 Regionalne razlike u strukturi i funkciji debelog crijeva čovjeka

A) Gušći unutarnji sloj sluzi i izraženija barijerna funkcija u distalnom u usporedbi s proksimalnim debelim crijevom. B) Razlike u ekspresiji funkcionalnih proteina. C) Razlike u distribuciji imunoloških stanica.

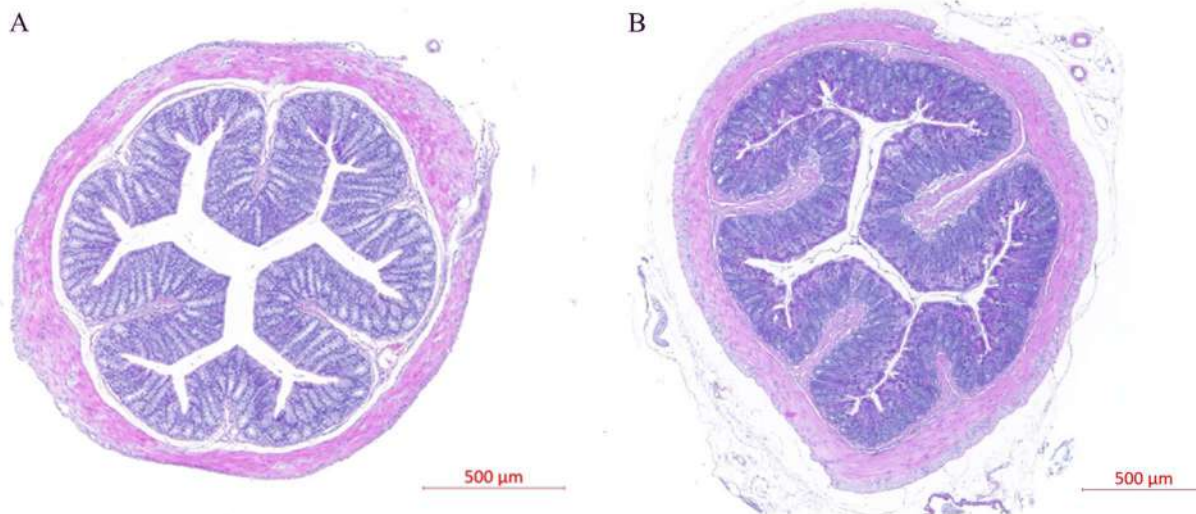
Preuzeto iz: SUNG i sur., 2025.

2.1.2. Anatomija i histologija debelog crijeva miša

Crijevna epitelna barijera sastoji se od tri glavna **elementa**: epitelnih stanica, uskih spojeva (eng. *tight junctions*) između epitelnih stanica te sloja sluzi (RIOS-ARCE i sur., 2017.). Lamina proprija sadrži fibroblaste, imunološke stanice kao što su limfociti, makrofazi i dendritične stanice te bogatu mikrovaskulaturu koja sudjeluje u imunološkom nadzoru i homeostazi crijevne barijere. Mikrobiota debelog crijeva miša ima važnu ulogu u održavanju fiziološke funkcije epitela, osobito u proksimalnom dijelu gdje fermentacija neprobavljenih ugljikohidrata dovodi do stvaranja kratkolančanih masnih kiselina, koje služe kao energetski supstrat epitelnim stanicama i modulaciji upalnog odgovora (SMITH i sur., 2013.). Histološka građa debelog crijeva čovjeka i miša u velikoj je mjeri slična, budući da obje vrste pokazuju istu osnovnu organizaciju crijevne stijenke: mukozu s jednoslojnim cilindričnim epitelom i brojnim kriptama, submukozu, dvoslojni sloj *tunice muscularis* te serozu ili adventiciju. Međutim, bez obzira na to što obje vrste u crijevu imaju očuvanu funkcionalnu podjelu stanica te organizaciju mukozne barijere, postoje i neke važne razlike. Prvo su vidljive razlike u sluznici, gdje su kripe debelog crijeva miša relativno dulje, užeg lumena i paralelno organizirane, a relativni udio vrčastih stanica veći je nego kod ljudi. Što se tiče organizacije vanjskog uzdužnog mišićnog sloja, kod miša je raspoređen ravnomjernije s nerazvijenim haustrama, za razliku od ljudi gdje tri mišićne trake formiraju haustre. Također, limfno tkivo povezano uz sluznicu je izraženije u debelom crijevu miša nego u čovjeka (TREUTING i sur., 2018.).

Debelo crijevo miša pokazuje izraženu regionalnu heterogenost duž proksimalno-distalne osi, koja odražava funkcionalnu specijalizaciju pojedinih segmenata i njihovu različitu osjetljivost na patološke procese. Morfološka i fiziološka heterogenost između proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva miša ogleda se u razlikama u embrionalnom podrijetlu, funkciji, anatomskoj i histološkoj građi. Proksimalni i distalni dio debelog crijeva miša imaju različito embrionalno podrijetlo; prvo potječe od srednjeg crijeva, dok potonji potječe iz stražnjeg crijeva (MISSIAGLIA i sur., 2014.), a debelo crijevo odraslog miša dugo je u prosjeku osam centimetara (YAN i sur., 2009.). Sluznica proksimalnog debelog crijeva miša ima poprečne nabore, u sredini debelog crijeva nalaze se poprečni i uzdužni nabori, dok su u distalnom debelom crijevu nabori uzdužni (HUGENHOLTZ i VOS, 2018.). Kao i kod ljudi, proksimalni dio debelog crijeva kod glodavaca služi ponajprije za apsorpciju vode, natrija i kratkolančanih masnih kiselina, dok distalni dio ima

ulogu u pohrani i izlučivanju fecesa (FLEMING i sur., 1991.). No za razliku od ljudi, mišje debelo crijevo nema haustre (lat. *haustra coli*) te jasno izražene anatomske segmente poput uzlaznog, poprečnog ili silaznog, već se funkcionalno i morfološki dijeli na proksimalni i distalni dio (TREUTING i sur., 2018.). Proliferativna aktivnost u proksimalnom dijelu umjerenija je i prostorno manje strogo ograničena u usporedbi s distalnim debelim crijevom, koje obilježavaju duže, uže i gušće raspoređene kripte s jasno definiranim proliferacijskim zonama te s terminalno diferenciranim stanicama bliže luminalnoj površini kripe (**Slika 2**) (TREUTING i sur., 2018.). Distalni segment debelog crijeva osjetljiviji je te su u eksperimentalnim modelima kolitisa u pravilu upalne i neoplastične promjene izraženije u distalnom nego u proksimalnom dijelu debelog crijeva (TREUTING i sur., 2018.). Udio vrčastih stanica manji je u proksimalnom dijelu nego u distalnom debelom crijevu miša i prevladavaju neutralni ili miješani mucini, što se očituje blijedom reakcijom tkiva obojenog Alcian blue–Periodic acid-Schiff (AB-PAS) metodom. Suprotno tome, u distalnom debelom crijevu nalazi se značajno veći broj vrčastih stanica i prevladavaju kiseli mucini, uključujući sialo- i sulfomucine, koji se prikazuju primjenom AB-PAS metode bojenja tkiva (JOHANSSON i sur., 2010.). Morfološka građa vaskularnog sustava razlikuje se između proksimalnog i distalnog dijela crijeva miša; kapilarna mreža formira anastomozirane prstenove na otvorima kripti sluznice tako da oni okružuju pojedinačne kripte u proksimalnom debelom crijevu, a više od dvije kriptе u distalnom debelom crijevu (WANG i sur., 2023.). Ove anatomske i histološke razlike važne su pri translaciji rezultata dobivenih s mišjih modela na humane bolesti, osobito u istraživanjima mehanizama oštećenja i regeneracije epitelne barijere u upalnoj bolesti crijeva ljudi.



Slika 2 Razlike u histološkoj građi proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva miša, H&E

A) Proksimalni dio debelog crijeva karakteriziraju kraće i šire kripte te manja gustoća kripti po jedinici površine. B) Distalni dio debelog crijeva obilježavaju duže, uže i gušće raspoređene kripte.

Slika prikazana pri digitalnom povećanju 1x, Zen softver, Zeiss. Skala: 500 µm.

2.2. DIFERENCIJACIJA EPITELNIH STANICA U ZDRAVOM DEBELOM CRIJEVU

2.2.1. IHC LGR5 obilježene matične stanice baze kripe debelog crijeva

Matične epitelne stanice crijeva multipotentne su stanice s mogućnošću samoobnavljanja, što osigurava normalnu obnovu sluznice i regeneraciju tkiva kao odgovor na ozljedu. Epitel kripe debelog crijeva sastoji se od dvije vrste matičnih stanica: dugoživućih nediferenciranih LGR5-pozitivnih matičnih stanica i rezervnih matičnih stanica u mirovanju (eng. *quiescent cells*) (SMITH i sur., 2016.). Epitelne stanice nastaju iz LGR5-pozitivnih pluripotentnih matičnih stanica smještenih u bazi kripe, a njihova moć samoobnavljanja ovisi o transkripcijskim faktorima Wnt i Rspo, koje luči heterogena populacija subepitelnih mezenhimalnih stanica uz nišu kripe crijeva (BARKER i sur., 2008.). LGR5 (eng. *leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*) receptor je sa sedam transmembranskih domena iz obitelji rodopsina, spada u skupinu GPCR (eng. *G-protein-coupled receptors*) staničnih receptora, ciljani je gen Wnt signalnog puta, a koristi se kao biomarker za odrasle matične stanice u tkivima poput crijevnog epitela i folikula dlake (CARMON i sur., 2012.). LGR5-pozitivne aktivne matične stanice u bazi kripe kod ljudi su regulirane Wnt/ β -katenin i Notch signalnim putovima, koji su ključni za njihovo samoodržanje i regeneraciju. Lgr5 je najvažniji ciljni gen Wnt/ β -katenin signalnog puta, veže se na R-spondin-1 te je povezan s formiranjem Wnt-Fz-LRP5/6 kompleksa, koji kolektivno inicira ovaj signalni put potičući proliferaciju matičnih stanica u bazi kripti crijeva (OU i sur., 2024.). U tankom crijevu LGR5-pozitivne epitelne stanice baze kripe imaju široku bazalnu površinu s vrlo malo citoplazme i organela, a nalaze se između sekretornih Panethovih stanica (BARKER i CLEVERS, 2010.). Rezervne matične epitelne stanice, često opisivane kao +4 stanice u odnosu na dno kripe, karakterizira spor stanični ciklus, otpornost na stres i sposobnost dugotrajnog preživljavanja (BAUMANN, 2013.). Između rezervnih stanica u mirovanju i LGR5-pozitivnih stanica postoji dinamična plastičnost, jer nakon gubitka LGR5-pozitivnih stanica rezervne matične stanice mogu reaktivirati proliferaciju te pokazati LGR5-pozitivnu ekspresiju. S druge strane, dio LGR5-pozitivnih stanica može u određenim uvjetima prijeći u stanje mirovanja, čime stječu karakteristike rezervnih stanica i povećanu otpornost na štetne podražaje (BUCZACKI i sur., 2013.; TETTEH i sur., 2016.). Unatoč intenzivnom istraživanju, do danas ne postoji jedinstven i pouzdan biljeg koji bi jednoznačno definirao rezervne matične stanice tankog i debelog crijeva. Biljezi poput BMI1, HOPX, TERT i LRIG1 inicijalno su opisani kao obilježja sporodijelećih ili +4 stanica baze kripe

(LIU i CHEN, 2020.), no naknadna istraživanja pokazala su da se njihova ekspresija preklapa s aktivnim LGR5-pozitivnim stanicama i različitim progenitorskim populacijama. Stoga ovi biljezi ne definiraju stabilne stanične linije, već odražavaju dinamična funkcionalna stanja ovisna o mikrokolišu i stupnju oštećenja epitela (CLEVERS i WATT, 2018.). U tom kontekstu rezervne matične stanice sve se češće opisuju funkcionalno, kroz njihovu regenerativnu sposobnost, što dodatno podupire koncept plastičnosti crijevnog epitela, prema kojem aktivne matične stanice i matične stanice u mirovanju predstavljaju međusobno zamjenjiva stanja.

2.2.2. Tranzitno-amplificirajuće epitelne stanice debelog crijeva

Između matičnih i zrelih diferenciranih epitelnih stanica nalazi se zona tranzitno-amplificirajućih stanica (eng. *transit-amplifying cells*) koje su nediferencirane kao i matične stanice, ali imaju veću mogućnost proliferacije kako bi nastao veći broj zrelih diferenciranih epitelnih stanica (MEI i sur., 2020.). Apsorptivne i sekretorne progenitorske stanice u debelom crijevu diferenciraju se iz matičnih stanica; dok apsorptivne daju samo zrele kolonocite, iz sekretornih progenitorskih stanica razvijaju se tri glavne linije: enteroendokrine, kemosenzorne i vrčaste stanice. Apsorptivne stanice zadužene su za apsorpciju vode i hranjivih tvari, vrčaste stanice štite epitelnu barijeru proizvodnjom zaštitne sluzi iz mucina (BIRCHENOUGH i sur., 2015.), enteroendokrine stanice luče hormone koji reguliraju probavu i motilitet crijeva (GUNAWARDENE i sur., 2011.), dok kemosenzorne stanice imaju ulogu kemoreceptora te sudjeluju u zaštiti crijeva od parazita (HENDEL i sur., 2022.). Daljnja diferencijacija epitelnih stanica temelji se na ekspresiji Notch-ovisnih transkripcijskih faktora HES1 ili ATOH1. Ako dođe do ekspresije transkripcijskog faktora HES1, stanice se dalje diferenciraju u zrele apsorptivne stanice ili enterocite, dok ekspresijom transkripcijskog faktora ATOH1 dolazi do daljnje diferencijacije u razne vrste sekretornih epitelnih stanica: enteroendokrine, vrčaste ili kemosenzorne stanice (VANDUSSEN i sur., 2010.). Tijekom upale i regeneracije epitela ravnoteža između HES1 i ATOH1 signalizacije dinamički se mijenja, što izravno utječe na obnovu sekretornog i apsorptivnog epitela.

2.2.3. Diferencijacija sekretornih epitelnih stanica debelog crijeva

Promjenu dinamike unutar epitela crijeva moguće je pratiti s pomoću biljega za detekciju epitelnih stanica debelog crijeva: ATOH1 (drugi nazivi: MATH1 i HATH1) za sekretorne

progenitorske stanice, CHGA za enteroendokrine stanice i DCLK1 za crijevne kemosenzorne stanice (NOAH i sur., 2011.). Alcian blue–Periodic acid–Schiff (AB-PAS) metoda je histokemijskog bojenja koja se standardno koristi za vizualizaciju vrčastih stanica (SPECIAN i NEUTRA, 1980.).

Ključni regulator sekretorne linije stanica crijevne sluznice je transkripcijski faktor ATOH1, čija je ekspresija nužna za aktivaciju signalnog puta diferencijacije sekretornih epitelnih stanica. ATOH1 (eng. *atonal homolog 1*) ključni je transkripcijski faktor koji ima ulogu usmjeravanja diferencijacije epitelnih stanica crijeva prema sekretornim epitelnim stanicama: vrčastim, enteroendokrinim, kemosenzornim i Panethovim stanicama tankog crijeva. Pripada obitelji bHLH (eng. *basic helix-loop-helix*) transkripcijskih faktora i dio je Notch signalnog puta (MULVANEY i DABDOUB, 2012.). ATOH1-pozitivni progenitori diferenciraju se unutar jednog do četiri dana u zrele sekretorne stanice kod čovjeka i miša, a pokazano je da gubitkom ovog transkripcijskog faktora dolazi do potpunog gubitka razvoja sekretornih stanica, dok apsorptivna loza ostaje očuvana (YANG i sur., 2001.). U uvjetima smanjene HES1 signalizacije dolazi do povećane ekspresije ATOH1, koja omogućuje daljnju aktivaciju transkripcijskih faktora poput SPDEF, KLF4, NEUROG3 i GFI1, usmjeravajući diferencijaciju prema pojedinim subpopulacijama sekretornih stanica. U debelom crijevu miša ovaj signalni put ključan je za formiranje i održavanje populacije vrčastih stanica te očuvanje mukozne barijere, dok poremećaji u ATOH1-ovisnoj diferencijaciji, uz smanjeni broj sekretornih stanica, rezultiraju i oslabljenom funkcijom crijevne barijere te povećanom osjetljivošću na upalne podražaje (WORTHINGTON i sur., 2018.). Zbog svoje uloge u kontroli diferencijacije i proliferacije ATOH1 se također smatra važnim supresorom tumorogeneze u crijevima, pri čemu je njegova smanjena ekspresija povezana s razvojem kolorektalnog karcinoma kod čovjeka (BOSSUYT i sur., 2009.).

Enteroendokrine stanice specijalizirane su stanice smještene uzduž gastrointestinalnog trakta koje izlučuju hormone, neuropeptide i parakrine čimbenike koji djeluju na epitelne, imunološke i živčane stanice u probavnom sustavu, regulirajući probavu i metabolizam hranjivih tvari (ATANGA i sur., 2023.). U crijevima miša enteroendokrine stanice potječu iz ATOH1-ovisne sekretorne loze, pri čemu njihovu diferencijaciju dodatno regulira transkripcijski faktor NEUROG3, ključan za usmjeravanje progenitora prema enteroendokrinoj lozi (WORTHINGTON i sur., 2018.). Bez obzira na to što postoji više tipova enteroendokrinih stanica, kromogranin A

(eng. *chromogranin A*, CHGA) pozitivan je u svim subpopulacijama enteroendokrinih stanica (KIM i sur., 2001.). Ovisno o položaju u probavnom traktu i hormonima koje izlučuju, enteroendokrine stanice mogu se podijeliti u nekoliko tipova u debelom crijevu: EC-stanice koje izlučuju serotonin za regulaciju motiliteta crijeva, L-stanice koje izlučuju GLP-1, GLP-2 i peptid YY za kontrolu apetita i izlučivanja inzulina te M-stanice koje izlučuju motilin za regulaciju migrirajućeg motornog kompleksa (POSOVSZKY, 2017.; ATANGA i sur., 2023.). Važno je naglasiti da enteroendokrine stanice, osim svoje endokrine funkcije, imaju i parakrinu ulogu u regeneraciji epitela. Njihovi sekretorni produkti mogu poticati proliferaciju epitelnih progenitora, modulirati aktivnost matičnih stanica u kriptama te utjecati na angiogenezu i obnovu crijeвне barijere. U tom kontekstu povećana ekspresija CHGA tijekom regeneracije može odražavati pokušaj epitela da ponovno uspostavi složenu mrežu signalnih interakcija potrebnih za funkcionalni oporavak (WORTHINGTON i sur., 2018.; BEUMER i CLEVERS, 2021.).

Crijevne kemosenzorne stanice (eng. *tuft cells*) relativno su novootkrivene specijalizirane sekretorne stanice debelog crijeva koje služe kao kemosenzori crijeva, sudjeluju u imunološkoj obrani protiv parazita i protozoa, oblikovanju sastava mikrobioma, zaštiti crijevne barijere i regeneraciji crijevne sluznice (HENDEL i sur., 2022.). One eksprimiraju niz kemosenzornih molekula, uključujući komponente signalnog puta sličnog onome u okusnim pupoljcima jezika, poput TRPM5, $G\alpha$ -gustducina i PLC β 2, što im omogućuje detekciju luminalnih kemijskih signala, a čine 0,4 % do 2 % svih epitelnih stanica u zdravom probavnom sustavu čovjeka (GERBE i sur., 2011.). U debelom crijevu miša kemosenzorne stanice potječu iz ATOH1-ovisnih sekretornih progenitora, ali njihova diferencijacija dodatno zahtijeva aktivaciju transkripcijskog faktora POU2F3, koji se smatra glavnim regulatorom njihove sudbine. DCLK1 (eng. *doublecortin-like kinase 1*) mikrotubulima je vezan protein s kinaznom aktivnošću koji je prepoznat kao jedan od najčešće korištenih biljega kemosenzornih stanica u crijevnom epitelu te se smatra pouzdanim biljekom za označavanje kemosenzornih stanica čovjeka i miša (CHANDRAKESAN i sur., 2015.). Novija istraživanja pokazuju da broj kemosenzornih stanica raste pod utjecajem citokina poput IL-4 i IL-13 te da se ne moraju stvarati samo iz LGR5-pozitivnih matičnih stanica, već posjeduju plastičnost pa mogu biti rezervni izvor regenerativnih stanica epitela (HUANG i sur., 2024.).

Vrčaste stanice (eng. *goblet cells*) specijalizirane su epitelne stanice u luminalnom sloju crijeva koje proizvode i izlučuju mucine, pomoćne molekule poput TFF (eng. *trefoil factor*), Fcgbp (eng. *Fcy-binding protein*) i RELM β (eng. *resistin-like molecule β*) (KIM i HO, 2010). U zdravom debelom crijevu vrčaste stanice igraju ključnu ulogu u održavanju crijevnih barijera, regulaciji interakcije između lumena, epitela i imunološkog sustava te modulaciji mikrobiote (KNOOP i NEWBERRY, 2018.). Sluz, koja se sastoji uglavnom od mucina i vode, formira sloj gela između lumena crijeva i epitelne površine te služi kao fizička barijera koja sprječava direktan kontakt između sadržaja crijeva i epitelnih stanica (GUSTAFSSON i JOHANSSON, 2022.). MUC2 je glavni gel-formirajući mucin u debelom crijevu, odgovoran za stvaranje dvoslojne barijere sluznice: unutarnjeg sterilnog sloja i vanjskog sloja s izoliranim bakterijama (QIAO i sur., 2025.). Produkcija citokina IL-22 potiče obnavljanje vrčastih stanica, a samim time i sluznice u fazi oporavka debelog crijeva nakon lezije (SUGIMOTO i sur., 2008.). Za analizu vrčastih stanica u debelom crijevu često se preferira AB-PAS bojenje jer omogućuje robusnu vizualizaciju svih vrsta mucina i preciznu kvantifikaciju stanica. AB-PAS bojenje daje cjelovit prikaz svih vrsta mucina prisutnih u vrčastim stanicama, neovisno o njihovoj molekularnoj strukturi ili statusu sekrecije, pri čemu Alcian Blue s pH 2,5 veže kisele mukopolisaharide i sialomucine, dok PAS reagira s neutralnim mucinima i glikoproteinima stvarajući karakterističnu purpurno-plavu ili ružičasto-ljubičastu boju (BANCROFT i GAMBLE, 2007.).

2.2.4. Diferencijacija apsorptivnih epitelnih stanica debelog crijeva

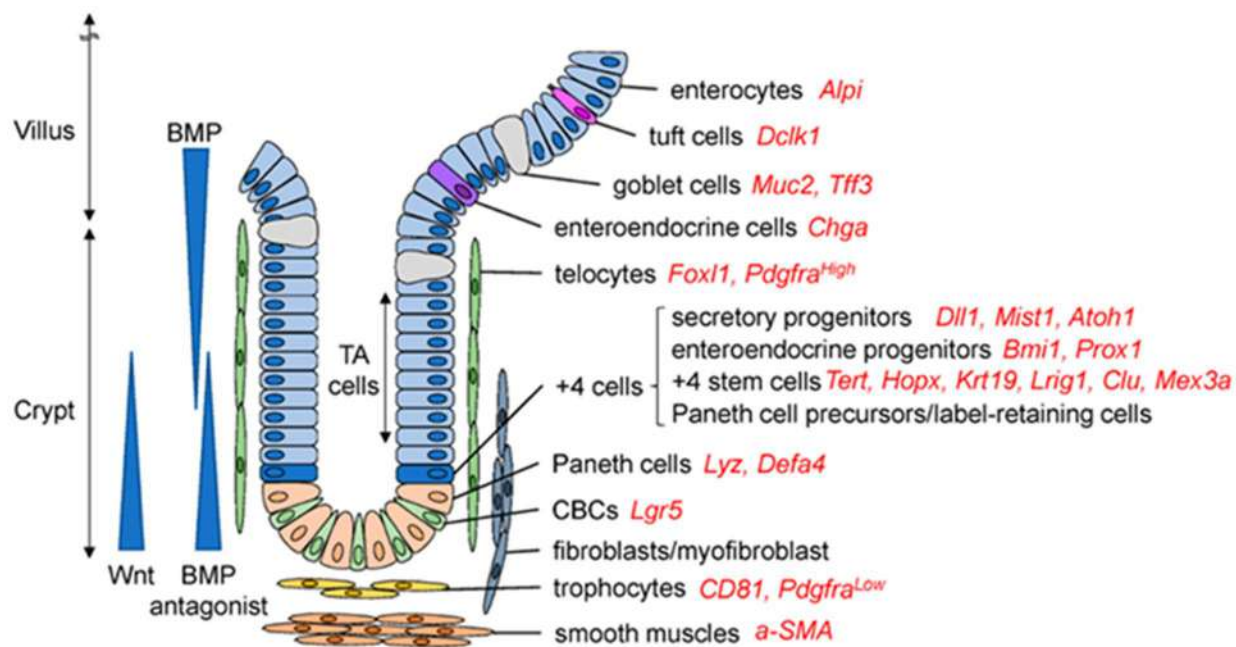
Kao što je već navedeno, diferencijacija apsorptivnih epitelnih stanica proizlazi iz multipotentnih progenitorskih stanica kripti, a dominantno je regulirana Notch signalnim putem koji potiče ekspresiju transkripcijskog represora HES1. HES1 inhibira ATOH1-ovisnu sekretornu diferencijaciju te usmjerava progenitorske stanice prema apsorptivnoj liniji, čime osigurava održavanje epitelne homeostaze, stabilnost epitelne barijere i pravilne arhitekture kripti (FRE i sur., 2005.).

HES1 (eng. *hairy and enhancer of split-1*) transkripcijski je faktor iz skupine *basic helix-loop-helix* i jedan od glavnih nizvodnih efektor Notch signalnog puta, s ključnom ulogom u održavanju homeostaze crijevnog epitela (ISO i sur., 2003.). U miša i čovjeka HES1 je dominantno izražen u progenitorskim stanicama kripti debelog crijeva, gdje potiče usmjerenje prema

apsorptivnoj liniji i istodobno inhibira diferencijaciju prema sekretornim stanicama putem represije ATOH1 (VANDUSSEN i SAMUELSON, 2010.; ZHENG i sur., 2011.; KIM i SHIVDASANI, 2011.). Osim što pri njegovoj smanjenoj ekspresiji dolazi do hiperprodukcije sekretorne linije epitelnih stanica, novija istraživanja pokazuju da kod povećane ekspresije HES1 dolazi do smanjenja WNT5A u fibroblastnoj liniji humanih crijeva CCD-18Co, što ukazuje na važnu ulogu Notch signalnog puta u epitelno-mezenhimalnoj komunikaciji (HU i sur., 2023.).

Ugljična anhidraza 2 (eng. *carbonic anhydrase 2*, CA2) citosolni je enzim koji sudjeluje u regulaciji acidobazne ravnoteže, sekreciji bikarbonata, transportu iona, održavanju volumena stanica i zaštiti sluznice crijeva (CHARNEY i sur., 1986.; STEWART i sur., 1999.; KIVELÄ i sur., 2005.). Aktivnost ugljičnih anhidraza posebno je visoka u debelom crijevu, gdje CA2 i CA1 čine dominantne izoenzime (LÖNNERHOLM i sur., 1985.). Ovaj enzim snažno je izražen u citoplazmi zrelih apsorptivnih epitelnih stanica gornjih dijelova kripti, a slabije je izražen u bazi kripti. Zbog svoje povezanosti s diferencijacijom epitela i transportom iona CA2 se često koristi kao biljeg diferenciranih epitelnih stanica, indikator funkcionalnog statusa epitela te potencijalni sudionik u regeneraciji i odgovoru na oštećenje (BEKKU i sur., 2000.). U mišjim modelima kolitisa, kao što je, naprimjer, DSS-inducirani kolitis, promjene u ekspresiji CA2 mogu odražavati poremećaje diferencijacije, transporta iona i integriteta barijere (KLEINKE i sur., 2005.).

Dostupna novija literatura opisuje fiziološki proces proliferacije, diferencijacije i smrti epitelnih stanica u tankom crijevu (**Slika 3**), dok su podaci o procesu diferencijacije epitelnih stanica debelog crijeva kod ljudi i miševa vrlo oskudni.



Slika 3 Ilustrativni prikaz populacije epitelnih stanica

Prikaz epitelnih stanica s pripadajućim biljezima i signalnim putovima na primjeru tankog crijeva čovjeka. Preuzeto i prilagođeno iz: KUROKAWA i sur., 2020.

Kratice: CBCs - eng. *crypt basal cells*, BMP – eng. *bone morphogenetic protein*.

2.3. ULCEROZNI KOLITIS KOD LJUDI

Upalna bolest crijeva (eng. *inflammatory bowel disease*, IBD) dugotrajna je autoimunosna bolest karakterizirana kroničnom upalom gastrointestinalnog sustava, a može se podijeliti na ulcerozni kolitis (eng. *ulcerative colitis*, UC) i Crohnovu bolest (eng. *Crohn's disease*, CD). Patogeneza bolesti još nije u potpunosti razjašnjena, ali smatra se da nastaje uslijed djelovanja okolišnih i genetskih čimbenika u kombinaciji s neadekvatnim odgovorom imunološkog sustava te poremećenom crijevnom mikroflorom (LEE i sur., 2018.). Kod ulceroznog kolitisa upala započinje u području anusa te se kontinuirano širi proksimalno uzduž debelog crijeva, zahvaćajući prvenstveno sluznicu i protežući se do razine *muscularis mucosae*. Nasuprot tome, Crohnova bolest može zahvatiti bilo koji dio probavne cijevi, od usne šupljine do anusa, najčešće započinje u području terminalnog ileuma, a upalni proces je transmuralan, odnosno zahvaća sve slojeve crijevnih stijenki i širi se u okolno masno tkivo (KUMAR i sur., 2020.). Bez obzira na to što je debelo crijevo često zahvaćeno kod oba oblika upalne bolesti crijeva, histopatologija i patogeneza bolesti u tankom crijevu mnogo su bolje proučene i zastupljenije u literaturi, ostavljajući time mnogo prostora za napredak u razumijevanju fizioloških i patoloških procesa koji se odvijaju u debelom crijevu. Razumijevanje embrionalnih, anatomskih, histoloških i patoloških razlika ključno je za interpretaciju kliničkih i histoloških nalaza kod upalne bolesti crijeva te za dizajn terapijskih strategija usmjerenih na regeneraciju epitela i obnovu sluznice.

2.3.1. Makroskopske i histopatološke promjene debelog crijeva u ulceroznom kolitisu

Ulcerozni kolitis karakteriziraju ponavljane faze egzacerbacije i remisije, pri čemu aktivna upala zahvaća crijevenu sluznicu, dok se tijekom kroničnih faza odvijaju reparativni procesi cijeljenja oštećenog epitela. Proces epitelne regeneracije složen je i dugotrajan, a trenutne terapijske strategije uglavnom se fokusiraju na smanjenje upale, s ograničenim naglaskom na poticanje epitelnog cijeljenja i obnovu integriteta sluznice (CAI i sur., 2021.). Za dijagnostiku ulceroznog kolitisa neophodno je napraviti endoskopski pregled s uzimanjem uzorka tkiva debelog crijeva za patohistološku analizu. Bolest je makroskopski karakterizirana difuznom upalom sluznice debelog crijeva, koja se očituje edemom, erozijama i ulceracijama. Histološkim pregledom bioptata debelog crijeva vidljive su akutne i kronične promjene tkiva crijeva: akutna neutrofilna upala s mogućom infiltracijom kripti i stvaranjem apscesa te kronična distorzija kripti,

bazalna limfocitoza i metaplazija Panethovih stanica u descendentnom dijelu debelog crijeva (DEROCHE i sur., 2014.).

Pacijenti s dijagnosticiranim ulceroznim kolitisom imaju povećan rizik razvoja kolorektalnog karcinoma u odnosu na zdravu populaciju, jer dugotrajna upala i pojačana epitelna proliferacija doprinose razvoju displastičnih promjena, najčešće 8 – 10 godina nakon dijagnoze, osobito kod ranog početka bolesti, dugotrajnog trajanja i opsežne upale (SAMESHIMA i sur., 2015.). Kolorektalni karcinom u podlozi ulceroznog kolitisa razvija se kroz ponavljajuće kronične upale i progresiju od nedisplastične sluznice preko displazije niskog stupnja (eng. *low-grade dysplasia*, LGD) i displazije visokog stupnja (eng. *high-grade dysplasia*, HGD) do invazivnog adenokarcinoma (YASHIRO, 2014.). Zbog toga je u patologiji ove bolesti kod ljudi nužno razlikovati regenerativne epitelne promjene od displazije niskog i visokog stupnja, što se temelji na kombinaciji citoloških i arhitekturnih obilježja (LANGER i sur., 2014.; MAGRO i sur., 2013.). Histološki, regeneracija je karakterizirana proliferacijom epitela uz očuvan polaritet stanica, bazalno smještene mitoze i relativno urednu arhitekturu kripti. Jezgre mogu biti povećane i blago hiperkromatske, ali su uniformne, bez izraženog pleomorfizma. Pseudostratifikacija je minimalna ili ograničena na donju trećinu epitela, a kompleksna distorzija kripti izostaje (ODZE i GOLDBLUM, 2023.). Displazija predstavlja neoplastičnu epitelnu promjenu bez invazivnog rasta kroz bazalnu membranu, ali se smatra prekanceroznom pojavom te se može podijeliti na displaziju niskog i visokog stupnja (HERMANEK, 1987.). Displazija niskog stupnja pokazuje blagu do umjerenu nuklearnu atipiju, djelomičnu pseudostratifikaciju u bazalnoj polovici epitela te početnu arhitekturnu nepravilnost kripti. Polaritet je djelomično narušen, mitoze su nešto učestalije, ali uglavnom ostaju bazalno lokalizirane. Prisutna je kombinacija citoloških promjena i blage strukturne distorzije. Displazija visokog stupnja obilježena je izraženom nuklearnom atipijom i pleomorfizmom, gubitkom polariteta kroz cijelu debljinu epitela, difuznom pseudostratifikacijom, atipičnim mitozama iznad bazalne zone te kompleksnom arhitekturnom distorzijom kripti, kao što su razgranate, „back-to-back“ ili kribriformne strukture. Ovdje su citološke i strukturne promjene izražene i difuzne (BRESSENOT i sur., 2014.; FEAKINS i sur., 2024..) (**Tablica 1**).

Tablica 1 Histološke razlike između regeneracije, displazije niskog i visokog stupnja u ulceroznom kolitisu ljudi

Tablica napravljena prema DEROCHE i sur, 2014.

Značajka	Regeneracija	Displazija niskog stupnja	Displazija visokog stupnja
Nuklearna atipija	Blago povećane i uniformne jezgre	Uvećane, izdužene, blago do umjereno hiperkromatske jezgre	Izražen pleomorfizam, velike hiperkromatske jezgre, grubi kromatin
Polaritet stanica	Očuvan	Djelomično narušen	Izgubljen kroz cijelu debljinu epitela
Pseudostratifikacija	Minimalna, ograničena na bazalnu trećinu epitela	Prisutna u bazalnoj polovici epitela	Difuzna, zahvaća cijelu visinu epitela
Mitoze	Bazalno lokalizirane, fiziološke mitoze	Blago povećane, uglavnom bazalne mitoze	Brojne, iznad bazalne zone, moguće atipične mitoze
Arhitektura kripti	Uglavnom očuvana	Blaga nepravilnost i elongacija	Kompleksna distorzija, „back-to-back“, kribriformne strukture
Mucin u citoplazmi	Očuvana ili blago smanjena količina mucina	Smanjena količina mucina	Znatno reduciran ili odsutan mucin

2.3.2. Spolne razlike u ulceroznom kolitisu

Ulcerozni kolitis javlja se u oba spola, no brojna istraživanja upućuju na razlike u epidemiologiji, fenotipu bolesti, terapijskom odgovoru i kvaliteti života između muškaraca i žena. Iako je ukupna incidencija ulceroznog kolitisa u većini populacija približno jednaka, nekoliko je studija pokazalo da muškarci imaju nešto veću incidenciju nakon 45. godine života (NG i sur., 2017.). U mlađim dobnim skupinama učestalost je uravnotežena između spolova, što upućuje na moguću ulogu spolnih hormona u modulaciji imunološkog odgovora i osjetljivosti na bolest. Što

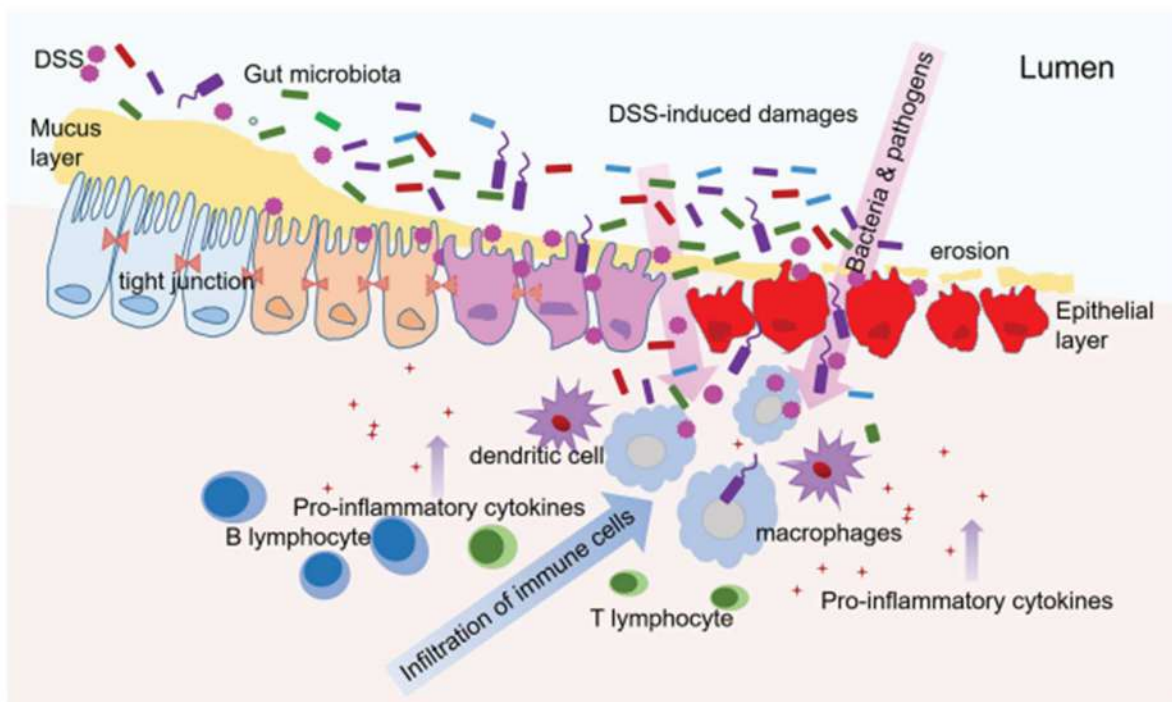
se tiče proširenosti bolesti, muškarci češće razvijaju ekstenzivni kolitis, dok je kod žena učestaliji proktitis (GARGALLO-PUYUELO i sur., 2024.). Navedene razlike u proširenosti bolesti između spolova povezane su s primijećenim spolno uvjetovanim terapijskim odgovorom te potrebom za kirurškim zahvatom. Muškarci s ulceroznim kolitisom imaju veću vjerojatnost da će tijekom trajanja bolesti zahtijevati kolektomiju, dok je kod žena češća potreba za ponavljanom sistemskom terapijom kortikosteroidima (SCEATS i sur., 2019.). Ukupno gledano, muškarci i žene s ovom bolešću pokazuju različite obrasce kliničke manifestacije i ishoda bolesti, što naglašava potrebu za spolno specifičnim pristupom u dijagnostici, praćenju i liječenju.

2.3.3. Regionalne razlike u ulceroznom kolitisu

U ulceroznom kolitisu makroskopske i histološke promjene, uključujući ulceracije, infiltraciju upalnih stanica, edem te gubitak kontinuiteta epitelnog sloja, izraženije su u distalnom nego u proksimalnom dijelu debelog crijeva. Proksimalni dio u ranim je fazama bolesti uglavnom očuvan, iako može pokazivati blage mikroskopske znakove upale (ORDAS i sur., 2012.). Histološke studije potvrđuju da su promjene kod ulceroznog kolitisa specifične: rektum je gotovo uvijek zahvaćen, a intenzitet upale postupno slabi prema proksimalnom dijelu debelog crijeva. Retrospektivne analize bioptata pokazale su da distalni dio, uključujući zavijeni dio debelog crijeva, često pokazuje najizraženije histološke lezije, dok cekum i uzlazni dio nisu zahvaćeni upalom, posebno u ranim stadijima bolesti (MOWAT i AGACE, 2014.). Histološke promjene u sklopu akutne faze ulceroznog kolitisa uključuju akumulaciju neutrofila u lamini proprij i lumenu kripti, stvaranje kriptalnih apscesa i kriptalnu disrupciju te smanjen broj vrčastih stanica unutar epitela. Tijekom faze remisije bolesti distalni dio debelog crijeva može pokazivati nepotpunu regeneraciju epitela, fibrotične promjene i pseudopolipoidne formacije, dok proksimalni segment često zadržava gotovo normalnu arhitekturu (BARKER, 2014.). Endoskopska procjena također potvrđuje kontinuirani obrazac upale koji se širi proksimalno, no u rijetkim slučajevima mogu se pojaviti segmentalno zahvaćena područja crijeva smještena između zdravih i netaknutih segmenata (eng. „skip lesions”) (KIM i sur., 1999.). Navedene razlike u zahvaćenosti imaju klinički značaj pri planiranju biopsija, histopatološke evaluacije i procjeni težine bolesti, jer distalni dio debelog crijeva daje najrelevantnije uzorke za dijagnostiku i praćenje ulceroznog kolitisa, dok proksimalni dio može služiti za procjenu proširenosti bolesti.

2.4. DSS-INDUCIRANI MODEL KOLITISA KOD MIŠEVA

Visoka stopa prevalencije ulceroznog kolitisa potaknula je istraživanja u području etiologije i patofiziologije bolesti te razvoj novih lijekova. Za potrebe sveobuhvatnog istraživanja unutar navedenih područja tijekom posljednjih tridesetak godina razvijeni su mnogobrojni modeli bolesti na pokusnim životinjama. Među najčešćim modelima ulceroznog kolitisa su modeli na mišu, koji se mogu podijeliti na transgenetske, „knockout“ te kemijski i bakterijski inducirane modele (LOW i sur., 2013.). Za razumijevanje mehanizama oštećenja i regeneracije epitela često se koristi mišji model kolitisa induciranog natrij dekstran sulfatom (eng. *dextran sulfate sodium*, DSS), koji u velikoj mjeri reproducira akutnu i regenerativnu fazu bolesti u ljudi (WIRTZ i sur., 2017.). DSS je negativno nabijeni polisaharid nastao sulfoniranjem polisaharida dekstrana, molekularne mase od 5 do 1400 kDa (PERŠE i CERAR, 2012.). Model kolitisa induciran DSS-om prvi je put detaljno opisan početkom 90-ih godina prošlog stoljeća (OKAYASU i sur., 1990.), a kasnije metodološki standardiziran i široko primijenjen u istraživanjima mehanizama upale i regeneracije debelog crijeva (WIRTZ i sur., 2017.). Za razliku od imunološki posredovanih modela kolitisa, DSS destabilizira veze uskih spojeva između epitelnih stanica, čime povećava paracelularnu propusnost, što omogućuje translokaciju bakterijskih produkata u laminu propriju, dovodi do kemijskog oštećenja epitela, stvaranja erozija i ulkusa te posljedično povećane propusnosti crijeva (JOHANSSON i sur., 2010.; EICHELE i KHARBANDA, 2017.) (**Slika 4**). Osim toga, DSS ima i antikoagulacijsko djelovanje uslijed kojeg dolazi do intestinalnog krvarenja (ZHAO i sur., 2022.). Uočeno je da DSS tvori komplekse s butiratom, koji potječe iz kratkolančanih masnih kiselina (eng. *short-chain fatty acids*, SCFAs), a koje su obilno prisutne u mikrobioti debelog crijeva, što može objasniti zašto se lezije češće javljaju u debelom nego u tankom crijevu (YANG i MERLIN, 2024..).



Slika 4 Ilustrativni prikaz djelovanja DSS-a na sluznicu debelog crijeva miša

Preuzeto i prilagođeno iz: YANG i MERLIN, 2024.

Kratice: DSS- eng. *dextran sulfate sodium*, (natrij dekstran sulfat)

2.4.1. Makroskopske i histopatološke promjene debelog crijeva miševa nakon primjene DSS-a

Debelo crijevo miša prikladan je model za proučavanje homeostaze, upale i regeneracije crijevnog epitela, budući da u fiziološkim uvjetima pokazuje stabilnu arhitektonsku organizaciju, visoku stopu stanične obnove i održava učinkovitu crijevnu barijeru. Zbog jasno definirane vremenske dinamike upale, oštećenja epitela i reparacije, DSS-model omogućuje diferencirano proučavanje akutne upale, postupalne regeneracije i kroničnog tijeka promjena u crijevnoj sluznici. Histopatološke promjene sluznice analizirane su unutar četiri zone od interesa kako bi se omogućilo bolje razumijevanje promjena epitela ovisno o mikrokolišu. U debelom crijevu miševa kojima je kolitis eksperimentalno izazvan DSS-om mogu se raščlaniti četiri histopatološko-morfološki različita područja: područje erozije i/ili ulkusa s aktivnom upalom i nekrozom bez površinskog sloja epitela, zatim područje koje okružuje tu leziju s vidljivim epitelnim promjenama

u vidu epitelne hiperplazije i displazije, abnormalne arhitekture kripti te prisutnosti upalnih stanica u lamini propriji, submukozi kao i pridruženom masnom tkivu. Područje upaljene sluznice bez vidljivih epitelnih promjena nalazi se u područjima udaljenijima od vidljivih lezija, a karakteriziraju ga upalne stanice u svim slojevima debelog crijeva, ali najčešće u lamini propriji sluznice. Posljednje histopatološko-morfološko područje koje se može definirati nakon primjene DSS-a kod miševa jest netaknuta i neoštećena sluznica bez vidljivih upalnih i epitelnih promjena. Primjena DSS-a otopljenog u vodi tijekom šest dana uzrokuje makroskopski vidljive promjene debelog crijeva: skraćenje debelog crijeva s edemom sluznice, suženje lumena debelog crijeva, erozije i ulceracije sluznice te ponekad eritem i hemoragije sluznice uz sekreciju sluzi ili krvi (OKAYASU i sur., 1990.). Značajne histološke promjene uzrokovane akutnom primjenom DSS-a su oštećenje i nekroza površinskog epitelnog sloja, upala koju karakteriziraju infiltracija neutrofila i limfocita u lamini propriji, hiperproliferacija epitelnih stanica i produljenje kripti, poremećaj arhitekture kripti, smanjen broj vrčastih stanica te edem i/ili upala u submukozi (COOPER i sur., 1993.). Model akutnog DSS-om inducirano kolitisa s oporavkom kod miševa karakteriziran je multifokalnom upalom, oštećenjem epitela s erozijama i ulkusima te stvaranjem novog epitela na mjestu lezije. Nakon prekida primjene DSS-a i šest dana primjene vode započinje faza postupnog oporavka obilježena regeneracijom epitela, ponovnom uspostavom proliferacijskih zona na rubovima lezija te postupnim smanjenjem upalne infiltracije, što u kontekstu usporedbe s humanom bolešću omogućuje proučavanje mehanizama reparacije i epitelne homeostaze u fazi remisije ulceroznog kolitisa (CHASSAING i sur., 2014.; ERBEN i sur., 2014.). U fazi oporavka nakon primjene DSS-a histološki se mogu uočiti i područja reepitelizacije iznad prethodnih ulceracija te djelomična obnova populacije vrčastih stanica (PERŠE i CERAR, 2012.). Za razliku od akutnog modela, DSS-om inducirani kronični modeli, koji uključuju ponavljane cikluse primjene DSS-a, dovode do kronične mononuklearne upale s izraženijim poremećajem arhitekture kripti, što bolje oponaša kronični tijek humane bolesti. U kroničnoj fazi mogu se razviti fibrotične promjene s nepotpunom reepitelizacijom ulceracija, što upućuje na prijelaz iz dominantno akutne upale u fazu kronične imunološke aktivacije i regeneracije epitela (CHASSAING i sur., 2014.) (Tablica 2).

Tablica 2 Histopatološke razlike između akutnog kolitisa, faze oporavka i kroničnog DSS-induciranog kolitisa kod miša

Tablica napravljena i prilagođena prema PERŠE i CERAR, 2012.; ERBEN i sur, 2014.

DSS model	Akutni DSS model	Akutni DSS model s oporavkom	Kronični DSS model
Vremensko razdoblje primjene DSS-a	6 dana DSS-a	6 dana DSS-a, 6 dana samo vode	3 x 5 dana DSS-a, između svakog ciklusa 2 dana samo voda
Dan terminalne procedure i uzorkovanja tkiva	7	12	21
Infiltracija upalnih stanica	Intenzivna akutna upala s prevladavajućim neutrofilima	Mješovita upalna infiltracija	Kronična upala s prevladavajućim mononuklearima
Erozije i ulceracije epitela	Opsežne i duboke ulceracije	Značajno smanjene	Manje izražene
Prisutnost vrčastih stanica	Smanjena prisutnost, pogotovo na rubovima lezija	Postupna obnova	Kronični gubitak ili djelomična obnova
Epitelna displazija	Proliferacija epitelnih stanica	Poremećena arhitektura kripti s vidljivim displastičnom promjenama niskog stupnja	Poremećena arhitektura kripti s vidljivim displastičnim promjenama visokog stupnja
Poremećaj arhitekture kripti	Skraćenje i destrukcija kripti	Nepravilne kripe s djelomičnom reorganizacijom	Distorzija, grananje i atrofija kripti
Reepitelizacija	Nije prisutna ili minimalna	Uglavnom nepotpuna ili potpuna s tankim slojem epitelnih stanica iznad lezije	Prisutna, ali nepravilna
Fibrotične promjene	Nema	Vidljiva samo u pojedinim uzorcima debelog crijeva	Česta

2.4.2. Spolne razlike u DSS-induciranom kolitisu miševa

Spol životinje značajno utječe na težinu bolesti, upalni odgovor i proces epitelne regeneracije. Histopatološka analiza debelog crijeva u modelu DSS-om induciranog kolitisa pokazala je da su u debelom crijevu ženki vidljiva blaža oštećenja kripti, veći broj vrčastih stanica te slabiji upalni odgovor s manjom infiltracijom neutrofila i limfocita u lamini propriji, dok mušjaci često razvijaju dublje ulceracije i izraženije oštećenje epitela (BABIČKOVA i sur., 2015.; KLEIN i sur., 2016.). Također, postoje spolne razlike i u molekularnom odgovoru nakon primjene DSS-a; kod muških miševa uočena je povećana transkripcija gena povezanih s aktivacijom puta NF- κ B i cirkadijalnim ritmom, dok je kod ženki bila izraženija transkripcija ciljnih gena potaknuta aktivacijom receptora glukokortikoida (HASES i sur., 2022.).

2.4.3. Regionalne razlike u DSS-induciranom kolitisu miševa

Već opisane histološke i funkcionalne razlike između proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva miša naglašavaju važnost regionalnog pristupa u analizi eksperimentalnih modela upale i metaboličkog stresa. Proksimalni i distalni segmenti mogu pokazivati divergentne morfološke i biološke odgovore, a ove razlike posebno su vidljive u patologiji nakon eksperimentalnog izazivanja kolitisa. U prethodnim studijama pokazano je da nakon petodnevnice primjene DSS-a dolazi do veće proizvodnje proinflamatornih medijatora u distalnom nego u proksimalnom dijelu crijeva miševa (YAN i sur., 2009.). Nekoliko studija pokazuje prostornu varijaciju koncentracije kratkolančanih masnih kiselina (eng. *short-chain fatty acids*, SCFA) u debelom crijevu kod miša i čovjeka: koncentracije su često niže u distalnom dijelu nego u proksimalnom. Niska razina SCFA, posebno maslačne kiseline, korelira s težom kliničkom slikom upale, višim indeksom aktivnosti kolitisa (eng. *daily activity indeks*, DAI), kraćim debelim crijevom i izraženijim histopatološkim promjenama, dok suplementacija butiratom ili ponovna kolonizacija bakterijama koje proizvode butirat ublažavaju upalnu bolest crijeva (MISHIRO i sur., 2013.; PANAHA i sur., 2023.). Heterogenost između proksimalnog i distalnog debelog crijeva objašnjava zašto DSS-inducirani modeli kolitisa kod miševa najčešće zahvaćaju distalni segment, što može ograničavati direktnu translaciju eksperimentalno prikupljenih podataka na humanu bolest (WIRTZ i sur., 2017.).

2.5. OBNOVA I DIFERENCIJACIJA EPITELA DEBELOG CRIJEVA NAKON OŠTEĆENJA

2.5.1. Mehanizmi oštećenja epitela debelog crijeva

Tijekom patoloških procesa, kao što su upala i oštećenje sluznice crijeva, narušena je ravnoteža u sazrijevanju, proliferaciji, diferencijaciji i apoptozi epitelних stanica. Mišji model kolitisa induciran DSS-om uzrokuje epitelno-barijerna oštećenja koja pokreću snažan urođeni i adaptivni imunološki odgovor.

U ranoj fazi oštećenja, tijekom prvih dana izlaganja DSS-u, dolazi do direktnog toksičnog djelovanja na kolonocite, osobito u distalnom dijelu debelog crijeva, te se histološki opaža gubitak površinskog epitela, apoptoza stanica na vrhovima kripti i početna infiltracija neutrofila. Nakon oštećenja epitelnih stanica crijeva stanična smrt pokreće upalni odgovor koji uzrokuje degradaciju ekstracelularnog matriksa i oštećenje tkiva, a proliferacija i diferencijacija epitelnih stanica kripti dovode do regeneracije oštećenog tkiva te ponovne uspostave normalne funkcije crijeva (LENTI i sur., 2024.). Za detekciju i analizu proliferacije epitelnih stanica koristi se biljeg Ki67, protein jezgre stanice povezan s proliferacijom i transkripcijom ribosomske RNA. Prisutan je u stanici tijekom aktivnih faza staničnog ciklusa (G1, S, G2 i mitoza), dok je tijekom mirovanja, odnosno G0 faze, odsutan (SCHOLZEN i GERDES, 2000.). Citokinski profil oštećenja crijeva karakterizira rani porast proinflammatoryh medijatora, uključujući TNF- α , IL-1 β , IL-6 i kemokine poput CXCL1. U ovoj fazi prevladava urođeni imunološki odgovor, dok regenerativni procesi još nisu značajno aktivni (CHASSAING i sur., 2014.; WIRTZ i sur., 2017.).

Akutna upalna faza, koja obično traje četiri do sedam dana nakon primjene DSS-a, obilježena je najvećim oštećenjem epitela. U ovoj fazi histološki se mogu uočiti erozije i ulceracije sluznice, destrukcija kripti te masivna infiltracija neutrofila i mononuklearnih stanica. Paralelno dolazi do aktivacije adaptivnih imunoloških odgovora, osobito Th1 i Th17 staničnog odgovora, uz porast citokina TNF- α , IL-6, IL-17A, IFN- γ i IL-23. IL-6 aktivira STAT3 signalizaciju u epitelu, što paradoksalno potiče proliferaciju preživjelih stanica (ALEX i sur., 2009.; GRIVENNIKOV i sur., 2009.). U ovoj fazi opaža se povišena ekspresija Ki67, no arhitektura kripti ostaje narušena (PICKERT i sur., 2009.).

Nakon prestanka izlaganja DSS-u počinje rana regenerativna faza, koja traje od jednog do tri dana, a tijekom ove faze dolazi do intenzivne obnove epitela. Ključni događaji uključuju aktivaciju LGR5-pozitivnih intestinalnih matičnih stanica (BARKER i sur., 2007.), ponovnu diferencijaciju progenitorskih stanica, hiperplaziju kripti te formiranje novog epitela iznad ulceracija. Dominantni signalni putevi u ovoj fazi uključuju Wnt/ β -katenin, koji održava populaciju matičnih stanica, Notch, koji regulira diferencijaciju epitelnih stanica, EGFR signalizaciju te STAT3, koji djeluje kao proliferativni signal nizvodno od IL-6 (OU i sur., 2024.). Posebno je važan IL-22, kojega proizvode ILC3 i Th17 stanice, a koji potiče epitelnu proliferaciju i zaštitu matičnih stanica tijekom regeneracije (ZHENG i sur., 2008.; LINDEMANS i sur., 2015.). Paralelno dolazi do prijelaza makrofaga u M2-fenotip, karakterističan za proregenerativni odgovor, uz povećanje TGF- β i faktora rasta (SOMMER i sur., 2021.).

Faza obnove arhitekture, koja se obično nastavlja od petog do desetog dana nakon prestanka primjene DSS-a, obilježena je postupnom normalizacijom sluznice. U tom razdoblju dolazi do reorganizacije kripti, povrata proliferativne zone u bazu kripti, obnove vrčastih stanica i barijere sluznice te smanjenja infiltracije neutrofila (CHEN i sur., 2018.). Citokinski profil u ovoj fazi pokazuje pad TNF- α i IL-1 β , uz porast regulatornih medijatora poput IL-10 (SWAFFORD i sur., 2020.). Međutim, u slučaju teškog ili ponavljalog oštećenja može se javiti perzistentna hiperproliferacija, poremećena diferencijacija i aberantna aktivacija signalnog puta Wnt, što predstavlja potencijalni mehanizam povezivanja kronične upale s kolorektalnom karcinogenezom (GRETEN i GRIVENNIKOV, 2019.).

2.5.2. Mehanizmi obnove epitela debelog crijeva

U ulceroznom kolitisu kod ljudi i mišjem modelu kolitisa izazvanog DSS-om nakon akutne upale, ovisno o vrsti tkiva i težini oštećenja, može doći do nekoliko mehanizama obnove epitela: reepitelizacije, reparacije, restitucije, regeneracije, kao i perzistirajuće upale koja može završiti kroničnom upalom ili recidivom. Ovi su procesi međusobno povezani, koordinirani signalima iz imunoloških stanica, matičnih stanica i mikrookoliša lamine proprije, a njihova uspješna interakcija ključna je za postizanje remisije i održavanje integriteta crijeвне sluznice (**Slika 5**).

Restitucija epitela specifično se odnosi na inicijalni brzi proces zatvaranja lezija migracijom preživjelih epitelnih stanica preko defekta, bez značajne proliferacije ili potpune obnove kripti

(STURM i DIGNASS, 2008.). Ovaj proces predstavlja prvu liniju obrane tkiva, omogućuje samo privremenu zaštitu od patogena i toksina iz lumena crijeva, ali dugoročno ne obnavlja strukturu kripti i sloj epitelnih stanica (BLIKSLAGER i sur., 2007.).

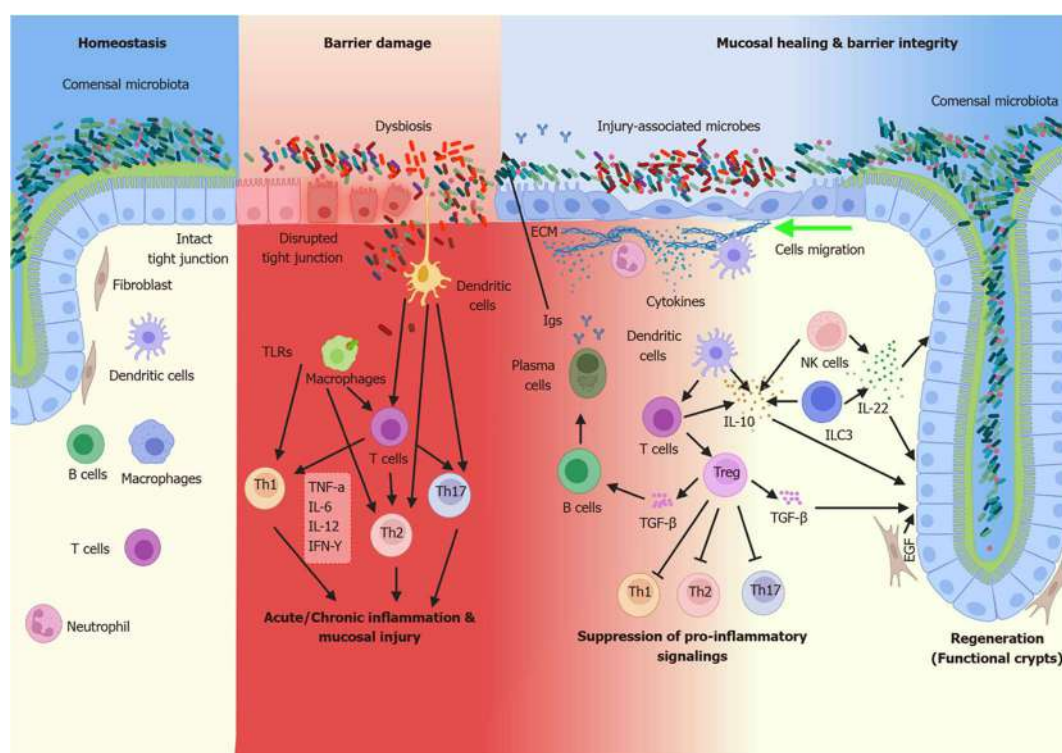
Reparacija je širi pojam koji označava proces obnove tkiva nakon oštećenja, pri čemu se integritet organa ponovno uspostavlja, ali ne nužno vraćanjem izvorne arhitekture i funkcije. U upalnoj bolesti crijeva reparacija epitela uključuje proliferaciju i migraciju epitelnih progenitorskih stanica kako bi se premostila oštećenja, često uz fibrotične promjene u lamini proprijii koje nadomještaju izgubljeno tkivo (CAI i sur., 2021.; LIU i sur., 2021.).

Reepitelizacija je dio restitucije i regeneracije, pri čemu epitelne stanice migracijom i proliferacijom ponovno pokrivaju površinske defekte. U ulceroznom kolitisu i DSS-induciranom kolitisu miševa reepitelizacija je kritična faza u remisiji bolesti jer omogućuje ponovno uspostavljanje barijere i sprječava daljnju upalu. Distalni dio debelog crijeva često pokazuje sporiju reepitelizaciju u usporedbi s proksimalnim segmentom, što korelira s težinom lezija i regionalnom distribucijom upale (GUENIN-MACE i sur., 2023.). U procesu reepitelizacije, na mjestu nastanka oštećenja crijeva, sloj privremenih pločastih epitelnih stanica migrira iz susjednih zdravih kripti i prekriva površinu lezije do četvrtog dana nakon ozljede. Epitelne stanice povezane s lezijom (eng. *wound-associated epithelium*, WAE) nastaju mitozom te stvaraju privremenu zaštitu od antigena i stranih tvari. Šestog do osmog dana nakon nastanka lezije crijevnog tkiva nove epitelne stanice migriraju u leziju iz susjednih zdravih kripti te tvore strukture slične kanalima. Epitelne stanice na dnu novostvorenih kanala visoko su proliferativne i eksprimiraju Axin2, ovisan o β -kateninu. Od osmog do četrnaestog dana nakon nastanka lezije u sluznici su prisutne regenerirane kripte (MIYOSHI, 2017.). Kako bi se detektirao površinski sloj epitela debelog crijeva i pratila dinamika novoformiranog epitela nakon lezije u modelu kolitisa, standardno se koristi imunohistokemijsko bojenje za citokeratine (MAJUMDAR i sur., 2012.), proteine intracitoplazmatskog citoskeleta epitelnog tkiva koji pripadaju skupini intermedijarnih filamenata stanica (HERRMANN i sur., 2007..).

Regeneracija debelog crijeva nakon DSS-induciranog oštećenja dinamičan je i višefazni proces koji uključuje koordiniranu interakciju epitelnih matičnih stanica, imunoloških stanica i mikrookoliša strome, odnosno lamine proprijie. To je proces potpunog obnavljanja izvorne

strukture i funkcije tkiva, a kod ulceroznog kolitisa regeneracija epitela uključuje aktivaciju LGR5-pozitivnih matičnih stanica u bazi kripte, proliferaciju epitelnih stanica te ponovnu formaciju kripti i mukozne arhitekture, pri čemu epitel ponovno dobiva fiziološku funkciju apsorpcije i zaštitne barijere (BARKER, 2014.). Zbog stalnog ljuštenja epitela crijeva tijekom razgradnje hrane, apsorpcije hranjivih tvari i eliminacije otpadnih tvari, crijevo se evolucijski razvilo u organ koji pokazuje jedan od najvećih regeneracijskih kapaciteta u ljudskom tijelu, jer se epitelni sloj obnavlja svakih pet do sedam dana (BARKER i sur., 2008.).

U upalnoj bolesti crijeva i DSS-induciranom modelu kolitisa restitucija služi za brzo zatvaranje defekta epitelne barijere, reparacija omogućuje obnovu tkiva i premošćivanje ulceracija, reepitelizacija pokriva površinske lezije migracijom i proliferacijom epitelnih stanica, dok regeneracija ponovno uspostavlja fiziološku arhitekturu i funkciju epitela.



Slika 5 Ilustrativni prikaz imunoloških promjena u upalnoj bolesti crijeva

Djelovanje imunoloških stanica i citokina u zdravom i oštećenom debelom crijevu čovjeka tijekom upalne bolesti crijeva. Preuzeto i prilagođeno iz: OTTE i sur., 2023.

2.5.3. Diferencijacija epitelnih stanica u ulceroznom kolitisu i DSS-induciranom kolitisu miševa

Kao što je prethodno naglašeno, Notch i Wnt/ β -katenin signalni putevi važni su regulatori LGR5-pozitivnih crijevnih matičnih stanica tankog i debelog crijeva kod ljudi i miševa te zajedno održavaju njihovu funkciju. Ako matični klonovi ovih stanica ostanu neoštećeni nakon lezije izazvane upalnom bolesti crijeva, njihove „stanice kćeri” mogu se ubrzano dijeliti i diferencirati u zrele epitelne stanice te tako obnoviti oštećenu sluznicu (ZHENG i DUAN, 2023.). U DSS-induciranom kolitisu kod miševa smanjen je broj LGR5-pozitivnih stanica tijekom faze akutne upale, dok tijekom faze oporavka dolazi do njihove regeneracije i oporavka (DAVIDSON i sur., 2012.).

U debelom crijevu pacijenata s ulceroznim kolitisom smanjena je ekspresija ATOH1 u epitelu i povezana je s gubitkom vrčastih stanica (ZHENG i sur., 2011.), dok novija istraživanja otkrivaju da ATOH1-pozitivni sekretorni progenitori pokazuju plastičnost tijekom homeostaze i ozljede te sudjeluju u regeneraciji debelog crijeva u mišjem modelu kolitisa. U modelu kolitisa gubitak ATOH1-pozitivnih stanica bio je povezan s povećanim oštećenjem debelog crijeva, što ukazuje na njihovu ulogu u regeneraciji nakon kolitisa (CASTILLO-AZOFEIFA i sur., 2019.). Kod ljudi s ulceroznim kolitisom i miševa s DSS-induciranim kolitisom dolazi do povećanja broja CHGA-pozitivnih stanica u debelom crijevu (EL-SALHY i sur., 1997.; EL-SALHY i sur., 2017.). Broj crijevnih kemosenzornih stanica mijenja se ovisno o patološkim uvjetima pa se tako njihov broj smanjuje u upalnoj bolesti crijeva kod ljudi (KJÆRGAARD i sur., 2021.). U ulceroznom kolitisu i u debelom crijevu miša u modelu kolitisa izazvanom DSS-om dolazi do deplecije vrčastih stanica, što rezultira stanjivanjem ili nestankom unutarnjeg mukoznog sloja (GERSEMANN i sur., 2009.; CHASSAING i sur., 2014.).

U upalnoj bolesti crijeva prisutan je izraženi poremećaj regulacije Notch signalizacije; u ulceroznom kolitisu često se bilježi povišena ekspresija HES1, osobito u upaljenim i regenerirajućim kriptama, pri čemu povećana razina HES1 korelira sa smanjenim brojem vrčastih stanica i narušenom mukoznom barijerom (ZHENG i sur., 2011.; NING i sur., 2024.). Također, u mišjem modelu kolitisa Notch signalizacija aktivira se na način da ublažava poremećaj regulacije čvrstih spojeva ovisnih o MLCK-u (eng. *myosin light chain kinase*) te time štiti sluznicu crijeva

(LI i sur., 2026.). Kod bolesnika s ulceroznim kolitisom ekspresija CA2 značajno je snižena s porastom upalne aktivnosti (NAKADA i sur., 2020.). Međutim, što se tiče uloge ovog enzima u debelom crijevu miševa nakon DSS-induciranog kolitisa, ne postoje izravna istraživanja koja bi to pitanje sustavno analizirala.

2.6. ULOGA CLDN2 U REGENERACIJI EPITELA DEBELOG CRIJEVA NAKON PRIMJENE DSS-A

U posljednje vrijeme proteini uskih spojeva epitelnih stanica crijeva, kao što su kladini, okludini i zonula occludens-1, dobivaju sve veći značaj u istraživanju upalne bolesti crijeva, ne samo u patologiji povezanoj s povećanom propusnošću epitelne barijere već i kao potencijalni sudionici u proliferaciji i diferencijaciji novih epitelnih stanica te regeneraciji epitela.

Protein kladin-2 (eng. *claudin-2*, CLDN2), kao član obitelji proteina „uskih spojeva” (eng. *tight junctions*), ima ulogu u regulaciji paracelularne propusnosti epitela, posebno za vodu i male katione (Na^+) (VAN ITALLIE i ANDERSON, 2013.; ROSENTHAL i sur., 2010.). Ekspresija CLDN2 nije osobito izražena u epitelnim stanicama zdravog debelog crijeva, dok je taj protein pojačano eksprimiran u uskim spojevima epitelnih stanica kod ljudi s upalnom bolesti crijeva, kao i kod miševa s DSS-induciranim kolitisom, što se povezuje s povećanom propusnošću epitelne barijere crijeva (AHMAD i sur., 2014.; PRASAD i sur., 2005.). Delecija gena CLDN2 u miševa smanjuje transepitelnu vodljivost i paracelularnu permeabilnost za Na^+ (MUTO i sur., 2010.). Pojačana ekspresija CLDN2 povezana je s pojačanom proliferacijom epitelnih stanica, a time i s duljinom kripti (AHMAD i sur., 2014.), što korelira s povećanom paracelularnom permeabilnošću za Na^+ i otopljenu tvar FITC-dekstran (DHAWAN i sur., 2011.; MANKERTZ i sur., 2004.). Novije mehanističke studije na modelima kolitisom induciranih tumora debelog crijeva u miševa pokazuju da CLDN2 obnavlja sluznicu nakon lezije izazvane DSS-om aktivacijom signalnog puta PI3K/Bcl-2, što upućuje na mehanizam preživljavanja i proliferacije epitela (AHMAD i sur., 2014.; AHMAD i sur., 2023.).

Budući da je ekspresija CLDN2 povećana u epitelnim stanicama baze kripe, gdje nastaju nove epitelne stanice, još uvijek nije poznato sudjeluju li CLDN2-pozitivne stanice u proliferaciji i diferencijaciji epitelnih stanica nakon lezije uzrokovane upalnom bolesti crijeva.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

3.1. HIPOTEZA

Smatra se da postoje značajne razlike u dinamici upale, oštećenja, proliferacije, diferencijacije i regeneracije sekretornih i apsorptivnih epitelnih stanica između proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva u ženki i mužjaka miševa soja C57Bl/6N u modelu kolitisa izazvanog DSS-om s oporavkom. Također, pretpostavlja se da protein CLDN2 ima ulogu u regeneraciji i diferencijaciji sekretornih i apsorptivnih epitelnih stanica debelog crijeva u istom modelu i na istom soju miševa.

3.2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Opći cilj istraživanja jest istražiti procese upale, oštećenja i regeneracije epitela te proliferacije i diferencijacije sekretornih i apsorptivnih epitelnih stanica debelog crijeva u mišjem modelu akutnog kolitisa s oporavkom. Specifični ciljevi su usporediti rezultate histopatološkog ocjenjivanja težine upale, stupnja oštećenja i regeneracije epitelnog sloja sluznice debelog crijeva te morfometrijske analize tijekom dvotjednog oporavka nakon primjene DSS-a između negativne kontrolne skupine i skupina u kojima je kolitis induciran DSS-om. Također, cilj je usporediti rezultate histopatološkog ocjenjivanja težine upale, stupnja oštećenja i regeneracije epitelnog sloja sluznice debelog crijeva te morfometrijske analize tijekom dvotjednog oporavka nakon primjene DSS-a između ženki i mužjaka miševa soja C57Bl/6N na razini proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva. Drugi specifični cilj uključuje istraživanje dinamike proliferacije i diferencijacije sekretornih i apsorptivnih epitelnih stanica debelog crijeva između ženki i mužjaka miševa soja C57Bl/6N te između proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva u istom razdoblju. Posljednji cilj jest utvrditi ekspresiju CLDN2 u epitelnim stanicama sluznice debelog crijeva i usporediti je s dinamikom proliferacije matičnih, sekretornih i apsorptivnih progenitorskih stanica kako bi se analizirala uloga ovog proteina u diferencijaciji i regeneraciji epitela debelog crijeva nakon kolitisa izazvanog DSS-om.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

Eksperimenti su provedeni u tvrtki Selvita d.o.o., Zagreb, Hrvatska, u skladu s Direktivom Europske unije 2010/63/EU i nacionalnim zakonodavstvom (Narodne novine, 55/13), koje regulira korištenje laboratorijskih životinja u znanstvenim istraživanjima, pod nadzorom Institucijskog odbora za etiku istraživanja na životinjama (CARE-Zg). Uloženi su svi naponi kako bi se patnja životinja svela na najmanju moguću mjeru.

Korišteni su miševi soja C57BL/6 bez specifičnih patogena (eng. *specific pathogen-free*, SPF), kupljeni od Charles River Laboratories, Njemačka. Svi miševi bili su smješteni u konvencionalne polisulfonske kaveze (TECNIPLAST S.p.A., Buguggiate VA, Italija; tip III) s ozračenom steljom od kukuruzne krupice bez prašine za laboratorijske životinje (Scobis Due, Mucedola, Italija). Svaki kavez bio je obogaćen pamučnim materijalom za izradu gnijezda, papirnatim skloništem Des Res (Lillico Servicing Biotechnology, UK) i drvenim blokovima za glodanje (Bio-Serv, SAD). Kavezi su bili opskrbljeni peletiranom hranom s visokim udjelom masti za miševe (SDS VRF 1 (P), LBS Servicing Biotechnology, London, UK) i vodom *ad libitum* iz gradskog vodovoda (boce TECNIPLAST S.p.A., Buguggiate VA, Italija). Održavan je svjetlosni ciklus od 12 sati svjetla i 12 sati tame, a svi postupci na životinjama provedeni su tijekom razdoblja svjetla. Uvjeti u prostoriji bili su postavljeni na temperaturu od 22 ± 2 °C, relativnu vlažnost od 55 ± 10 % i 15 – 20 izmjena zraka na sat.

4.2. EKSPERIMENTALNI DIZAJN

Nakon tjedan dana aklimatizacije mužjaci i ženke miševa u dobi od 8 do 10 tjedana nasumično su raspoređeni u 10 skupina, s po 10 životinja u svakoj skupini. Kolitis je induciran primjenom DSS-a (MP Biomedicals, kat. br. 160110, 36 – 50 kDa) u koncentraciji od 1,7 %, otopljenog u vodi za piće koja je životinjama bila dostupna *ad libitum* tijekom prvih šest dana pokusa (D0 – D5). Ženke u skupinama 1., 2., 3. i 5. te mužjaci u skupinama 6., 7., 8. i 10. primali su DSS u vodi svakodnevno, dok su ženke u skupini 4. i mužjaci u skupini 9. primali isključivo vodu i služili kao negativne kontrole. Tjelesna masa miševa bilježena je svakodnevno tijekom faze primjene DSS-a te tijekom faze oporavka, sve do 16. dana od početka istraživanja, a rezultati su prikazani kao apsolutna i relativna tjelesna masa.

Životinje su selektivno žrtvovane u unaprijed definiranim vremenskim točkama, računajući od posljednje primjene DSS-a u vodi, kako slijedi: životinje iz skupina 1. i 6. žrtvovane su 1. dan (D1), iz skupina 2. i 7. 6. dan (D6), iz skupina 3. i 8. 11. dan (D11), dok su životinje iz skupina 4., 5., 9. i 10. žrtvovane 16. dan (D16). Miševi su u stanju kirurške anestezije eutanazirani intraperitonealnom primjenom kombinacije ketamina i ksilazina, nakon čega su im prerezane vratne krvne žile. Na miševima je učinjena nekropsija, a tkivo debelog crijeva uzorkovano je za daljnje histopatološke analize. Prilikom uzorkovanja crijeva su izmjerena i izvagana te su rezultati prikazani kao duljina (cm), masa (mg) i omjer mase i duljine debelog crijeva (mg/cm) (**Tablica 3**).

Tablica 3 Eksperimentalni dizajn

Grupe, spol i miševa, režim primjene vode/ DSS-a i dani terminalne procedure.

Grupe	Spol miševa	Režim primjene samo vode/ 1,7 % DSS-a u vodi	Dani terminalne procedure
1	Ženke	1,7 % DSS u vodi	D1
2			D6
3			D11
4		Samo voda	D16
5		1,7 % DSS u vodi	
6	Mužjaci	1,7 % DSS u vodi	D1
7			D6
8			D11
9		Samo voda	D16
10		1,7 % DSS u vodi	

Kratice: D - dan, DSS - eng. *dextran sulfate sodium*, (natrij dekstran sulfat)

4.3. PRIPREMA HISTOLOŠKIH UZORAKA DEBELOG CRIJEVA

Preparati debelog crijeva obojeni su standardnim histološkim bojenjem hemalaun-eozinom (H&E) te histokemijskom metodom Periodic acid-Schiff (PAS) reakcije radi histološke procjene. Dodatno, Alcian blue–Periodic acid-Schiff (AB-PAS) bojenje primijenjeno je za kvantifikaciju vrčastih stanica uz pomoć softvera za digitalnu patološku analizu. Isti preparati dodatno su imunohistokemijski obojeni na sljedeće biljege: Ki67, LGR5, CLDN2, ATOH1, CHGA, DCLK1, HES1, CA2 i pancitokeratin (eng. *pancytokeratin*, PAN-CK). Za praćenje dinamike proliferacije epitelnih stanica primijenjeno je imunohistokemijsko bojenje na Ki67, ekspresija matičnih stanica kripti debelog crijeva analizirana je imunohistokemijskim bojenjem na LGR5, dok je imunohistokemijsko bojenje na CLDN2 korišteno za procjenu njegove uloge u diferencijaciji i regeneraciji epitela u modelu akutnog kolitisa induciranog DSS-om. Progenitori sekretornih stanica detektirani su bojenjem na ATOH1, enteroendokrine stanice antitijelom na CHGA, a crijevne kemosenzorne stanice antitijelom na DCLK1. HES1 je korišten za detekciju progenitorskih apsorptivnih stanica, dok je CA2 primijenjen za identifikaciju zrelih apsorptivnih stanica imunohistokemijskim bojenjem. Za morfometrijsku analizu oštećenja epitela i posljedične reepitelizacije korišteno je antitijelo na PAN-CK.

Popis korištenih uređaja se nalazi u **tablici 4**, a popis korištenih kemikalija u **tablici 5**.

4.3.1. Popis uređaja i kemikalija

Tablica 4 Popis uređaja

Uređaj	Proizvođač
Tissue-Tek, AutoWrite Cassette	Sakura
Excelsior AS processor	Thermo Fisher Scientific
Histostar, Embedding Workstation	Thermo Fisher Scientific
Para Trimmer	Thermo Fisher Scientific
Microtome HM 450	Thermo Fisher Scientific
Gemini AS Automated slide stainer	Epredia
PT Link modul	DAKO
Autostainer Link48	DAKO
Cover Sliper	Thermo Fisher Scientific

Tablica 5 Popis kemikalija

Kemikalije	Proizvođač
Mayer's hemalaun solution, 1.09249.0500	Merck
Eosin Y-solution 0,5 % aqueous, 1.09844.1000	Merck
Periodic acid, 375810	Sigma Aldrich
Schiff's reagent, 1.09033.0500	Sigma Aldrich
Alcian Blue Solution, pH 2.5, 1.01647.0500	Sigma Aldrich
Target retrieval solution, S1699	Dako
Wash buffer (20x), K8007	Dako
Bloxall, SP-6000	Vector Laboratories
Normal horse serum, 2,5%,	Vector Laboratories
Recombinant Anti-Ki67 antibody [SP6], ab16667	Abcam
Anti-LGR5 antibody, ab219107	Abcam
Polyclonal Rabbit anti Human CLDN2 / Claudin 2 Antibody (C Terminus, IHC, IF, WB), LS C353133	LS-Bio
Polyclonal Rabbit anti-Human ATOH1 / MATH-1 Antibody (C-Terminus, IHC, WB, LS-B6529	LS-Bio
Anti-Chromogranin A antibody [EPR22537-249], ab254557	Abcam
DCLK1/DCAMKL1 (D2U3L) XP® Rabbit mAb, 62257	Cell Signaling Technologies
HES1 (D6P2U) Rabbit mAb, 11988	Cell Signaling Technologies
Anti-Carbonic anhydrase 2/CA2 antibody [EPR5195], ab124687	Abcam
Anti-wide spectrum Cytokeratin antibody, ab9377	Abcam
Impress HRP reagent peroxidase, anti-rabbit IgG	Vector Laboratories
Liquid DAB plus	Dako
ClearVue Mountant XYL,4212	Thermo Scientific

4.3.2. Fiksacija i uklapanje tkiva debelog crijeva

Tkivo debelog crijeva miša fiksirano je tijekom 24 sata u 10 %-tnom neutralno puferiranom formalinu (Shandon™ Formal-Fixx™ Neutral Buffered Formalin, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, SAD). Nakon toga tkivo je podijeljeno na četiri dijela označena brojevima od 1 do 4, pri čemu broj 1 označava najproksimalniji dio najbliži cekumu, a broj 4 najdistalniji dio debelog crijeva najbliži anusu, te je stavljeno u kazete za procesiranje tkiva (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, SAD). Svi uzorci podvrgnuti su dehidraciji i procesiranju kroz rastuće koncentracije alkohola i ksilena te uklapanju u parafinske blokove. Parafinski blokovi s uzorcima tkiva debelog crijeva rezani su na debljinu od 1 µm, a rezovi su preneseni na histološka stakalca.

4.3.3. Metode histokemijskog bojenja

Histološki preparati obojeni su metodama H&E, PAS i AB-PAS u uređaju za automatsko bojenje histoloških preparata (Gemini AS Automated Slide Stainer, EpreDia, SAD). Sve tri metode započinju istim postupkom deparafiniranja i hidracije stakalaca kroz niz ksilena i alkohola do vode.

Za bojenje metodom H&E sljedeći je korak uranjanje stakalaca u Mayerovu hemalaunsku otopinu (Mayer's hemalaun solution, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) tijekom pet minuta. Slijedi ispiranje u tekućoj vodi i diferencijacija u kiseloj vodi s dva brza urona, nakon čega se stakalca ponovno ispiru u tekućoj vodi. Nakon toga slijedi bojenje u eozinu (Eosin Y 0,5 % aqueous, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) tijekom pet minuta. Preparati se zatim kratko ispiru u destiliranoj vodi tijekom jedne minute. Nakon toga slijedi postupak dehidracije kroz serije alkohola: 96 %-tni etanol, potom 100 %-tni etanol te na kraju pročišćavanje u ksilenu. Nakon toga preparati su spremni za pokrivanje pokrovnim stakalcima u automatskom poklapaču (ClearVue Coverslipper, EpreDia, SAD).

Za PAS metodu bojenja preparati se nakon deparafiniranja uranjaju u periodičnu kiselinu (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka) tijekom sedam minuta. Nakon ispiranja u destiliranoj vodi slijedi bojenje u Schiffovu reagensu (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) tijekom 30 minuta. Preparati se zatim ispiru u otopini kalijeva metabisulfita (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) tri puta po dvije minute, a nakon toga ponovno se ispiru u destiliranoj vodi.

Slijedi kontrastno bojenje u Mayerovu hemalaunu (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) tijekom jedne minute, nakon čega se stakalca kratko diferenciraju s dva urona u kiseloj vodi i ispiru u tekućoj vodi. Postupak se završava dehidracijom i pokrivanjem stakalaca.

U AB-PAS metodi bojenja, nakon deparafiniranja preparati se uranjaju u otopinu Alcian blue tijekom 15 minuta, a zatim ispiru u tekućoj i destiliranoj vodi. Zatim slijedi oksidacija u periodičnoj kiselinu tijekom pet minuta, nakon čega se preparati ponovno ispiru u destiliranoj vodi tijekom pet minuta. Preparati se zatim boje u Schiffovu reagensu tijekom 15 minuta. Nakon toga ispiru se u otopini kalijeva metabisulfita tri puta po jednu minutu, a zatim u destiliranoj vodi. Kao i kod drugih metoda bojenja, postupak se završava dehidracijom i pokrivanjem stakalaca.

4.3.4. Metode imunohistokemijskog bojenja

Na kontrolnim stakalcima korišteno je tkivo tankog i debelog crijeva zdravih miševa radi provjere specifičnosti imunohistokemijskog signala. Testiranje na negativnim kontrolama provedeno je izostavljanjem primarnog antitijela te primjenom fosfatno puferirane fiziološke otopine (PBS) i izotipskog imunoglobulina G (IgG), dok je testiranje na pozitivnim kontrolama uključivalo tkiva s potvrđenom ekspresijom ciljanog antigena. Histološki preparati najprije su deparafinirani i rehidrirani kako bi se uklonio višak parafina, a tkivo postalo propusno za reagens. Sljedeći korak bila je obrada preparata kuhanjem na 95 °C (PT Link, Dako) u puferu određene pH-vrijednosti kako bi se razbile veze koje je formalin formirao maskirajući epitope. Kuhanjem su se te veze razbile, a antigeni izložili vezanju antitijela. Zatim su stakalca složena u nosače automatiziranog sustava za bojenje imunohistokemijskih preparata (Dako Autostainer Link48). Prvi korak tretmana stakalaca bila je primjena reagensa za blokiranje endogenih peroksidaza u tkivu kako bi se spriječio nastanak nespecifičnog signala. Sljedeći korak koji doprinosi blokiranju nespecifičnog signala bila je inkubacija stakalaca s 2,5 % normalnim konjskim serumom, koji sprječava vezanje antitijela na površine koje nisu ciljni antigen. Zatim je uslijedila inkubacija primarnim antitijelom zečjeg podrijetla koje se specifično vezalo na traženi antigen u tkivu. Ovisno o validiranom protokolu, primarna antitijela razrijeđena su u fosfatno puferiranoj fiziološkoj otopini (PBS) ili u 2,5 % normalnom konjskom serumu (2,5 % NHS) do validirane koncentracije. Korištena antitijela bila su: Ki67 (anti-Ki67, cat. no. ab16667, Abcam, UK, razrjeđenje 1:100), LGR5 (anti-LGR5, cat. no. ab219107, Abcam, UK, razrjeđenje 1:600), CLDN2 (anti-CLDN2, cat.

no. LS-C353133, Lifespan Biosciences, SAD, razrjeđenje 1:200), DCLK1 (anti-DCLK1, cat. no. 62257, Cell Signaling Technology, SAD, razrjeđenje 1:600), CA2 (anti-Carbonic anhydrase 2/CA2 [EPR5195], cat. no. ab124687, Abcam, UK, razrjeđenje 1:2000) i pancitokeratin (Anti-wide spectrum Cytokeratin, cat. no. ab9377, Abcam, UK, razrjeđenje 1:400), razrijeđena u PBS-u. Sljedeća antitijela bila su razrijeđena u 2,5 % NHS-u: ATOH1 (anti-ATOH1, cat. no. LS-B6529, Lifespan Biosciences, SAD, razrjeđenje 1:400), CHGA (anti-CHGA, cat. no. ab254557, Abcam, UK, razrjeđenje 1:15000) i HES1 (HES1 [D6P2U] Rabbit mAb, CST #11988, razrjeđenje 1:100) (**tablica 6**). Zatim je uslijedila inkubacija primarnim antitijelom zečjeg podrijetla koje se specifično vezalo na traženi antigen u tkivu. Na primarno antitijelo vezalo se sekundarno antitijelo obilježeno peroksidazom hrena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP), uzgojeno u konja protiv zečjih imunoglobulina. Završni korak u automatiziranom sustavu bila je primjena 3,3'-diaminobenzidina (DAB), koji je pod djelovanjem HRP-a stvorio smeđi talog na mjestu antigena. Nakon toga preparati su kontrastirani Mayerovom hemalaunskom otopinom (Mayer's hemalaun solution, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), dehidrirani i pokriveni pokrovnim stakalcem.

Tablica 6 Popis antitijela za imunohistokemijsko bojanje

Ime, proizvođač i razrjeđenje svakog antitijela korištenog u studiji.

Imunohistokemijsko bojanje	Ime antitijela i proizvođač	Razrjeđenje
IHC Ki67	Recombinant Anti-Ki67 antibody [SP6], ab16667	1:100 razrijeđeno u fosfatno puferiranoj fiziološkoj otopini
IHC LGR5	Anti-LGR5 antibody, ab219107	1:600 razrijeđeno u fosfatno puferiranoj fiziološkoj otopini
IHC CLDN2	Polyclonal Rabbit anti-Human CLDN2 / Claudin 2 Antibody (C-Terminus, IHC, IF, WB), LS-C353133	1:200 razrijeđeno u fosfatno puferiranoj fiziološkoj otopini
IHC ATOH1	Polyclonal Rabbit anti-Human ATOH1 / MATH-1 Antibody (C-Terminus, IHC, WB, LS-B6529)	1:400 razrijeđeno u 2,5 % normalnom konjskom serumu
IHC CHGA	Anti-Chromogranin A antibody [EPR22537-249], ab254557	1:15000 razrijeđeno u 2,5 % normalnom konjskom serumu
IHC DCLK1	DCLK1/DCAMKL1 (D2U3L) XP® Rabbit mAb, #62257	1:600 razrijeđeno u fosfatno puferiranoj fiziološkoj otopini
IHC HES1	HES1 (D6P2U) Rabbit mAb, CST #11988	1:100 razrijeđeno u 2,5 % normalnom konjskom serumu
IHC CA2	Anti-Carbonic anhydrase 2/CA2 antibody [EPR5195], ab124687	1:2000 razrijeđeno u fosfatno puferiranoj fiziološkoj otopini
IHC PAN-CK	Anti-wide spectrum Cytokeratin antibody, ab9377	1:400 razrijeđeno u fosfatno puferiranoj fiziološkoj otopini

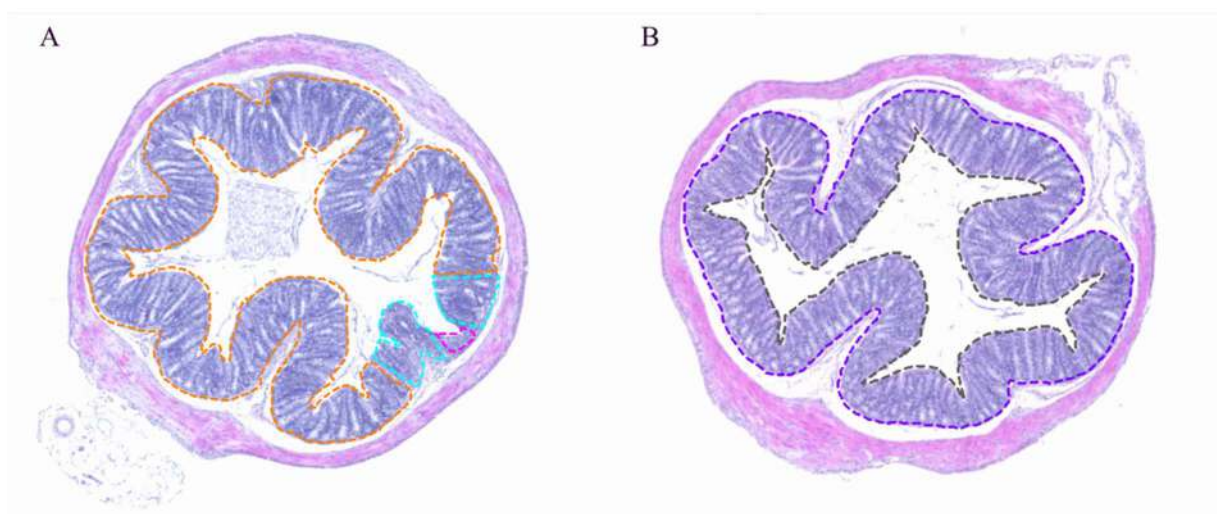
4.4. ANALIZA HISTOLOŠKIH UZORAKA DEBELOG CRIJEVA

H&E-, PAS- i AB-PAS-obojeni preparati debelog crijeva, kao i histološki uzorci imunohistokemijski obojani za PAN-CK, Ki67, LGR5, ATOH1, CHGA, DCLK1, HES1, CA2 i CLDN2, skenirani su u AxioScan.Z1 skeneru za slajdove (Zen softver, Zeiss, Njemačka). AB-PAS- i imunohistokemijski obojeni uzorci debelog crijeva obojeni na PAN-CK, Ki67, LGR5, ATOH1, CHGA, DCLK1, HES1, CA2 i CLDN2 analizirani su u softveru za digitalnu patologiju (Visiopharm, Danska).

4.4.1. Metoda histopatološkog ocjenjivanja

H&E bojenje korišteno je radi bolje vizualizacije upalnog infiltrata u uzorcima, dok je PAS bojenje primijenjeno za prikaz vrčastih stanica. Histopatološko ocjenjivanje na H&E i PAS-obojenim uzorcima analizirano je u četiri histopatološki-morfološki različita područja ili zone sluznice debelog crijeva miševa tretiranih DSS-om (**Slika 6**):

- a) zona erozije/ulkusa predstavlja aktivnu eroziju ili ulceraciju s upalom i nekrozom ili bez njih, bez prisutnog apikalnog epitelnog sloja, odnosno eroziju/ulkus u procesu cijeljenja s prisutnim apikalnim epitelnim slojem;
- b) zona displastične regeneracije obuhvaća područja vidljivih epitelnih promjena s obje strane erozije/ulkusa, kao što su epitelna hiperplazija i displazija, abnormalna arhitektura kripti te prisutnost upalnih stanica u lamina propriji, submukozi i pridruženom masnom tkivu;
- c) zona upaljene sluznice predstavlja upaljeno područje sluznice bez vidljivih epitelnih promjena, s prisutnim upalnim stanicama u lamina propriji, submukozi i pridruženom masnom tkivu, sa submukoznim edemom ili bez njega;
- d) zona vidljivo neoštećene sluznice predstavlja vidljivo netaknutu sluznicu bez upale i epitelnih promjena.



Slika 6 Metoda histopatološkog ocjenjivanja na uzorcima debelog crijeva miša, H&E

A) Ružičasta boja označava zonu erozije/ulkusa, tirkizna boja označava zonu displastične regeneracije, a narančasta boja zonu upaljene sluznice u tkivu debelog crijeva miša. B) Ljubičasta boja označava zonu vidljivo neoštećene sluznice.

Slika prikazana pri digitalnom povećanju 1×, Zen softver, Zeiss. Skala: 500 µm.

Ozbiljnost i stupanj upale te oštećenja epitela u uzorcima debelog crijeva procijenjeni su primjenom modificirane metode histopatološkog ocjenjivanja, sastavljene prema metodama opisanima u literaturi korištenoj u kliničkim i translacijskim istraživanjima (NISHITANI i sur., 2009.; DIELEMAN i sur., 1998.; LAROUX i sur., 2004.; SANN i sur., 2013.), zasebno za proksimalni i distalni dio debelog crijeva te za svaku zonu. Minimalni i maksimalni zbroj histopatološkog bodovanja iznosio je 5 odnosno 29 za zonu erozije/ulkusa (**tablica 7**), 5 odnosno 23 za zonu displastične regeneracije (**tablica 8**), 2 odnosno 11 za zonu upaljene sluznice (**tablica 9**), dok je za zonu vidljivo neoštećene sluznice i negativnu kontrolnu skupinu raspon bodova iznosio od 7 do 35 (**tablica 10**).

Tablica 7 Histopatološko ocjenjivanje zone erozije/ulkusa debelog crijeva miševa nakon primjene DSS-a

Ocjena	Ozbiljnost upale	Stupanj upale	Stupanj oštećenja	Opseg oštećenja	Reepitelizacija
1	Nema upale	Nema upale	Nema promjena	Nema promjena	100%
2	Jako blaga/nekoliko upalnih stanica	Mukoza	Poremećaj arhitekture lamine proprije	Fokalno oštećenje na jednom segmentu debelog crijeva	75 - 99%
3	Blaga	Submukoza	Oštećen epitel s intaktnom laminom proprijom	Višestruka oštećenja na jednom segmentu debelog crijeva	50 - 75%
4	Blaga do umjerena	Transmuralna	Erozija	Multifokalna oštećenja na jednom ili više segmenata debelog crijeva	25 - 50%
5	Umjerena	/	Duboka erozija s intaktnim <i>muscularis mucosae</i>	Veliko oštećenje na jednom segmentu debelog crijeva	1 - 25%
6	Umjerena do jaka	/	Ulkus sa ili bez nekroze	Difuzno oštećenje na dva ili više segmenata debelog crijeva	Nema reepitelizacije
7	Jaka	/	/	/	/

Tablica 8 Histopatološko ocjenjivanje zone displastične regeneracije debelog crijeva miševa nakon primjene DSS-a

Ocjena	Ozbiljnost upale	Stupanj upale	Reaktivna epitelna hiperplazija	Epitelna displazija	Abnormalna arhitektura kripti
1	Nema upale	Nema upale	Nema promjena	Nema promjena	Nema promjena
2	Jako blaga/nekoliko upalnih stanica	Mukoza	Prisutnost mitoze izvan zone matičnih stanica	Displazija niskog stupnja	Elongacija kripti
3	Blaga	Submukoza	"Nazubljeni" epitel	Displazija visokog stupnja	Distorzija kripti
4	Blaga do umjerena	Transmuralna	Polipi	/	Grananje kripti
5	Umjerena	/	/	/	„Back to back“ kripe
6	Umjerena do jaka	/	/	/	/
7	Jaka	/	/	/	/

Tablica 9 Histopatološko ocjenjivanje zone upaljene sluznice debelog crijeva miševa nakon primjene DSS-a

Ocjena	Ozbiljnost upale	Opseg upale
1	Nema upale	Nema upale
2	Jako blaga/nekoliko upalnih stanica	Mukoza
3	Blaga	Submukoza
4	Blaga do umjerena	Transmuralna
5	Umjerena	/
6	Umjerena do jaka	/
7	Jaka	/

Tablica 10 Histopatološko ocjenjivanje zone vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva miševa nakon primjene DSS-a

Ocjena	Ozbiljnost upale	Opseg upale	Stupanj oštećenja	Opseg oštećenja	Reaktivna epitelna hiperplazija	Epitelna displazija	Abnormalna arhitektura kripti
1	Nema upale	Nema upale	Neoštećen epitel	Neoštećen epitel	Nema promjena	Nema promjena	Nema promjena
2	Jako blaga/nekoliko upalnih stanica	Mukoza	Poremećaj arhitekture lamine proprije	Fokalno oštećenje na jednom segmentu debelog crijeva	Prisutnost mitoz izvan zone matičnih stanica	Displazija niskog stupnja	Elongacija kripti
3	Blaga	Submukoza	Oštećen epitel s intaktnom laminom proprijom	Više od jednog oštećenja na jednom segmentu debelog crijeva	"Nazubljeni" epitel	Displazija visokog stupnja	Distorzija kripti
4	Blaga do umjerena	Transmuralna	Erozija	Multifokalna oštećenja na jednom ili više segmenata debelog crijeva	Polipi	/	Grananje kripti
5	Umjerena	/	Duboka erozija s intaktnim muscularis mucosae	Veliko oštećenje na jednom segmentu debelog crijeva	/	/	„Back to back“ kripti
6	Umjerena do jaka	/	Ulkus sa ili bez nekroze	Difuzno oštećenje na dva ili više segmenata debelog crijeva	/	/	/
7	Jaka	/	/	/	/	/	/

4.4.2. Metoda digitalne patološke analize

Sluznica debelog crijeva miševa u negativnoj kontrolnoj skupini analizirana je u cijelosti i označena kao zdrava kontrola. Histološki uzorci debelog crijeva imunohistokemijski obojani na Ki67, LGR5, ATOH1, CHGA, DCLK1, HES1, CA2 i CLDN2, kao i histokemijski obojeni metodom AB-PAS, iz tkiva miševa u kojih je primijenjen DSS, analizirani su u tri histopatološko-morfološki različita područja sluznice (**Slika 7**):

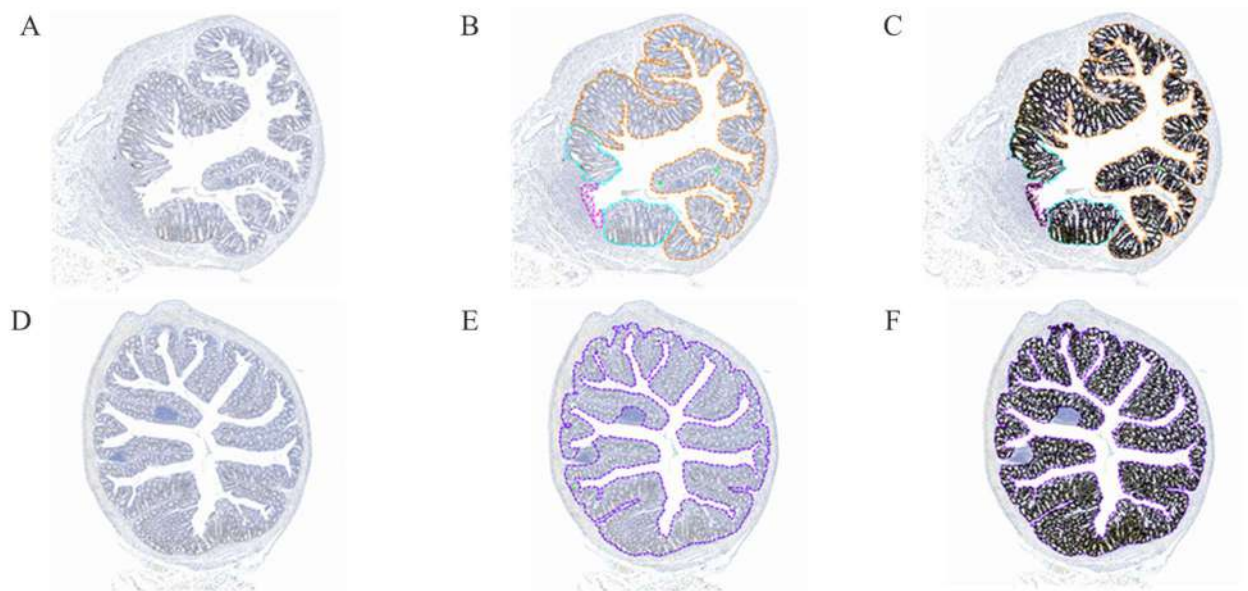
a) zona displastične regeneracije, gdje su vidljive epitelne promjene s obje strane erozije/ulkusa, kao što su epitelna hiperplazija i displazija, abnormalna arhitektura kripti te prisutnost upalnih stanica u lamina propriji, submukozi i pridruženom masnom tkivu;

b) zona upaljene sluznice, koja predstavlja upaljeno područje sluznice bez vidljivih epitelnih promjena, s prisutnim upalnim stanicama u lamina propriji, submukozi i pridruženom masnom tkivu, sa submukoznim edemom ili bez njega;

c) zona vidljivo neoštećene sluznice, koja predstavlja vidljivo netaknutu sluznicu bez upale i epitelnih promjena.

Proksimalni i distalni segmenti debelog crijeva označeni su zasebno te je korištena aplikacija za prepoznavanje tkiva. Sloj sluznice debelog crijeva, uključujući epitel, označen je kao područje analize, dok su zbog ograničenja softvera za digitalnu patologiju mala područja lamine proprije debelog crijeva smještena između kripti dodatno definirana i analizirana kao regije od interesa (eng. *regions of interest*, ROI). Dijelovi crijeva s oštećenim epitelom, ulkusi, crijevni lumen sa sadržajem, submukoza, unutarnji i vanjski mišićni sloj, seroza, periintestinalno masno tkivo i pozadina isključeni su iz analize. U uzorcima imunohistokemijski obojenima na LGR5 i Ki67 uočene su pojedinačne pozitivne stanice u lamini propriji koje, zbog slabijeg intenziteta bojenja, nisu bile uključene u kvantifikaciju digitalnom analizom. U pojedinim uzorcima debelog crijeva iz skupina s DSS-om izazvanim kolitisom, zbog opsežnih lezija i oštećenja sluznice, nije bilo moguće identificirati zonu potpuno očuvane sluznice. Nakon ručne korekcije korištena je aplikacija za kvantifikaciju pozitivnih stanica, odnosno pozitivne površine. Rezultati su izraženi kao broj Ki67-, LGR5-, ATOH1-, DCLK1- i HES1-pozitivnih stanica na mm² površine sluznice

te kao AB-PAS-, CHGA-, CA2- i CLDN2-pozitivna površina na mm² površine sluznice debelog crijeva.



Slika 7 Metoda digitalne patološke analize uzoraka debelog crijeva miša, IHC Ki67

A)-C): Debelo crijevo miša s DSS-om izazvanim kolitisom. Slike D) – F): Debelo crijevo miša negativne kontrole. A) i D) Reprezentativni primjeri imunohistokemijskog bojenja na Ki67 u debelom crijevu miša. B) i E) Označena područja analize za zonu displastične regeneracije, zonu upaljene sluznice i zonu vidljivo neoštećene sluznice. C) i F) Označene Ki67-pozitivne i negativne stanice unutar pojedinih zona sluznice debelog crijeva miša.

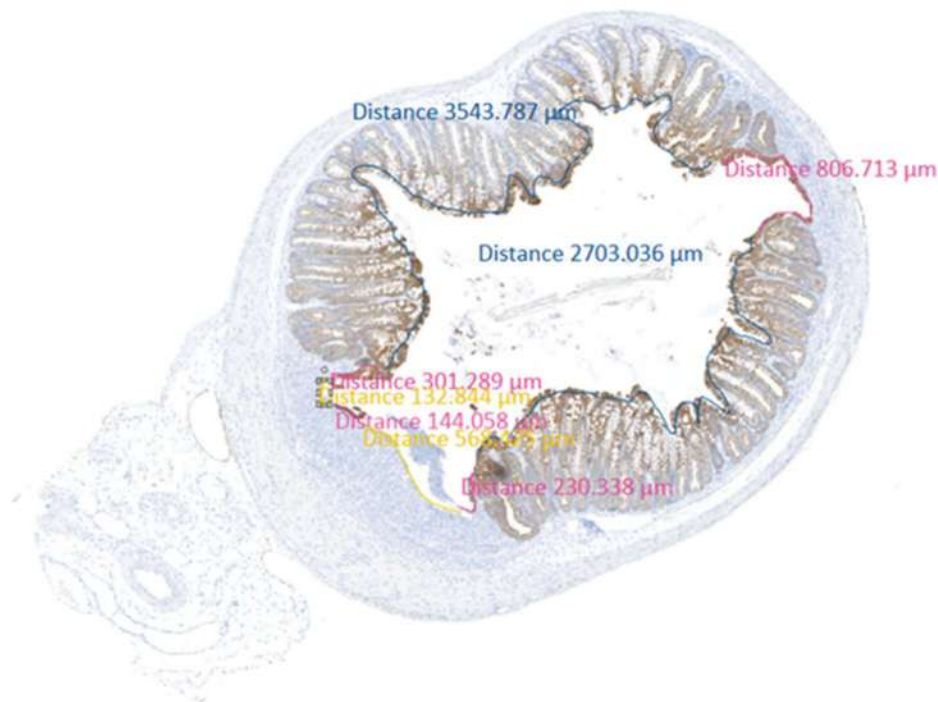
Slika prikazana pri digitalnom povećanju 1x, Zen softver, Zeiss. Skala: 500 µm.

Tirkizna boja – zona regeneracije, narančasta boja – zona upaljene sluznice, ljubičasta boja – zona vidljivo neoštećene sluznice.

4.4.3. Metoda morfometrijske analize oštećenja epitela i reepitelizacije

Histološki uzorci debelog crijeva imunohistokemijski obojeni na PAN-CK skenirani su u AxioScan.Z1 skeneru za histološka stakalca (Zeiss, Njemačka). Obojeni uzorci analizirani su s pomoću softvera za analizu histoloških preparata Zen (Zeiss, Njemačka) (slika 9). Epitel je pri analizi podijeljen na tri segmenta: neoštećeni epitel, epitel oštećen erozijom ili ulkusom te novoformirani epitel u fazi reepitelizacije. Duljine epitela određene su zasebno za proksimalni i

distalni dio debelog crijeva, izražene u mikrometrima i zbrojene unutar svakog segmenta debelog crijeva. Postotak ulceriranog epitela izračunat je u odnosu na ukupnu duljinu epitela debelog crijeva, dok je postotak reepiteliziranog epitela izražen u odnosu na ukupnu duljinu ulceriranog epitela. Duljina sluznice debelog crijeva miševa u negativnoj kontrolnoj skupini također je izmjerena i označena kao zdrava kontrola.



Slika 8 Metoda morfometrijske analize oštećenja epitela i reepitelizacije debelog crijeva, IHC PAN-CK

Proksimalni dio debelog crijeva nakon kolitisa izazvanog primjenom DSS-a u vodi za piće.

Slika prikazana pri digitalnom povećanju 1x, Zen softver, Zeiss. Skala: 500 µm.

Plava boja – neoštećeni epitel debelog crijeva; žuta boja – epitel debelog crijeva oštećen erozijom/ulkusom; ružičasta boja – reepitelizirani sloj epitela debelog crijeva.

Duljina ili udaljenost (*eng. distance*) izražena u mikrometrima (µm).

4.5. REPREZENTATIVNE HISTOLOŠKE SLIKE

Slike su dobivene s pomoću softvera za analizu histoloških preparata Zen (Zeiss, Njemačka) i prikazane pri digitalnim povećanjima 1x, 2,5x, 5x, 10x i 20x (prikaz povećanja (*zoom* prikaz), što automatski daje odgovarajuću mjernu skalu prikazanu u **tablici 11**. Mjerne skale prikazane na slikama automatski su generirane u Zen softveru na temelju kalibracije mikroskopskog sustava.

Tablica 11 Prikaz povećanja u Zen softveru s mjernom skalom (μm)

Prikaz povećanja u Zen softveru	Mjerna skala
1x	500 μm
2.5x	200 μm
5x	200 μm
10x	100 μm
20x	50 μm

Kratice: μm - mikrometar

4.6. STATISTIČKA ANALIZA

Za obradu podataka korišten je Microsoft Office Excel. Sve statističke analize provedene su s pomoću softvera GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, SAD). Svi rezultati izraženi su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom. Razlike između skupina smatrane su statistički značajnima kada je $p < 0,05$.

4.6.1. Statistička analiza *in vivo* rezultata

Rezultati apsolutne i relativne tjelesne mase miševa analizirani su primjenom modela miješanih učinaka (REML) uz Tukeyev test višestrukih usporedbi. Duljina, masa te omjer mase i duljine debelog crijeva, kao i postotak zahvaćenosti pojedinih zona debelog crijeva u ženki i mužjaka, analizirani su dvofaktorskom analizom varijance uz Šidákov test višestrukih usporedbi. Parametri duljine, mase te omjera mase i duljine uspoređeni su s negativnom kontrolnom skupinom, dok je postotak zahvaćenosti pojedinih zona debelog crijeva uspoređen s odgovarajućim zonama na vremenskoj točki D1.

4.6.2. Statistička analiza rezultata histopatološkog ocjenjivanja

Evaluacija rezultata histopatološkog ocjenjivanja provedena je primjenom modela miješanih učinaka (REML) sa Šidákovim testom višestrukih usporedbi kada su se uspoređivale ženke i mužjaci unutar istih razdoblja, dok je za usporedbu negativne kontrolne skupine sa skupinama u kojima je primijenjen DSS primijenjen isti statistički pristup, ali s Dunnettovim testom višestrukih usporedbi.

4.6.3. Statistička analiza rezultata dobivenih digitalnim patološkim softverom

Rezultati analize digitalnim patološkim softverom analizirani su primjenom dvofaktorske analize varijance sa Šidákovim testom višestrukih usporedbi, pri čemu su se uspoređivale ženke i mužjaci unutar istih razdoblja te negativna kontrolna skupina sa skupinama u kojima je primijenjen DSS. Pearsonova korelacija u softveru GraphPad Prism korištena je za međusobnu usporedbu podataka dobivenih softverom za digitalnu patologiju. Izraženi su p-vrijednost i koeficijent korelacije r , pri čemu su se razlike između skupina smatrale statistički značajnima kada je $p <$

0,05. U rezultatima su prikazane tablice s vrijednostima r , dok je jakost korelacije prikazana prema literaturi (EVANS, 1996).

4.6.4. Statistička analiza rezultata dobivenih morfometrijom

Analiza reepitelizacije provedena je isključivo unutar DSS-tretiranih skupina, pri čemu su sve vremenske točke uspoređene s D1, odnosno s prvom vremenskom točkom nakon prestanka primjene DSS-a.

Postotak ulcerirane površine izračunat je kao omjer duljine ulceriranog epitela i ukupne analizirane duljine sluznice, izražen u postocima. U negativnoj kontrolnoj skupini nije zabilježena ulceracija (0 % u svih analiziranih jedinki), a te su vrijednosti uključene u statističku analizu kao stvarne izmjerene vrijednosti. Postotak reepitelizacije izračunat je kao omjer duljine reepiteliziranog epitela i ukupne duljine ulcerirane površine, izražen u postocima. Budući da u negativnoj kontrolnoj skupini nije bilo ulceracija, proces reepitelizacije nije bio primjenjiv te ta skupina nije uključena u statističku analizu parametra reepitelizacije.

5. REZULTATI

5.1. *IN VIVO* REZULTATI

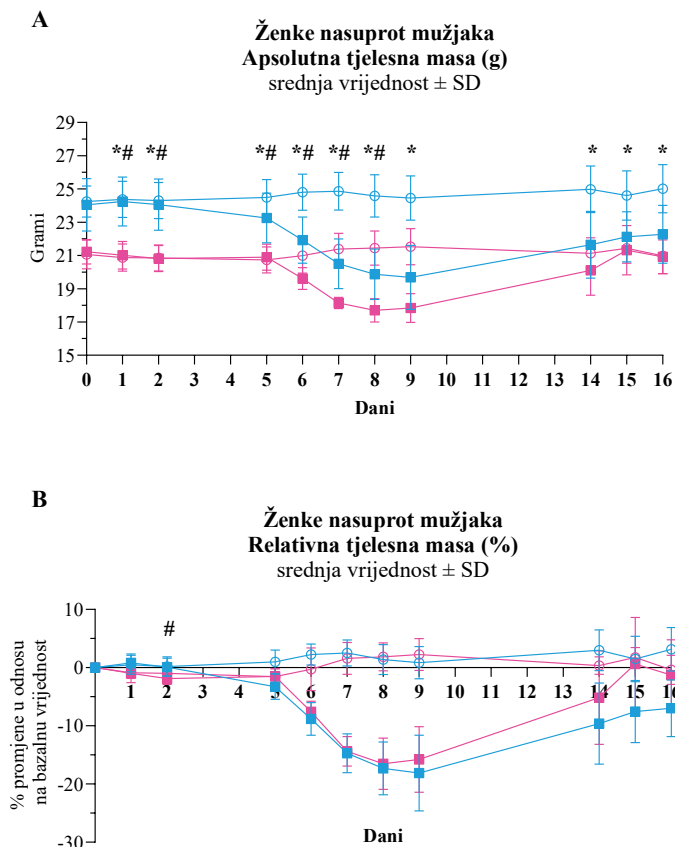
5.1.1. Uginuća životinja tijekom studije

Dvanaestog dana od početka studije uginula su dva mužjaka miša: miš broj 31 iz skupine 8 te miš broj 44 iz skupine 10.

5.1.2. Apsolutna i relativna tjelesna masa životinja

Tijekom *in vivo* faze studije bilježene su tjelesne mase životinja, a rezultati su prikazani kao apsolutna i relativna tjelesna masa ženki i mužjaka.

Ženke i mužjaci miševa gubili su tjelesnu masu nakon izazivanja kolitisa DSS-om, a ženke su se, za razliku od mužjaka, vratile na svoju početnu tjelesnu masu do 16. dana nakon primjene DSS-a, što je vidljivo iz promjena apsolutne i relativne tjelesne mase (**slika 9**).



Slika 9 Apsolutna i relativna tjelesna masa miševa

A) Apsolutna tjelesna masa. B) Relativna tjelesna masa. Srednje vrijednosti tjelesne mase miševa pojedinih skupina za svaki dan eksperimenta prikazane su na grafikonu. Srednja vrijednost svake skupine na naznačeni dan uspoređena je na sljedeći način:

* $p < 0,05$ nasuprot ženka u negativnoj kontroli. # $p < 0,05$ nasuprot ženka u skupini nakon posljednje primjene 1,7 % DSS-a, analiza miješanih učinaka s Tukeyevim testom višestrukih usporedbi.

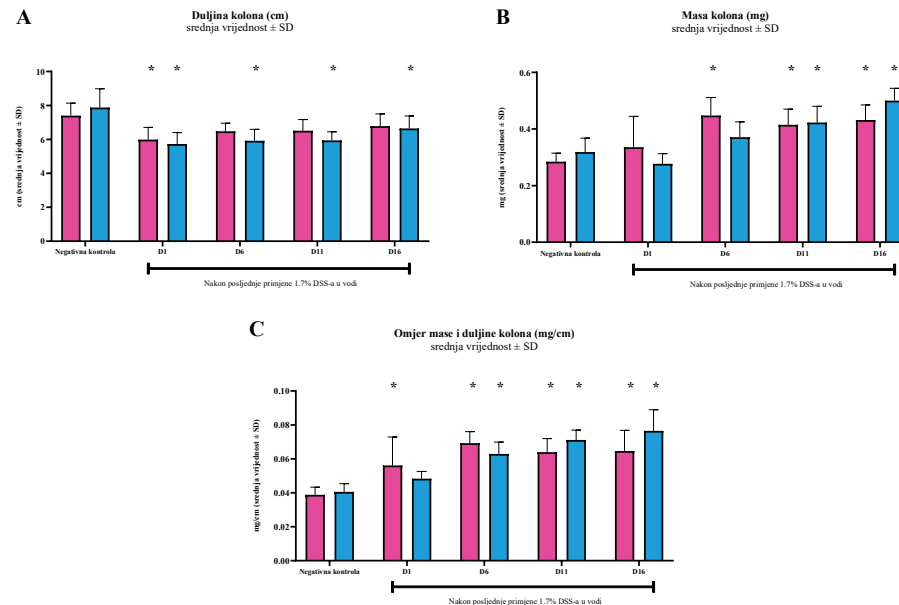
Prazan ružičasti krug – negativna kontrola ženki, prazan plavi krug – negativna kontrola mužjaka, puni ružičasti kvadrat – skupina ženki nakon posljednje primjene 1,7 % DSS-a, puni plavi krug – skupina mužjaka nakon posljednje primjene 1,7 % DSS-a.

Kratice: Ž – ženke, M – mužjaci, SD – standardna devijacija, D – dan, DSS – eng. dextran sulfate sodium (natrij dekstran sulfat)

5.1.3. Duljina, masa, omjer mase i duljine debelog crijeva

Nakon žrtvovanja miševa u svakom su ispitanom razdoblju bilježene masa i duljina debelog crijeva, a rezultati su prikazani kao masa, duljina te omjer mase i duljine debelog crijeva ženki i mužjaka.

Nije utvrđena značajna razlika u duljini debelog crijeva između ženki i mužjaka ni u jednom ispitanom vremenskom intervalu. Nakon prestanka primjene DSS-a debela crijeva značajno su se skratila kod mužjaka miševa u svim analiziranim vremenskim točkama (D1, D6, D11 i D16), dok je kod ženki značajna razlika uočena samo na D1 u usporedbi s pripadajućom negativnom kontrolom. U pogledu mase debelog crijeva nije utvrđena značajna razlika između ženki i mužjaka ni u jednom ispitanom vremenskom intervalu. Međutim, masa debelog crijeva značajno je veća kod ženki u vremenskim točkama D6, D11 i D16 u odnosu na odgovarajuću negativnu kontrolu, dok se kod mužjaka takva razlika bilježi samo u posljednje dvije vremenske točke, D11 i D16. Analiza omjera mase i duljine debelog crijeva također ne pokazuje značajne razlike između spolova ni u jednom ispitanom vremenskom intervalu. Suprotno tome, nakon prestanka primjene DSS-a omjer mase i duljine debelog crijeva značajno je povećan kod ženki u svim vremenskim točkama (D1, D6, D11 i D16), dok je kod mužjaka značajna razlika prisutna samo na D6, D11 i D16 u usporedbi s pripadajućom negativnom kontrolnom skupinom (**slika 10**).



Slika 10 Duljina, masa, omjer mase i duljine debelog crijeva miševa

A) Duljina debelog crijeva. B) Masa debelog crijeva. C) Omjer mase i duljine debelog crijeva. Srednje vrijednosti duljine debelog crijeva, mase debelog crijeva i omjera mase i duljine debelog crijeva pojedinih skupina za svaki dan eksperimenta prikazane su na grafikonu. Srednja vrijednost svake skupine na naznačeni dan uspoređena je na sljedeći način:

* $p < 0,05$ nasuprot pripadajućem spolu u negativnoj kontroli. # $p < 0,05$ nasuprot ženka u skupini nakon posljednje primjene 1,7 % DSS-a, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

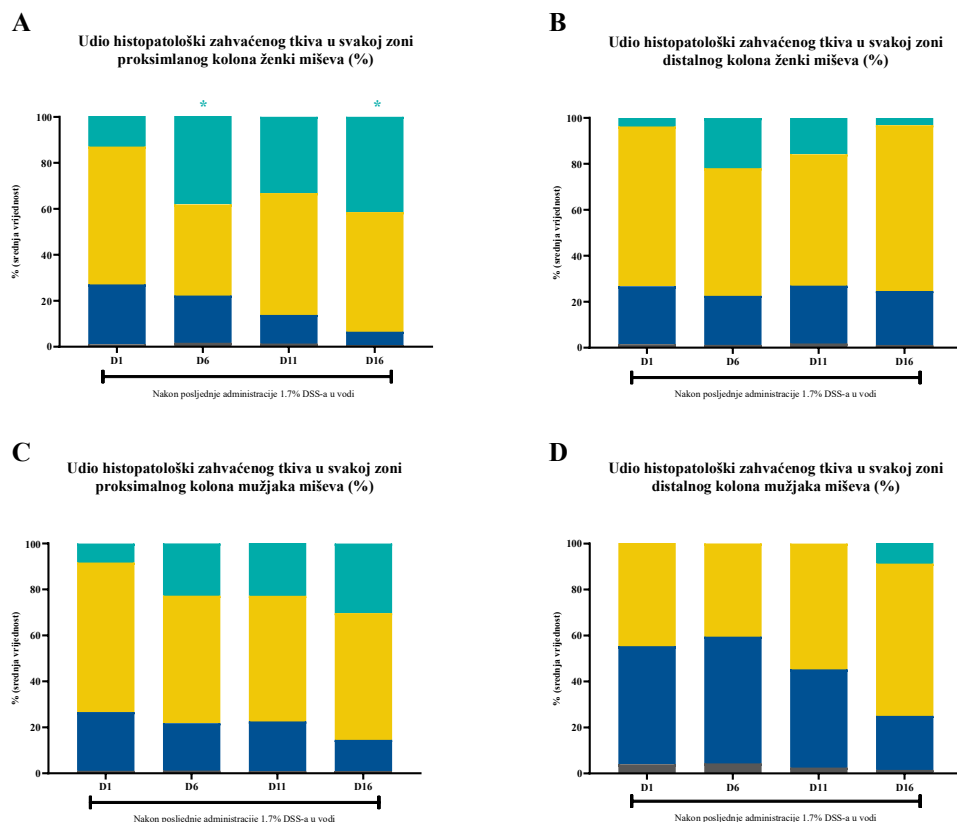
Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

Kratice: SD – standardna devijacija, D – dan, DSS – dextran sulfat sodium (natrij dekstran sulfat).

5.2. HISTOPATOLOŠKE ZONE DEBELOG CRIJEVA NAKON PRIMJENE DSS-A

U proksimalnom debelom crijevu ženki zabilježen je značajno veći udio zona vidljivo neoštećene sluznice na D6 i D16 nakon posljednje primjene DSS-a u usporedbi s D1. U istom segmentu debelog crijeva uočen je manji udio displastične regeneracije tijekom svih promatranih vremenskih točaka, no ta razlika nije bila statistički značajna u odnosu na D1. U distalnom debelom crijevu ženki udio displastične regeneracije ostao je ujednačen od početka do kraja promatranog razdoblja, dok se udio zona vidljivo neoštećene sluznice povećavao na D6 i D11, da bi se na posljednjem promatranom danu ponovno smanjio.

Kod mužjaka je u proksimalnom debelom crijevu uočen trend povećanja udjela zona vidljivo neoštećene sluznice u razdoblju D6 – D16 nakon posljednje primjene DSS-a u usporedbi s D1. Udio zone upaljene sluznice ostao je ujednačen tijekom svih promatranih vremenskih točaka, dok je udio zone displastične regeneracije pokazivao tendenciju smanjenja, bez postizanja statističke značajnosti. U distalnom debelom crijevu mužjaka zona vidljivo neoštećene sluznice nije bila prisutna u razdoblju D1 – D11, dok je zona displastične regeneracije zauzimala više od 50 % ukupne površine debelog crijeva na D1 te se postupno smanjivala tijekom vremena (**slika 11**).



Slika 11 Histopatološki udio pojedinih zona u proksimalnom i distalnom dijelu debelog crijeva ženki i mužjaka

A) Proksimalno debelo crijevo ženki. B) Distalno debelo crijevo ženki. C) Proksimalno debelo crijevo mužjaka. D) Distalno debelo crijevo mužjaka.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj skupini na D1, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi.

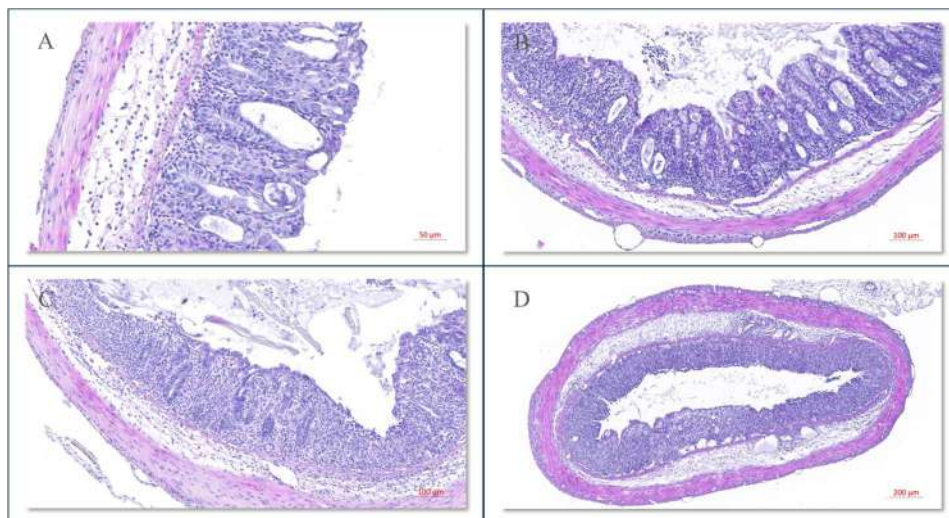
Tamnosiva boja – udio zona erozije/ulkusa, tamnoplava boja – udio displastične regeneracije, žuta boja – udio upaljene sluznice i tirkizna boja – udio vidljivo neoštećene sluznice u DSS-izazvanom kolitisu u vremenskom razdoblju od 1, 6, 11 i 16 dana nakon posljednje primjene DSS-a u vodi za piće.

Kratice: D – dan, DSS – eng. *dextran sulfate sodium* (natrij dekstran sulfat)

5.3. HISTOPATOLOŠKE PROMJENE U DEBELOM CRIJEVU NAKON PRIMJENE DSS-A

5.3.1. Histopatološke promjene na D1 nakon posljednje primjene DSS-a

Histopatološke promjene u debelom crijevu uočene prvog dana nakon prestanka primjene DSS-a uključivale su bazalnu limfoplazmocitozu i razvoj difuzne upale u lamini proprijji, koja se sastoji od neutrofila, limfocita i plazma-stanica, te multifokalne lezije sluznice, erozije i nekroze sluznice sa stvaranjem ulkusa, dilataciju i/ili gubitak kripti, hiperproliferaciju epitela te displaziju epitela niskog stupnja. U submukozi su učestali edem, blaga upalna reakcija te reaktivne promjene limfnog tkiva povezanog sa sluznicom (eng. *mucosa-associated lymphoid tissue* - MALT) (slika 12).



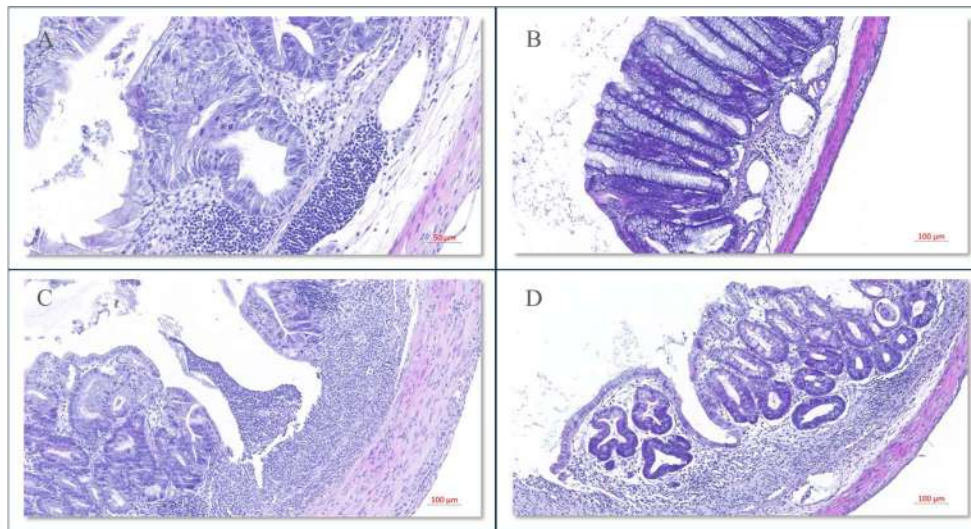
Slika 12 Histopatološke promjene u debelom crijevu na D1 nakon posljednje primjene DSS-a

A) Submukozni edem, bazalna limfoplazmocitoza i dilatacija kripti u distalnom debelom crijevu ženki (povećanje 20x). B) Upala, submukozni edem, dilatacija i gubitak kripti u distalnom debelom crijevu mužjaka (povećanje 10x). C) Upala, submukozni edem i gubitak kripti u proksimalnom debelom crijevu ženki (povećanje 10x). D) Submukozni edem, upala i gubitak kripti u distalnom debelom crijevu mužjaka (povećanje 2,5 x).

Slika prikazana pri digitalnom povećanju, Zen softver, Zeiss. Mjerna skala: 500 μm (1x), 200 μm (2,5x i 5x), 100 μm (10x) i 50 μm (20x).

5.3.2. Histopatološke promjene na D6 nakon posljednje primjene DSS-a

Šestog dana oporavka od DSS-a zamijećeno je povećanje površine sluznice zahvaćene ulceracijama, širenje upale, dilatacija limfnih žila u submukozi te promjene epitela: izražena prisutnost mitoze i posljedična elongacija kripti, stvaranje polipoznih tvorbi, a u području uz ulkus distorzija kripti, gubitak vrčastih stanica unutar kripti i blaga displazija epitela. Vidljiv je početak formiranja novog epitela iznad erozija/ulkusa, odnosno reepitelizacije (**slika 13**).



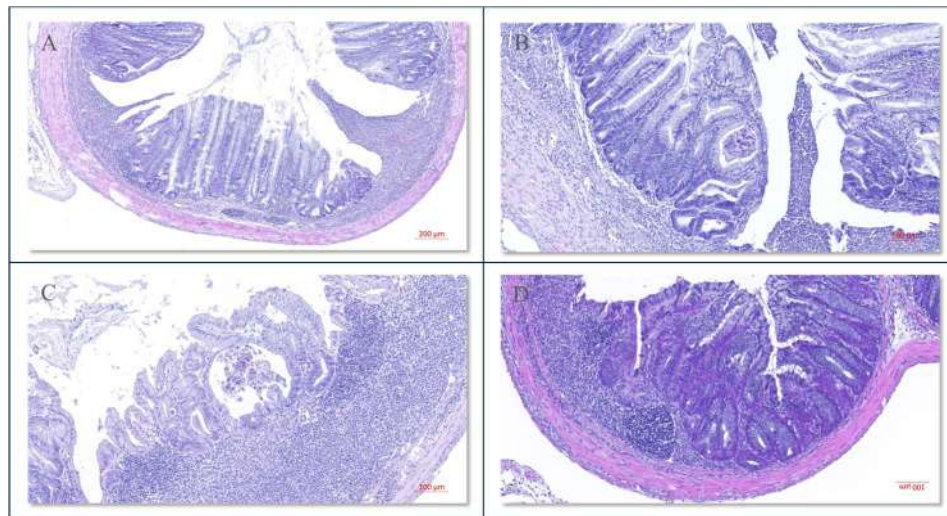
Slika 13 Histopatološke promjene u debelom crijevu na D6 nakon posljednje primjene DSS-a

A) Mitoze, submukozni edem i bazalna limfoplazmocitoza u distalnom debelom crijevu ženki (povećanje 20x). B) Submukozni edem i dilatacija krvnih žila u submukozi distalnog debelog crijeva mužjaka (povećanje 5x). C) Ulkus s nekrozom u proksimalnom debelom crijevu ženki (povećanje 5x). D) Displazija epitela kripti u proksimalnom debelom crijevu mužjaka (povećanje 2,5x).

Slika prikazana pri digitalnom povećanju, Zen softver, Zeiss. Mjerna skala: 500 μm (1x), 200 μm (2,5x i 5x), 100 μm (10x) i 50 μm (20x).

5.3.3. Histopatološke promjene na D11 nakon posljednje primjene DSS-a

Na idućem, 11. danu nakon prestanka primjene DSS-a u debelom crijevu mogu se primijetiti: „nazubljeni” epitel, gubitak vrčastih stanica u područjima uz leziju te hiperproliferacija istih stanica u području upaljene sluznice, stvaranje novih limfnih folikula, reepitelizacija erozija i manjih ulkusa, aberantna regeneracija kripti, „back to back”, pupanje i grananje kripti te kriptalni apscesi (slika 14).



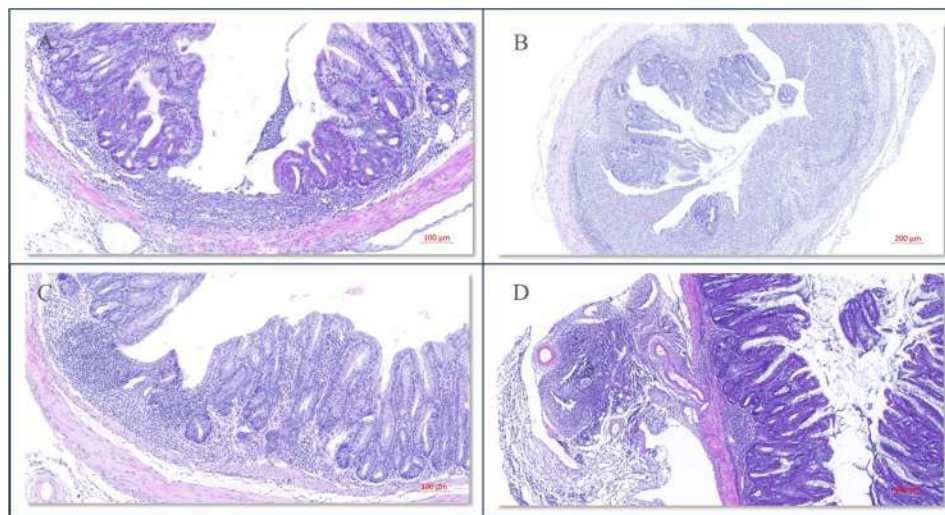
Slika 14 Histopatološke promjene u debelom crijevu na D11 nakon posljednje primjene DSS-a

A) Ulceracije s nekrozom, hiperproliferacija kripti epitela, displastične promjene u vidu „back to back“ kripti u distalnom debelom crijevu ženki (povećanje 2,5x). B) Kriptalni apsces u proksimalnom debelom crijevu mužjaka (povećanje 10x). C) Kriptalni apsces unutar polipozne tvorbe u distalnom debelom crijevu ženki (povećanje 10x). D) Tercijarno limfno tkivo u distalnom debelom crijevu mužjaka (povećanje 10x).

Slika prikazana pri digitalnom povećanju, Zen softver, Zeiss. Mjerna skala: 500 µm (1x), 200 µm (2,5x i 5x), 100 µm (10x) i 50 µm (20x).

5.3.4. Histopatološke promjene na D16 nakon posljednje primjene DSS-a

Na posljednjem, 16. danu, u kojem su proučavane promjene na debelom crijevu, primijećene su iduće promjene: u području većih ulkusa širenje upale u okolno masno tkivo, dilatacija limfnih žila u submukozi, početak fibrotičnih promjena na mjestu lezija te fibroza pripadajućeg masnog tkiva i displazija visokog stupnja (**slika 15**).

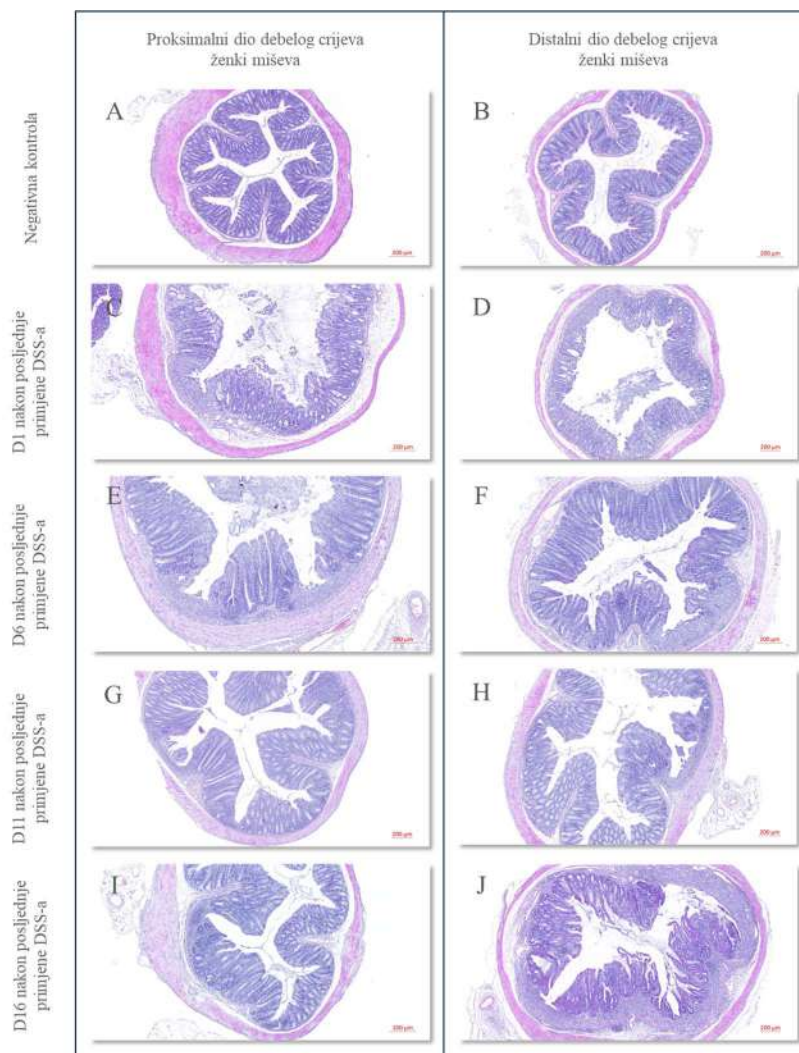


Slika 15 Histopatološke promjene u debelom crijevu na D16 nakon posljednje primjene DSS-a

A) Displazija epitela u obliku stvaranja „back to back“ kripti u distalnom debelom crijevu ženki (povećanje 10x). B) Polipozne tvorbe u distalnom debelom crijevu mužjaka (povećanje 5x). C) Displazija visokog stupnja s potpunom reepitelizacijom ulkusa u distalnom debelom crijevu ženki (povećanje 10x). D) Transmuralna upala u okolnom masnom tkivu i „nazubljeni“ epitel u distalnom debelom crijevu mužjaka (povećanje 5x).

Slika prikazana pri digitalnom povećanju, Zen softver, Zeiss. Mjerna skala: 500 μm (1x), 200 μm (2,5x i 5x), 100 μm (10x) i 50 μm (20x).

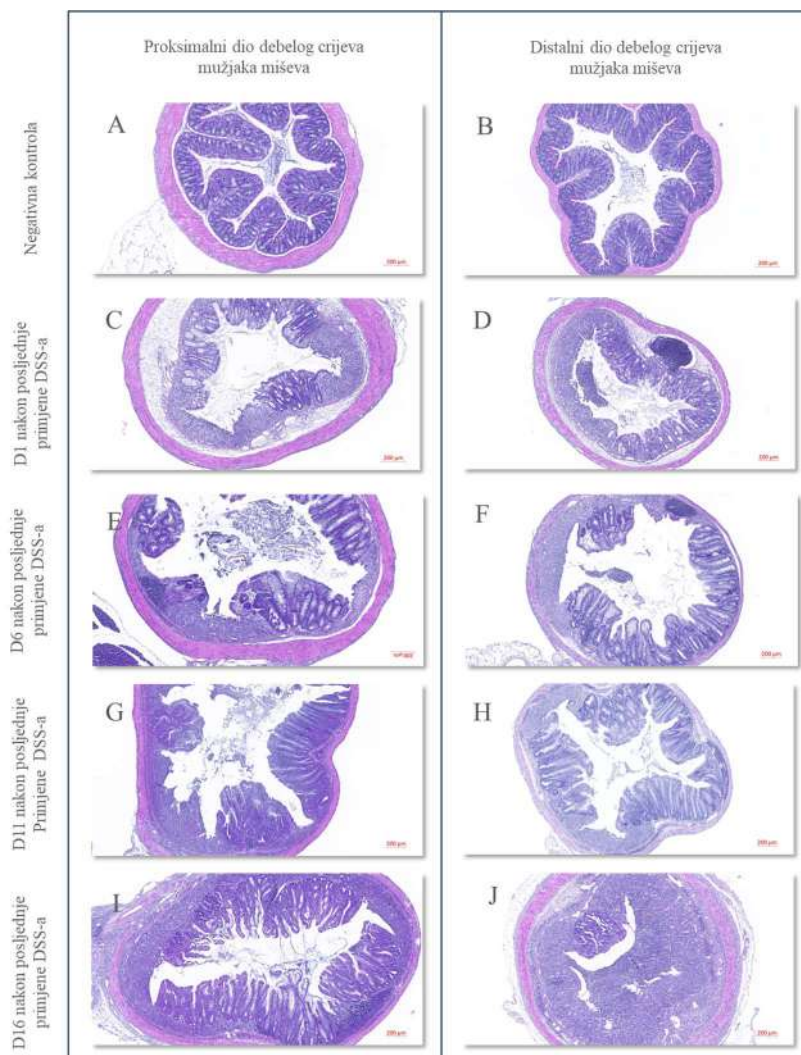
Na slikama 16 i 17 prikazane su reprezentativne histološke slike proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva kod ženki i mužjaka za negativnu kontrolu te za vremenske točke D1, D6, D11 i D16 nakon posljednje primjene DSS-a.



Slika 16 Reprezentativne slike proksimalnog i distalnog debelog crijeva ženki, H&E

A) Negativna kontrola proksimalnog debelog crijeva. B) Negativna kontrola distalnog debelog crijeva. C) Proksimalno debelo crijevo na D1 nakon posljednje primjene DSS-a. D) Distalno debelo crijevo na D1 nakon posljednje primjene DSS-a. E) Proksimalno debelo crijevo na D6 nakon posljednje primjene DSS-a. F) Distalno debelo crijevo na D6 nakon posljednje primjene DSS-a. G) Proksimalno debelo crijevo na D11 nakon posljednje primjene DSS-a. H) Distalno debelo crijevo na D11 nakon posljednje primjene DSS-a. I) Proksimalno debelo crijevo na D16 nakon posljednje primjene DSS-a. J) Distalno debelo crijevo na D16 nakon posljednje primjene DSS-a.

Slika prikazana pri digitalnom povećanju **2,5x**, Zen softver, Zeiss. Skala: 200 μm.



Slika 17 Reprezentativne slike proksimalnog i distalnog debelog crijeva mužjaka, H&E

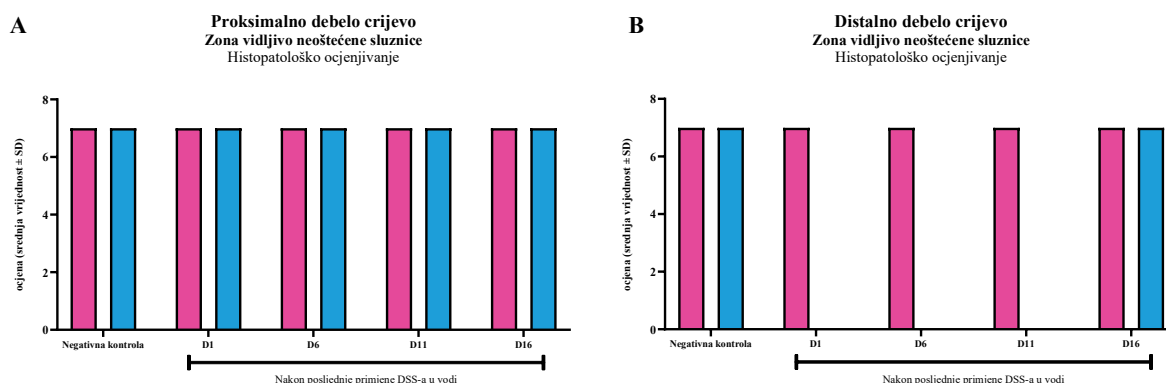
A) Negativna kontrola proksimalnog debelog crijeva. B) Negativna kontrola distalnog debelog crijeva. C) Proksimalno debelo crijevo na D1 nakon posljednje primjene DSS-a. D) Distalno debelo crijevo na D1 nakon posljednje primjene DSS-a. E) Proksimalno debelo crijevo na D6 nakon posljednje primjene DSS-a. F) Distalno debelo crijevo na D6 nakon posljednje primjene DSS-a. G) Proksimalno debelo crijevo na D11 nakon posljednje primjene DSS-a. H) Distalno debelo crijevo na D11 nakon posljednje primjene DSS-a. I) Proksimalno debelo crijevo na D16 nakon posljednje primjene DSS-a. J) Distalno debelo crijevo na D16 nakon posljednje primjene DSS-a.

Slika prikazana pri digitalnom povećanju 2,5x, Zen softver, Zeiss. Skala: 200 µ

5.4. HISTOPATOLOŠKO OCJENJIVANJE PREPARATA DEBELOG CRIJEVA

5.4.1. Zona vidljivo neoštećene sluznice

U z zoni vidljivo neoštećene sluznice nisu uočene histopatološke promjene ni u proksimalnom ni u distalnom dijelu debelog crijeva, kako kod ženki tako i kod mužjaka. U distalnom dijelu debelog crijeva mužjaka u promatranim vremenskim točkama D1, D6 i D11 nije zabilježen nijedan uzorak koji bi sadržavao navedenu zonu (**slika 18**).



Slika 18 Histopatološko ocjenjivanje zone vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva

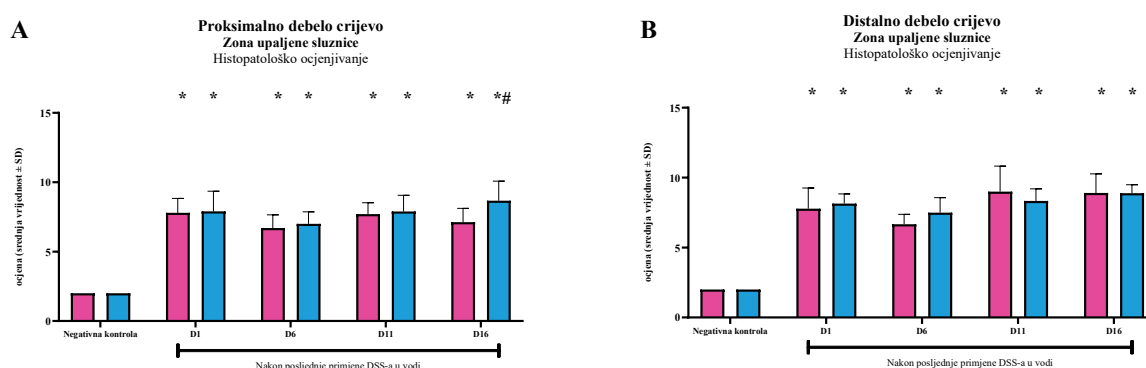
A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, model miješanih učinaka (REML), Dunnettov test višestrukih usporedbi. # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućem promatranom vremenskom razdoblju, model miješanih učinaka (REML), Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

5.4.2. Zona upaljene sluznice

U oba dijela debelog crijeva kod ženki i mužjaka nakon primjene DSS-a utvrđena je značajno izraženija upala i oštećenje epitela u usporedbi s negativnom kontrolnom skupinom. U zoni upaljene sluznice debelog crijeva značajne su razlike na D1, D6, D11 i D16 nakon posljednje primjene DSS-a u usporedbi s negativnom kontrolom u proksimalnom i distalnom debelom crijevu ženki i mužjaka. U proksimalnom dijelu debelog crijeva ženki na vremenskoj točki D16 zabilježene su blaže upalne promjene u usporedbi s istim segmentom kod mužjaka (**slika 19**).



Slika 19 Histopatološko ocjenjivanje zone upaljene sluznice debelog crijeva

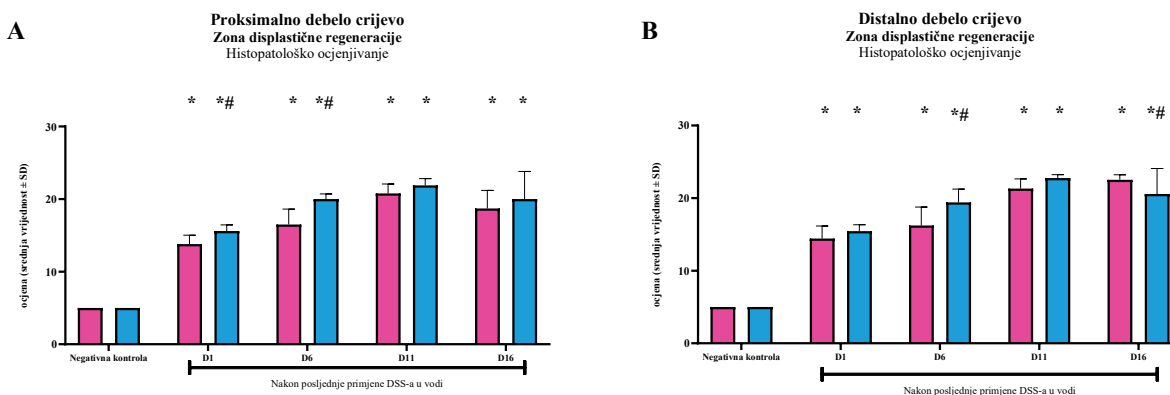
A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, model miješanih učinaka (REML), Dunnettov test višestrukih usporedbi. # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućem promatranom vremenskom razdoblju, model miješanih učinaka (REML), Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

5.4.3. Zona displastične regeneracije

U zoni displastične regeneracije, smještenoj uz rub erozije/ulkusa, u oba dijela debelog crijeva kod ženki i mužjaka zabilježene su značajne razlike u vremenskim točkama D1, D6, D11 i D16 nakon posljednje primjene DSS-a u usporedbi s negativnom kontrolom. Statistički jače histološke promjene zabilježene su kod mužjaka u usporedbi sa ženkama i to u proksimalnom dijelu debelog crijeva na D1 i D6 te u distalnom dijelu na D6. U distalnom dijelu debelog crijeva mužjaka vidljiva je statistički blaža histološka ocjena na D16 nakon posljednje primjene DSS-a u usporedbi s istim dijelom kod ženki (**slika 20**).



Slika 20 Histopatološko ocjenjivanje zone displastične regeneracije debelog crijeva

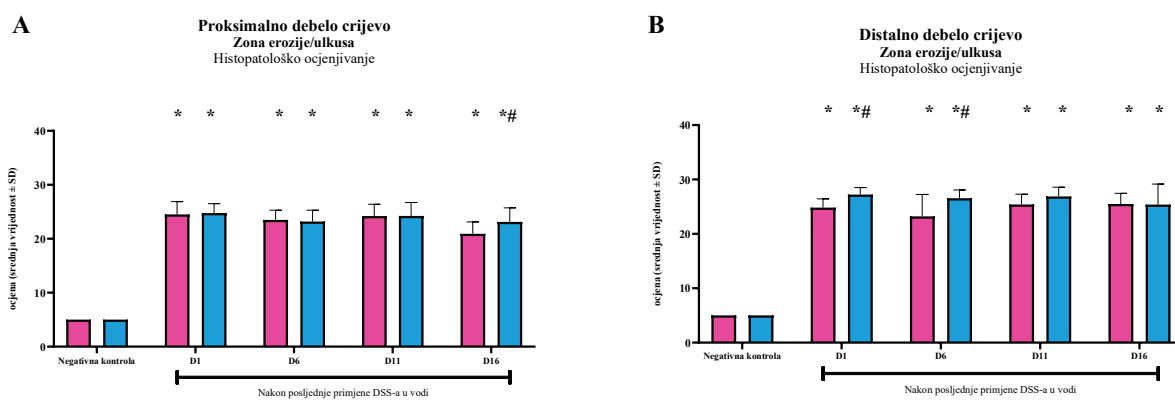
A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, model miješanih učinaka (REML), Dunnettov test višestrukih usporedbi. # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućem promatranom vremenskom razdoblju, model miješanih učinaka (REML), Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

5.4.4. Zona erozije/ulkusa

U zoni erozije/ulkusa zabilježene su značajne razlike između negativne kontrolne skupine i skupina s DSS-induciranim kolitisom kod ženki i mužjaka. U proksimalnom dijelu debelog crijeva ženki na vremenskoj točki D16 zabilježene su blaže upalne promjene u usporedbi s istim segmentom kod mužjaka. U distalnom debelom crijevu mužjaka jače oštećenje epitela i upala zabilježeni su ranije nakon prestanka primjene DSS-a, na D1 i D6, u usporedbi s istim segmentom debelog crijeva ženki (**slika 21**).



Slika 21 Histopatološko ocjenjivanje zone erozije/ulkusa debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

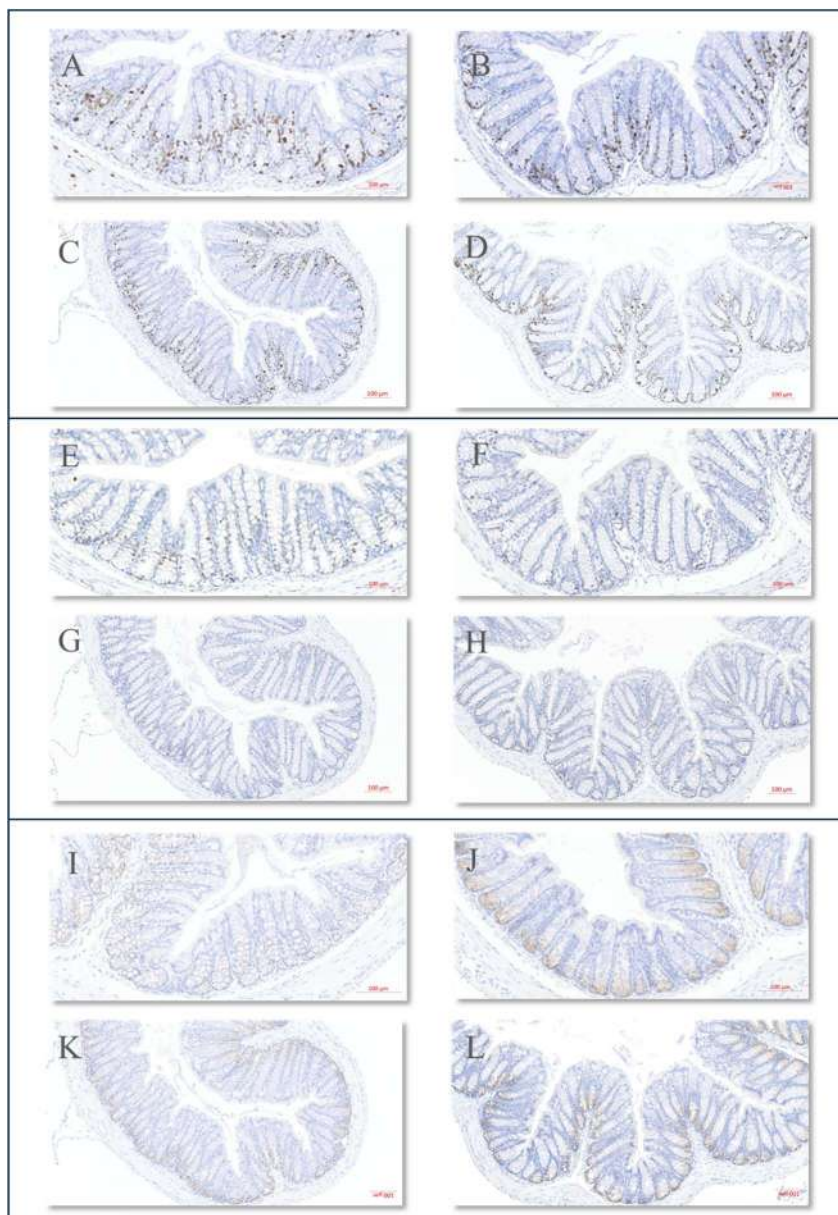
* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, model miješanih učinaka (REML), Dunnettov test višestrukih usporedbi. # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućem promatranom vremenskom razdoblju, model miješanih učinaka (REML), Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

5.5. BAZALNE VRIJEDNOSTI EPITELNIH BILJEGA DEBELOG CRIJEVA

5.5.1. Epitelni biljezi baze kripe debelog crijeva

U distalnom dijelu debelog crijeva ženki i mužjaka zabilježen je značajno manji broj Ki67-pozitivnih stanica u odnosu na proksimalni dio. Također, u oba dijela debelog crijeva mužjaci imaju manje proliferirajućih stanica u usporedbi sa ženkama. U negativnoj kontrolnoj skupini mužjaci imaju statistički manji broj LGR5-pozitivnih stanica po ukupnoj površini sluznice u proksimalnom i distalnom debelom crijevu u odnosu na ženke. U distalnom dijelu debelog crijeva kod oba spola uočena je manja CLDN2-pozitivna površina u usporedbi s proksimalnim dijelom istog spola (**slika 22**).



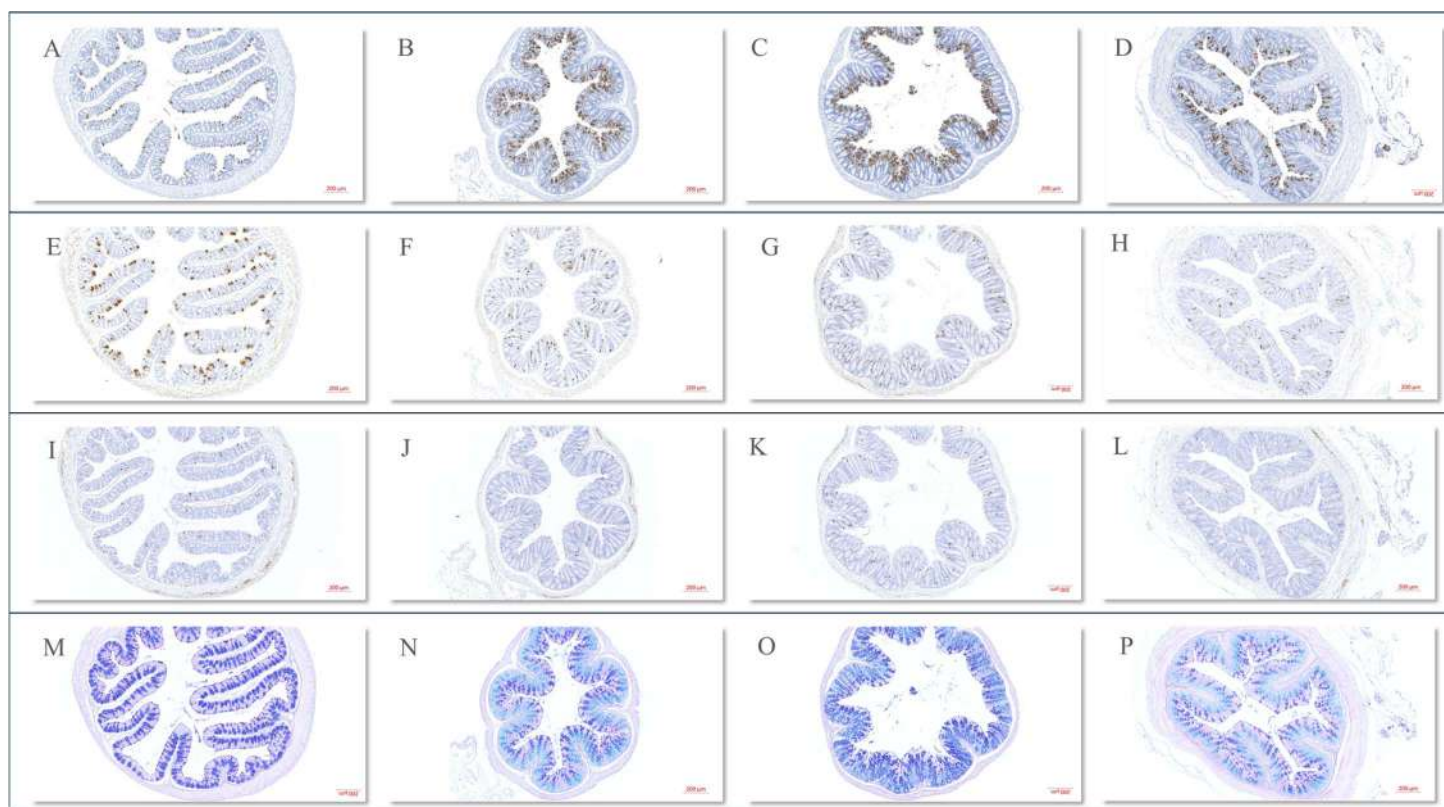
Slika 22 Reprezentativne slike debelog crijeva obojene IHC metodom na Ki67, LGR5 i CLDN2

A–B: Ženke (proksimalno, distalno), IHC Ki67. C–D: Mužjaci (proksimalno, distalno), IHC Ki67. E–F: Ženke (proksimalno, distalno), IHC LGR5. G–H: Mužjaci (proksimalno, distalno), IHC LGR5. I–J: Ženke (proksimalno, distalno), IHC CLDN2. K–L: Mužjaci (proksimalno, distalno), IHC CLDN2.

Slika prikazana pri digitalnom povećanju 10x, Zen softver, Zeiss. Skala: 100 μ m.

5.5.2. Sekretorne epitelne stanice debelog crijeva

Nasuprot tome, u distalnom dijelu debelog crijeva ženki i mužjaka prisutan je značajno veći broj ATOH1-pozitivnih stanica u odnosu na proksimalni dio, dok mužjaci u oba dijela debelog crijeva imaju manje sekretornih progenitorskih stanica u usporedbi sa ženkama. Ženke također pokazuju statistički značajno veću zastupljenost neuroendokrinih stanica, odnosno veću CHGA-pozitivnu površinu, u proksimalnom i distalnom debelom crijevu u odnosu na mužjake. Nadalje, broj DCLK1-pozitivnih stanica izražen u odnosu na ukupnu površinu sluznice značajno je manji u distalnom dijelu debelog crijeva oba spola u usporedbi s proksimalnim dijelom. U pozitivnoj AB-PAS površini nisu uočene razlike između spolova i dijelova debelog crijeva (**slika 23**).



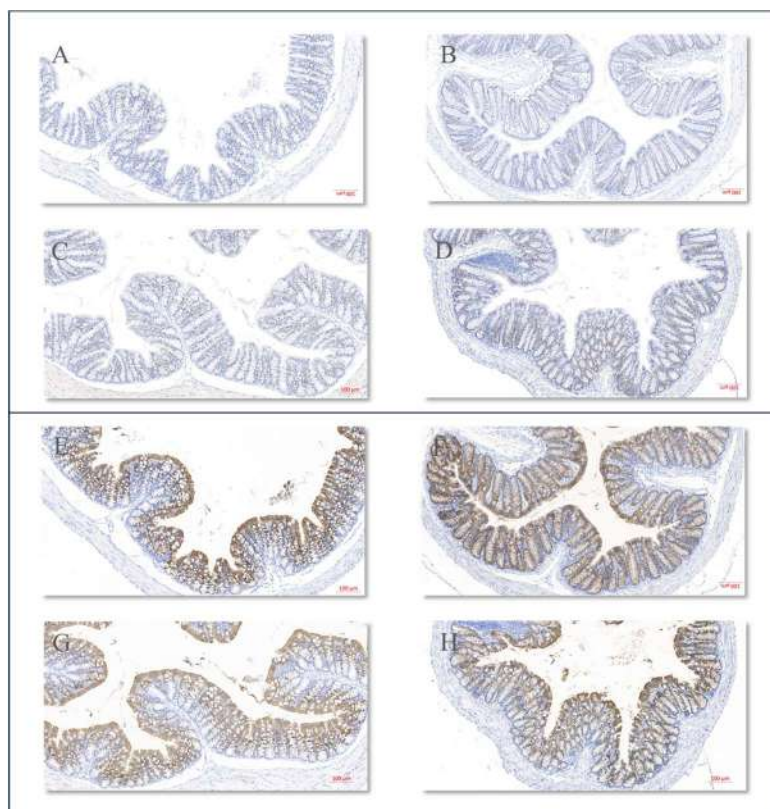
Slika 23 Reprezentativne slike debelog crijeva obojene na IHC ATOH1, CHGA i DCLK1 i AB-PAS

A–B: Ženke (proksimalno, distalno), IHC ATOH1. C–D: Mužjaci (proksimalno, distalno), IHC ATOH1. E–F: Ženke (proksimalno, distalno), IHC CHGA. G–H: Mužjaci (proksimalno, distalno), IHC CHGA. I–J: Ženke (proksimalno, distalno), IHC DCLK1. K–L: Mužjaci (proksimalno, distalno), IHC DCLK1. M–N: Ženke (proksimalno, distalno), AB-PAS. O–P: Mužjaci (proksimalno, distalno), AB-PAS.

Slika prikazana pri digitalnom povećanju 2,5x, Zen softver, Zeiss. Skala: 200 µm.

5.5.3. Apsorptivne epitelne stanice debelog crijeva

S druge strane, mužjaci imaju veći broj apsorptivnih progenitorskih stanica u proksimalnom i distalnom dijelu debelog crijeva u odnosu na ženke. Kod oba spola zabilježen je veći broj HES1-pozitivnih stanica u distalnom dijelu debelog crijeva u odnosu na proksimalni dio. Konačno, ženke i mužjaci pokazuju značajno veću CA2-pozitivnu površinu u distalnom dijelu debelog crijeva u usporedbi s proksimalnim dijelom istog spola (**slika 24**).

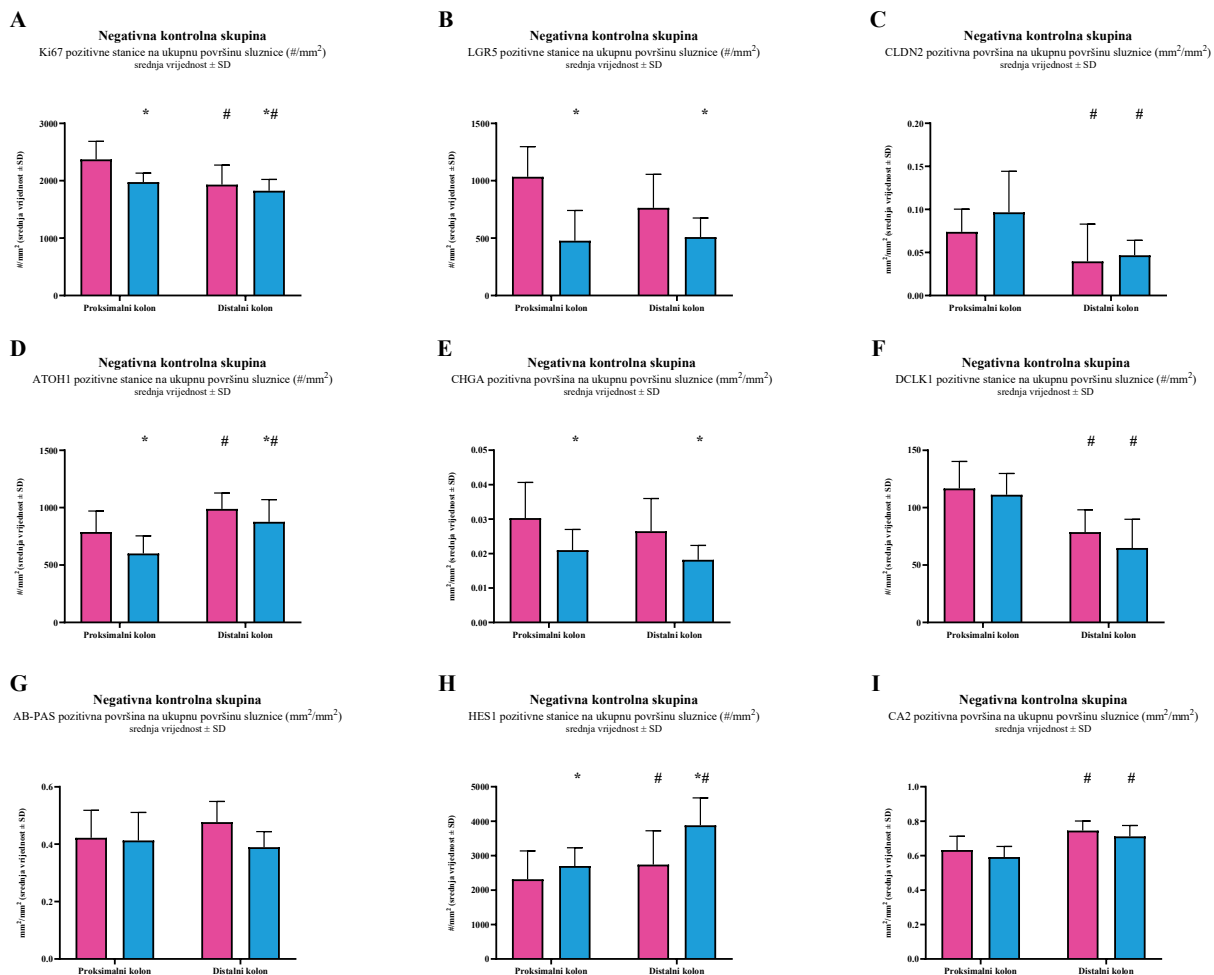


Slika 24 Reprezentativne slike debelog crijeva obojene IHC metodom na HES1 i CA2

A–B: Ženke (proksimalno, distalno), IHC HES1. C–D: Mužjaci (proksimalno, distalno), IHC HES1. E–F: Ženke (proksimalno, distalno), IHC CA2. G–H: Mužjaci (proksimalno, distalno), IHC CA2.

Slika prikazana pri digitalnom povećanju 10x, Zen softver, Zeiss. Skala: 100 μ m.

Rezultati za epitelne biljege negativne kontrolne skupine s usporedbom između spolova i segmenata debelog crijeva su prikazani na **Slici 25**.



Slika 25 Kvantifikacija epitelnih biljega negativne kontrolne skupine u debelom crijevu

A) IHC Ki67. B) IHC LGR5. C) IHC CLDN2. D) IHC ATOH1. E) IHC CHGA. F) IHC DCLK1. G) AB-PAS. H) IHC HES1. I) IHC CA2.

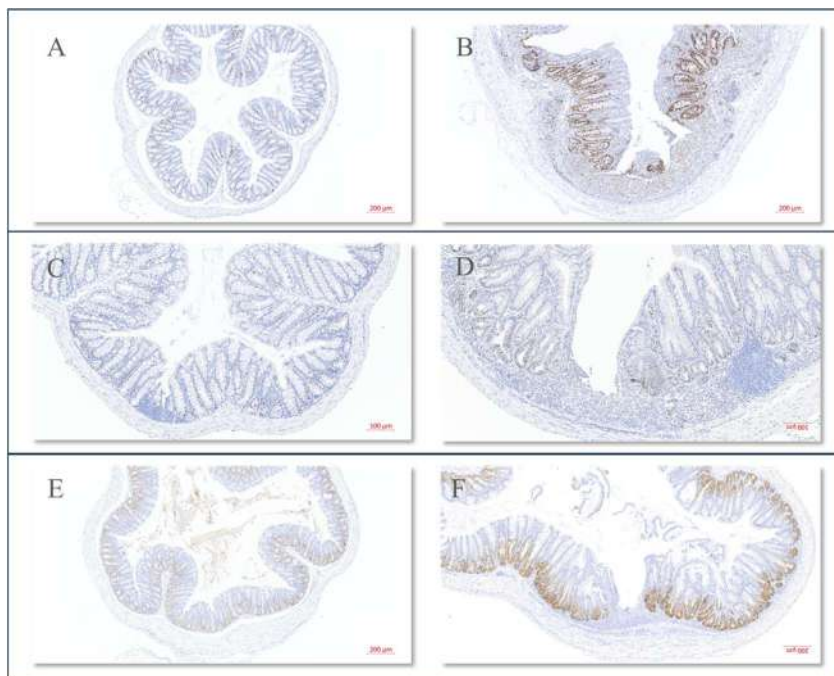
*p < 0,05 nasuprot ženka u odgovarajućem segmentu debelog crijeva, #p < 0,05 nasuprot distalnom debelom crijevu u odgovarajućem spolu, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Ružičasta boja– ženke, plava boja – mušjaci.

5.6. LOKALIZACIJA I INTENZITET EKSPRESIJE EPITELNIH BILJEGA DEBELOG CRIJEVA

5.6.1. Epitelni biljezi baze kripe debelog crijeva

Imunohistokemijsko bojenje na Ki67 pokazalo je izražen nuklearni signal u epitelu debelog crijeva. U negativnoj kontrolnoj skupini Ki67-pozitivne stanice bile su prisutne u donjoj i srednjoj trećini kripti proksimalnog debelog crijeva, dok su u distalnom debelom crijevu bile pretežno ograničene na donju trećinu kripti. U skupini životinja s DSS-induciranim kolitisom Ki67-pozitivne stanice protezale su se kroz donju i srednju trećinu kripti proksimalnog i distalnog debelog crijeva, s osobito naglašenim signalom u neposrednoj blizini lezija. Osim epitelnih stanica, Ki67-pozitivne stanice uočene su i u području submukoze te okolnog masnog tkiva. U usporedbi s negativnom kontrolom, u DSS-skupinama pozitivno bojenje obuhvaćalo je i srednje dijelove kripti, regije uz erozije i ulkuse te novoformirani epitel. Intenzitet ekspresije Ki67 bio je visok u svim ispitanim skupinama. LGR5 je pokazao citoplazmatsku i nuklearnu lokalizaciju u epitelnim stanicama donjeg i srednjeg dijela kripti proksimalnog debelog crijeva, dok je u distalnom debelom crijevu negativne kontrolne skupine signal bio ograničen na donji dio kripti. Kod životinja s DSS-om induciranim kolitisom stanična lokalizacija LGR5-pozitivnih stanica unutar kripe ostala je nepromijenjena, uz izrazitu dodatnu prisutnost LGR5-pozitivnih stanica u području novoformiranog epitela. LGR5-pozitivne stanice slabog intenziteta bojenja bile su prisutne u lamini proprij i MALT-u. Intenzitet ekspresije bio je umjeren do jak. U tkivu debelog crijeva negativne kontrolne skupine CLDN2 bio je lokaliziran na apikalnim membranama i u uskim spojevima epitelnih stanica donjeg i srednjeg dijela kripti. U tkivu debelog crijeva s DSS-induciranim kolitisom signal se proširio i na citoplazmu epitelnih stanica, uz izraženo pojačanje intenziteta ekspresije. Primijećen je veći intenzitet ekspresije CLDN2 u zoni displastične regeneracije, odnosno zoni neposredno uz leziju, dok u drugim zonama te promjene nisu bile toliko izražene. Dok je u negativnoj kontroli intenzitet bojenja bio slab do srednji, u područjima uz lezije zabilježen je jak membranski signal. U epitelnim regijama udaljenima od lezija CLDN2 pokazivao je srednji intenzitet bojenja (**slika 26**).



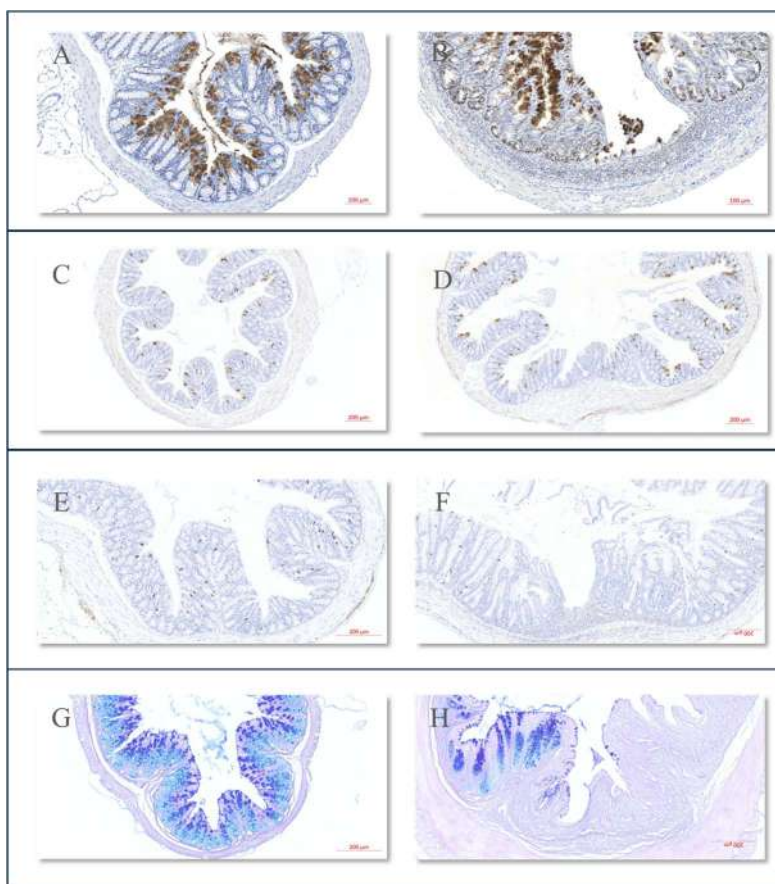
Slika 26 IHC bojenje na Ki67, LGR5 i CLDN2

A) Proksimalni dio debelog crijeva mužjaka u negativnoj kontrolnoj skupini, IHC Ki67 (povećanje 2,5x). B) Proksimalni dio debelog crijeva mužjaka na D16 nakon posljednje primjene DSS-a, IHC Ki67 (povećanje 2,5x). C) Distalni dio debelog crijeva mužjaka u negativnoj kontrolnoj skupini, IHC LGR5 (povećanje 10x). D) Distalni dio debelog crijeva mužjaka na D16 nakon posljednje primjene DSS-a, IHC LGR5 (povećanje 10x). E) Proksimalni dio debelog crijeva mužjaka u negativnoj kontrolnoj skupini, IHC CLDN2 (povećanje 2,5x). F) Proksimalni dio debelog crijeva mužjaka na D16 nakon posljednje primjene DSS-a, IHC CLDN2 (povećanje 2,5x).

Slika prikazana pri digitalnom povećanju, Zen softver, Zeiss. Mjerna skala: 500 μm (1x), 200 μm (2,5x i 5x), 100 μm (10x) i 50 μm (20x).

5.6.2. Sekretorne epitelne stanice debelog crijeva

U negativnoj kontrolnoj skupini ekspresija ATOH1-biljega srednjeg intenziteta bila je zabilježena u jezgrama epitelnih stanica donjeg dijela kripti. Vakuole vrčastih stanica ispunjene mucinima također su bile ATOH1-pozitivne. U tkivu debelog crijeva miševa kojima je induciran kolitis uočen je slab do srednji nuklearni signal u donjim dijelovima kripti, dok je u epitelnim stanicama u području sluznice uz erozije i ulkuse zabilježen srednji do jaki intenzitet ekspresije. Citoplazma neuroendokrinih stanica različitog oblika, difuzno raspoređenih unutar epitelnog sloja debelog crijeva, kao i ganglijske stanice Auerbachova plexusa u mišićnici, pokazale su srednje do jako pozitivnu imunoreaktivnost na CHGA u obje skupine, kako u negativnoj kontroli tako i u debelom crijevu s induciranim kolitisom. Imunohistokemijskim bojenjem DCLK1-biljega u sluznici debelog crijeva negativne kontrolne skupine uočen je jak citoplazmatski signal u kemosenzornim stanicama različite morfologije, difuzno raspoređenima unutar epitela, te srednji signal u ganglijskim stanicama Auerbachova plexusa. U tkivu debelog crijeva životinja kojima je DSS-om induciran kolitis, osim navedenih struktura, DCLK1 je dodatno obilježio pojedine stanice lamine proprije i endotelne stanice krvnih žila. Intenzitet ekspresije bio je jak u kemosenzornim i ganglijskim stanicama, a srednjeg intenziteta u stanicama lamine proprije i endotela krvnih žila. AB-PAS pokazao je srednje jak citoplazmatski signal u vrčastim stanicama debelog crijeva negativne kontrolne skupine, kao i u debelom crijevu nakon primjene DSS-a (**slika 27**).



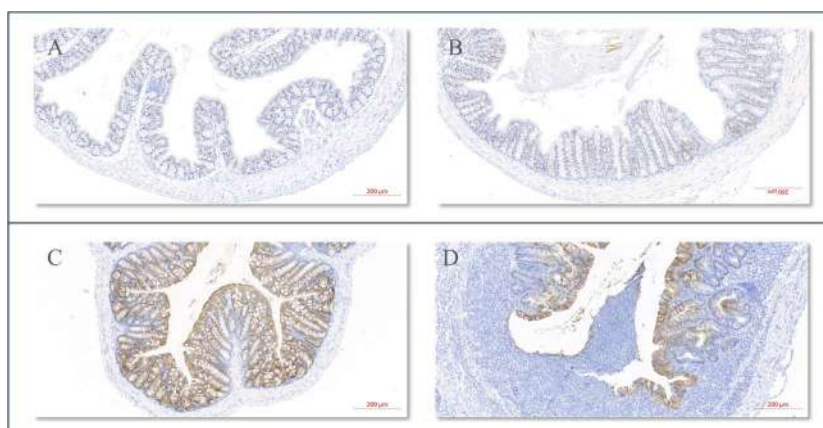
Slika 27 IHC bojenje na ATOH1, CHGA, DCLK1 i histokemijsko bojenje na AB-PAS

A) Distalni dio debelog crijeva mužjaka u negativnoj kontrolnoj skupini, IHC ATOH1 (povećanje 10x). B) Distalni dio debelog crijeva mužjaka na D16 nakon posljednje primjene DSS-a, IHC ATOH1 (povećanje 10x). C) Proksimalni dio debelog crijeva ženki u negativnoj kontrolnoj skupini, IHC CHGA (povećanje 2,5x). D) Proksimalni dio debelog crijeva ženki na D16 nakon posljednje primjene DSS-a, IHC CHGA (povećanje 2,5x). E) Proksimalni dio debelog crijeva mužjaka u negativnoj kontrolnoj skupini, IHC DCLK1 (povećanje 2,5x). F) Proksimalni dio debelog crijeva mužjaka na D16 nakon posljednje primjene DSS-a, AB-PAS (povećanje 2,5x). G) Distalni dio debelog crijeva ženki u negativnoj kontrolnoj skupini (povećanje 5x). H) Distalni dio debelog crijeva ženki na D16 nakon posljednje primjene DSS-a, AB-PAS (povećanje 5x).

Slika prikazana pri digitalnom povećanju, Zen softver, Zeiss. Mjerna skala: 500 μm (1x), 200 μm (2,5x i 5x), 100 μm (10x) i 50 μm (20x).

5.6.3. Apsorptivne epitelne stanice debelog crijeva

HES1 je u negativnoj kontroli pokazivao slab do srednje jak nuklearni signal u epitelnim stanicama donjeg dijela kripti proksimalnog i distalnog debelog crijeva. Nakon primjene DSS-a uočen je porast intenziteta bojenja, uz pojavu HES1-pozitivnih epitelnih stanica i u srednjem dijelu kripti. CA2 je u debelom crijevu negativne kontrolne skupine pokazivao jak citoplazmatski signal u epitelnim stanicama srednjeg i gornjeg dijela kripti. Nakon primjene DSS-a ekspresija se sužava pretežno na gornji dio kripti, pri čemu je pozitivnost na CA2 zabilježena i u novoformiranom epitelu iznad erozija i ulkusa (**slika 28**).



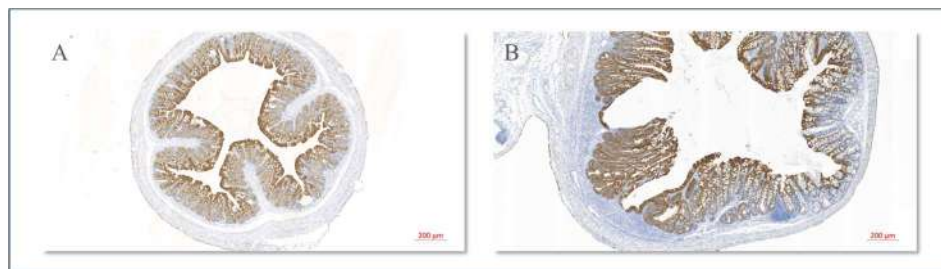
Slika 28 IHC bojenje na HES1 i CA2

A) Proksimalni dio debelog crijeva ženki u negativnoj kontrolnoj skupini, IHC HES1. B) Proksimalni dio debelog crijeva ženki na D16 nakon posljednje primjene DSS-a, IHC HES1. C) Distalni dio debelog crijeva mužjaka u negativnoj kontrolnoj skupini, IHC CA2. D) Distalni dio debelog crijeva mužjaka na D16 nakon posljednje primjene DSS-a, IHC CA2.

Slika prikazana pri digitalnom povećanju 5x, Zen softver, Zeiss. Skala: 200 μ m.

5.6.4. IHC PAN-CK bojenje

U debelom crijevu miševa negativne kontrolne skupine PAN-CK pokazao je snažno citoplazmatsko i membransko obojenje epitelnih stanica kripti. U skupinama u kojima je kolitis izazvan DSS-om PAN-CK je, uz navedene strukture, dodatno obilježio i novoformirani epitel iznad ulkusa. Jačina imunohistokemijskog signala bila je visoka u oba spola bez značajnih razlika (slika 29).



Slika 29 IHC bojenje na PAN-CK

A) Distalni dio debelog crijeva ženke u negativnoj kontrolnoj skupini. B) Distalni dio debelog crijeva ženke na D16 nakon posljednje primjene DSS-a.

Slika prikazana pri digitalnom povećanju 2,5x, Zen softver, Zeiss. Skala: 200 µm..

Lokalizacija i intenzitet ekspresije epitelnih biljega prikazani su u **tablici 12**.

Tablica 12 Lokalizacija i intenzitet ekspresije epitelnih biljega

Lokalizacija unutar stanice i stupnjevanje intenziteta pojedinog histološkog/imunohistološkog bojenja. + = slab intenzitet, ++ = srednji intenzitet, +++ = jak intenzitet.

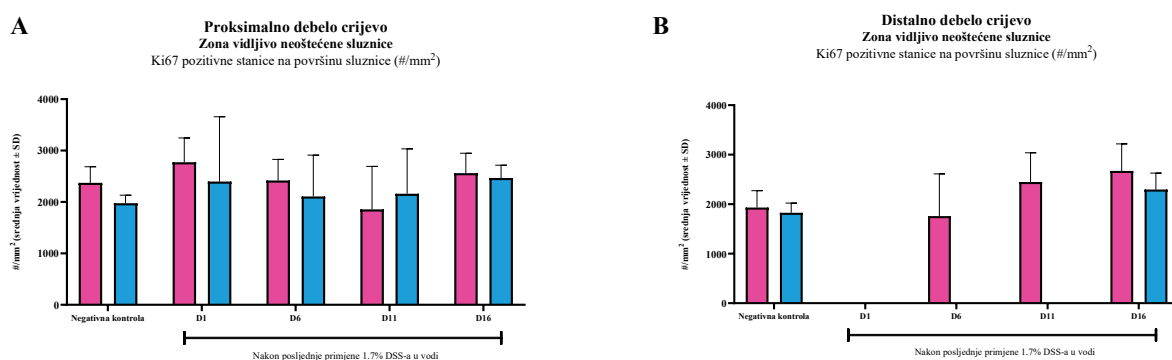
Histološko/ imunohistološko bojenje	Negativna kontrola		Kolitis izazvan DSS-om	
	Lokalizacija	Intenzitet ekspresije	Lokalizacija	Intenzitet ekspresije
Ki67	jezgre epitelnih stanica donjeg dijela kripti	+++	epitelne stanice donjeg i srednjeg dijela kripti, pojedine stanice uz eroziju/ulkus i u novoformiranom epitelu	+++
LGR5	jezgre epitelnih stanica donjeg i srednjeg dijela kripti u proksimalnom dijelu debelog crijeva, u distalnom dijelu samo u donjem dijelu kripti	++	epitelne stanice donjeg i srednjeg dijela kripti, pojedine stanice u lamini proprij, MALT-u i u novoformiranom epitelu	+ u jezgri epitelnih stanica, ++ u područjima uz eroziju/ulkus
CLDN2	apikalna membrana i "uski spojevi" epitelnih stanica u donjem i srednjem dijelu kripti	+ / ++	apikalna membrana i "uski spojevi" epitelnih stanica u donjem i srednjem dijelu kripti, citoplazma epitelnih stanica uz leziju	+++ u područjima uz eroziju/ulkus, ++ u ostatku epitela debelog crijeva
ATOH1	jezgre epitelnih stanica donjeg dijela kripti i mucini vrčastih stanica	++	epitelne stanice donjeg dijela kripti i uz eroziju/ulkus, mucini vrčastih stanica	+ / ++ u jezgri epitelnih stanica, ++ / +++ u područjima uz eroziju/ulkus

CHGA	citoplazma enteroendokrinih epitelnih stanica različitog oblika, difuzno raspoređenih u epitelnom sloju debelog crijeva, ganglijske stanice (Auerbachov plexus) u mišićnici	++/+++	enteroendokrine stanice različitog oblika, difuzno raspoređene u epitelnom sloju debelog crijeva, ganglijske stanice (Auerbachov plexus) u mišićnici	++/+++
DCLK1	jezgre kemosenzornih epitelnih stanica različitog oblika, difuzno raspoređenih u epitelnom sloju debelog crijeva, ganglijske stanice (Auerbachov plexus) u mišićnici	+++ u kemosenzornim stanicama, ++ u ganglijskim stanicama	kemosenzorne stanice različitog oblika, difuzno raspoređene u epitelnom sloju debelog crijeva, ganglijske stanice (Auerbachov plexus) u mišićnici, stanice u lamini propriji, endotel krvnih žila	+++ u kemosenzornim stanicama i ganglijskim stanicama; ++ u stanicama u lamini propriji i endotela krvnih žila
AB-PAS	mucini vrčastih stanica	/	mucini vrčastih stanica	/
HES1	jezgre epitelnih stanica donjeg dijela kripte	+/++	epitelne stanice donjeg i srednjeg dijela kripte uz eroziju/ulkus	+++
CA2	citoplazma epitelnih stanica srednjeg i gornjeg dijela kripte	+++	epitelne stanice gornjeg dijela kripte, novoformirani epitel	+++
PAN-CK	citoplazma i membrane svih epitelnih stanica	+++	sve epitelne stanice, uključujući i novoformirani epitel iznad erozije/ulkusa	+++

5.7. DIGITALNA PATOLOŠKA ANALIZA EPITELNIH BILJEGA BAZE KRIPTE DEBELOG CRIJEVA

5.7.1. Zona vidljivo neoštećene sluznice

Razlika u broju Ki67-pozitivnih stanica nije zabilježena ni u jednoj vremenskoj točki između mužjaka i ženki ni u proksimalnom ni u distalnom dijelu debelog crijeva. U debelom crijevu mužjaka u promatranim vremenskim točkama D1, D6 i D11 nije zabilježen nijedan uzorak koji bi sadržavao ovu zonu (slika 30).



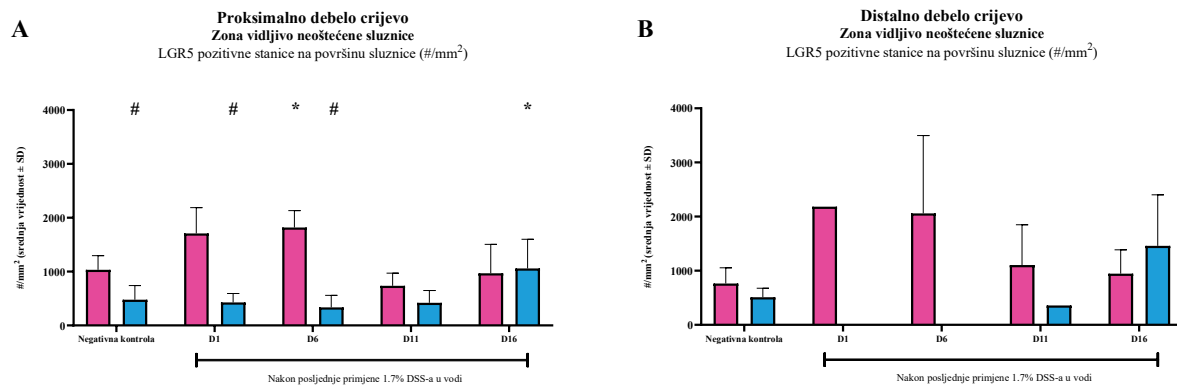
Slika 30 Kvantifikacija Ki67-pozitivnih stanica u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

S druge strane, u istoj zoni uočene su značajne razlike u broju LGR5-pozitivnih stanica između spolova u negativnoj kontroli te u vremenskim točkama D1 i D6, pri čemu ženke imaju veći broj pozitivnih stanica u odnosu na mužjake. U proksimalnom debelom crijevu broj matičnih stanica u bazi kripte povećan je kod ženki na D6, a kod mužjaka na D16, u usporedbi s negativnom kontrolom. U debelom crijevu mužjaka u promatranim vremenskim točkama D1 i D6 nije zabilježen nijedan uzorak koji bi sadržavao ovu zonu (**slika 31**).



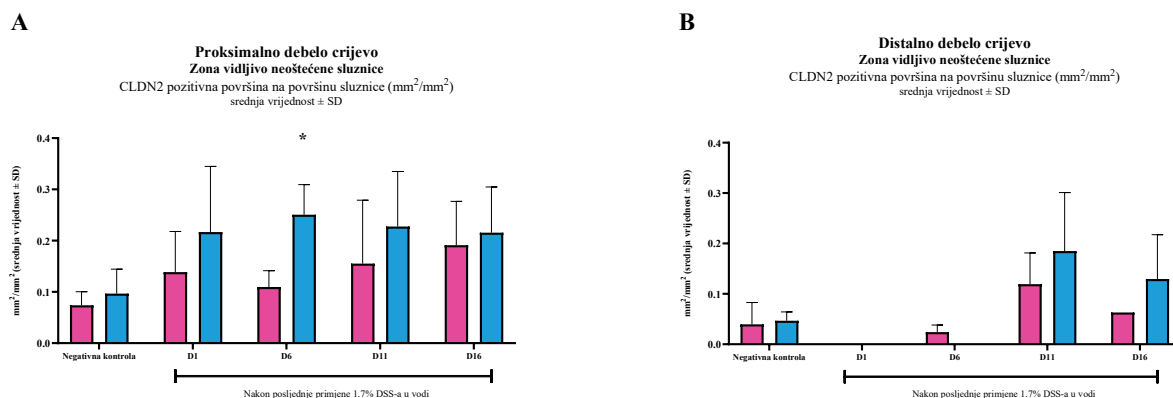
Slika 31 Kvantifikacija LGR5-pozitivnih stanica u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

*p < 0,05 nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, #p < 0,05 nasuprot ženka u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

CLDN2-pozitivna površina postupno se povećava s vremenom u proksimalnom debelom crijevu ženki i mužjaka, a vrhunac sa statističkom značajnošću postiže kod mužjaka na D6 u usporedbi s negativnom kontrolom. U debelom crijevu mužjaka u promatranim vremenskim točkama D1 i D6 nije zabilježen nijedan uzorak koji bi sadržavao ovu zonu (**slika 32**).



Slika 32 Kvantifikacija CLDN2-pozitivne površine u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva

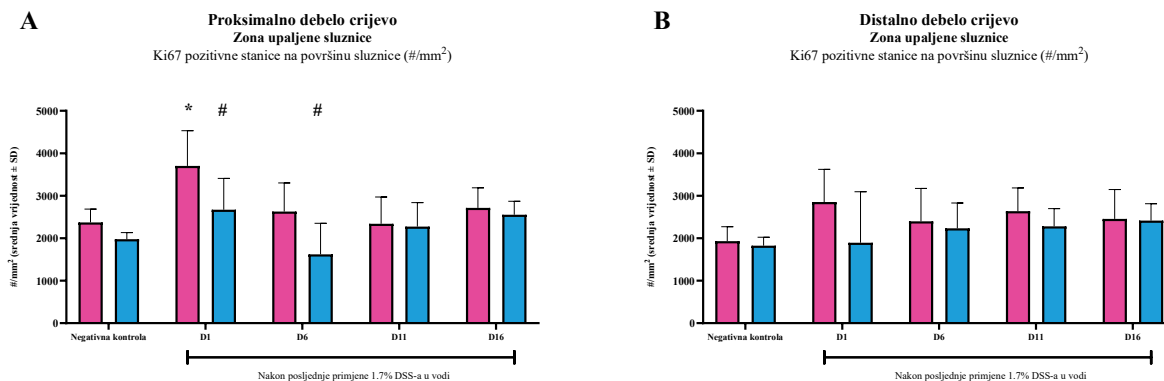
A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

*p < 0,05 nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, #p < 0,05 nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

5.7.2. Zona upaljene sluznice

Zabilježen je značajan porast broja Ki67-pozitivnih stanica u proksimalnom debelom crijevu ženki na D1 u usporedbi s negativnom kontrolom. Proliferacija epitelnih stanica kod ženki povećana je na D1 i D6 nakon posljednje primjene DSS-a u proksimalnom debelom crijevu u usporedbi s mužjacima (slika 33).



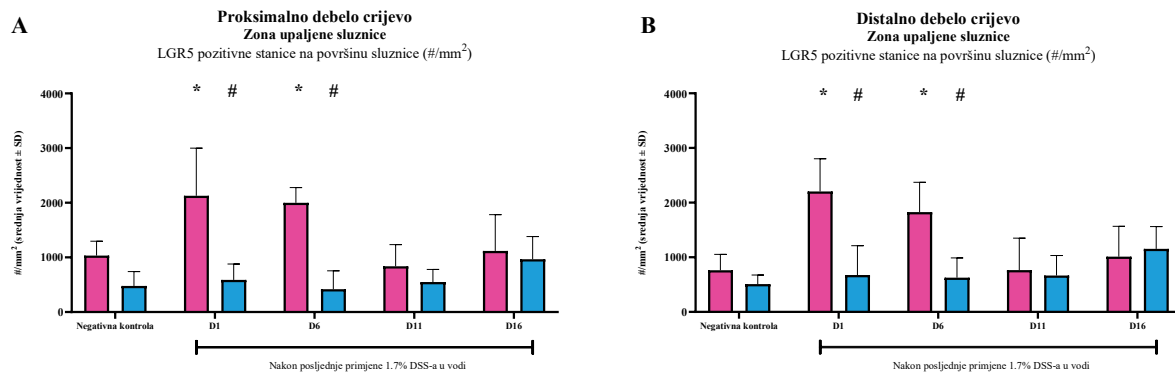
Slika 33 Kvantifikacija Ki67-pozitivnih stanica u zoni upaljene sluznice debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

Kvantifikacijom LGR5-pozitivnih stanica zabilježen je značajan porast broja stanica u proksimalnom i distalnom debelom crijevu ženki na D1 i D6 u usporedbi s negativnom kontrolom, kao i veći broj LGR5-pozitivnih stanica kod ženki u odnosu na mužjake na D1 i D6 nakon posljednje primjene DSS-a u proksimalnom debelom crijevu (**slika 34**).



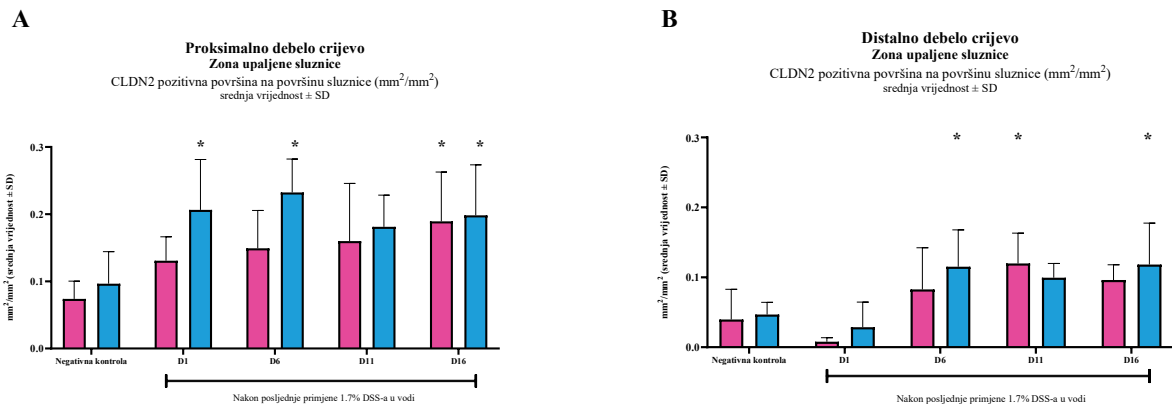
Slika 34 Kvantifikacija LGR5-pozitivnih stanica u zoni upaljene sluznice debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

U istoj zoni zabilježeno je povećanje CLDN2-pozitivne površine kod mužjaka u proksimalnom i distalnom dijelu debelog crijeva na D6 i D16 u odnosu na negativnu kontrolu, kao i na D1 samo u proksimalnom dijelu. Kod ženki su primijećene iste razlike na D16 u proksimalnom i na D6 u distalnom dijelu debelog crijeva, ako se usporede s negativnom kontrolom (**slika 35**).



Slika 35 Kvantifikacija CLDN2-pozitivne površine u zoni upaljene sluznice debelog crijeva

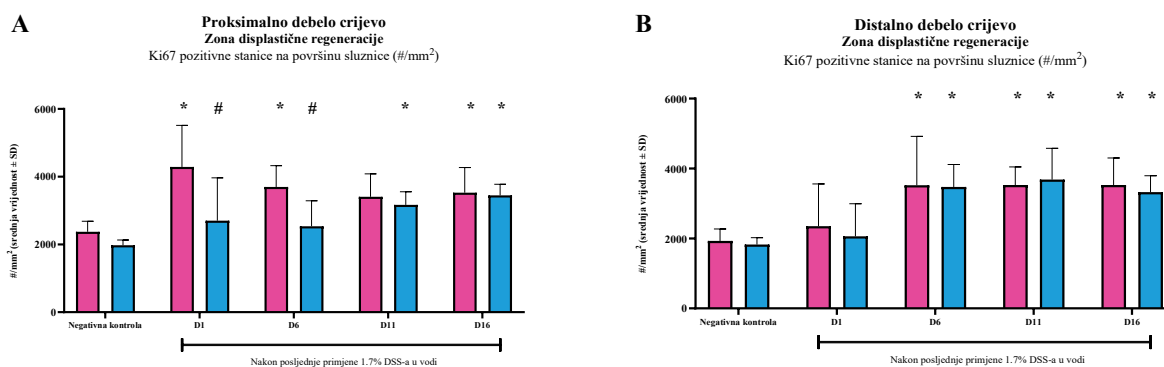
A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

*p < 0,05 nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, #p < 0,05 nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

5.7.3. Zona displastične regeneracije

Broj stanica u proliferaciji značajno raste kod oba spola u oba dijela debelog crijeva gotovo u svim promatranim vremenskim točkama nakon primjene DSS-a. U proksimalnom debelom crijevu značajne razlike između ženki i mužjaka uočene su već na D1 i D6 u korist ženki, dok takve promjene nisu vidljive odmah u distalnom debelom crijevu, gdje se razlike u većoj količini stanica u proliferaciji vide tek od D6. Broj Ki67-pozitivnih stanica raste kod ženki nakon primjene DSS-a, najprije u proksimalnom, a potom u distalnom dijelu debelog crijeva, pri čemu su na D1 zabilježene značajno veće vrijednosti u proksimalnom debelom crijevu (**slika 36**).



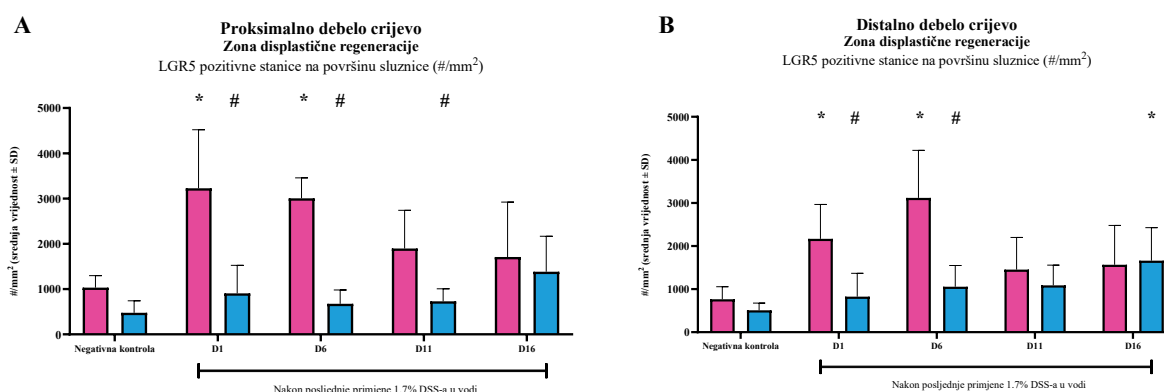
Slika 36 Kvantifikacija Ki67-pozitivnih stanica u zoni displastične regeneracije debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženka u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

Vrhunac povećanja LGR5-pozitivnih stanica kod ženki zabilježen je na D1 i D6 nakon posljednje primjene DSS-a u proksimalnom i distalnom debelom crijevu te se vide značajne razlike u odnosu na pripadajuću negativnu kontrolu. Na D1, D6 i D11 u proksimalnom dijelu debelog crijeva ženki zabilježen je značajno veći broj LGR5-pozitivnih stanica nego u istom dijelu crijeva kod mužjaka. Istovjetna situacija zabilježena je i u distalnom dijelu, na D1 i D6 nakon posljednje primjene DSS-a kod ženki u usporedbi s mužjacima. Također, u distalnom dijelu debelog crijeva kod mužjaka zabilježen je statistički značajno veći broj pozitivnih matičnih stanica baze kripe u odnosu na negativnu kontrolu (**slika 37**).



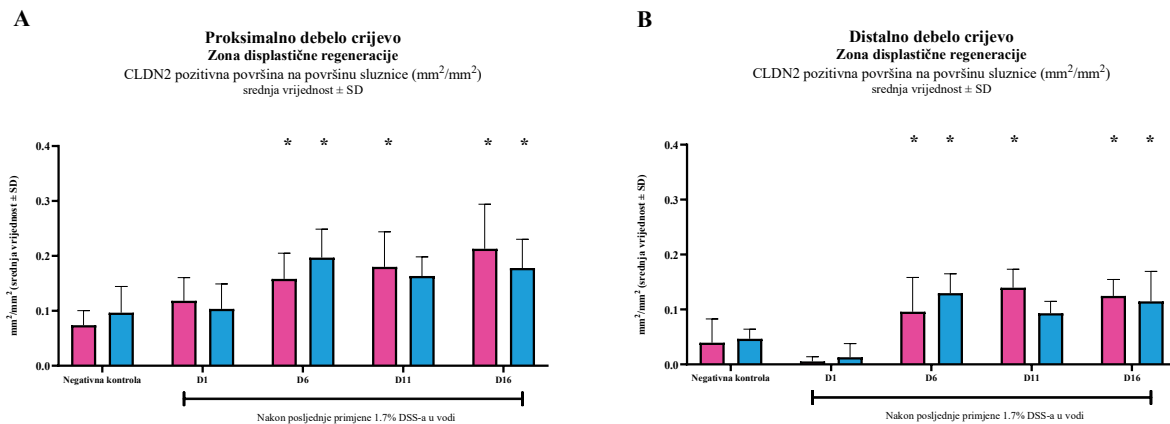
Slika 37 Kvantifikacija LGR5-pozitivnih stanica u zoni displastične regeneracije debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

CLDN2-pozitivna površina značajno se povećava kod ženki u promatranim vremenskim točkama D6, D11 i D16 proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva u usporedbi s negativnom kontrolnom skupinom. Kod mužjaka dolazi do povećanja pozitivne površine na D6 i D16 nakon posljednje primjene DSS-a u usporedbi s pripadajućom negativnom kontrolom (**slika 38**).



Slika 38 Kvantifikacija CLDN2-pozitivne površine u zoni displastične regeneracije debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

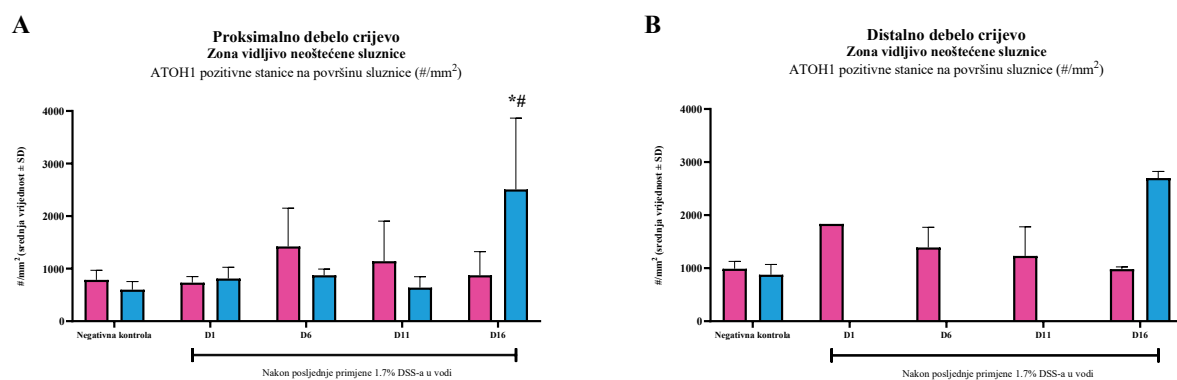
* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

5.8. DIGITALNA ANALIZA SEKRETORNIH EPITELNIH STANICA DEBELOG CRIJEVA

5.8.1. Zona vidljivo neoštećene sluznice

Broj sekretornih progenitorskih stanica značajno se povećava u proksimalnom debelom crijevu mužjaka na D16 u usporedbi s negativnom kontrolom i sa ženka u istom promatranom razdoblju. U distalnom debelom crijevu mužjaka nema zone vidljivo neoštećene sluznice na D1, D6 i D11 nakon posljednje primjene DSS-a (slika 39).



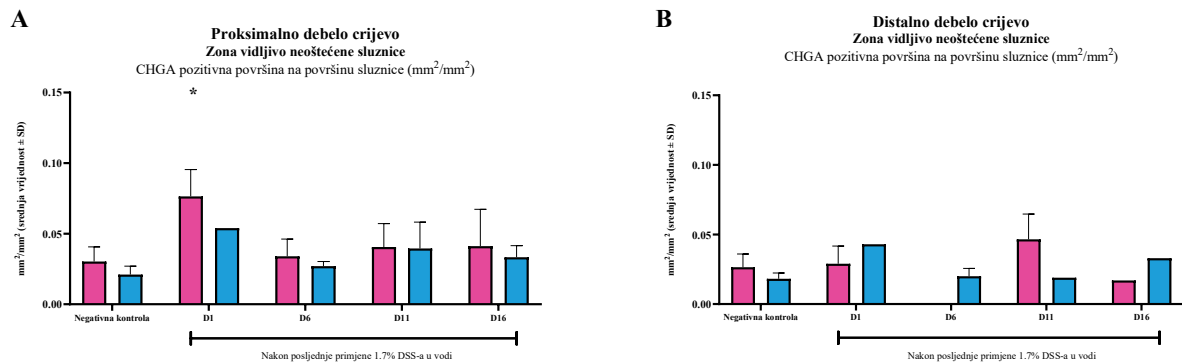
Slika 39 Kvantifikacija ATOH1-pozitivnih stanica u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženka u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

CHGA-pozitivna površina značajno se povećava kod ženki na D1 nakon posljednje primjene DSS-a u proksimalnom dijelu debelog crijeva, u usporedbi s negativnom kontrolom, nakon čega slijedi njezin pad. U distalnom debelom crijevu ženki na D6 nije prisutna zona vidljivo neoštećene sluznice (slika 40).



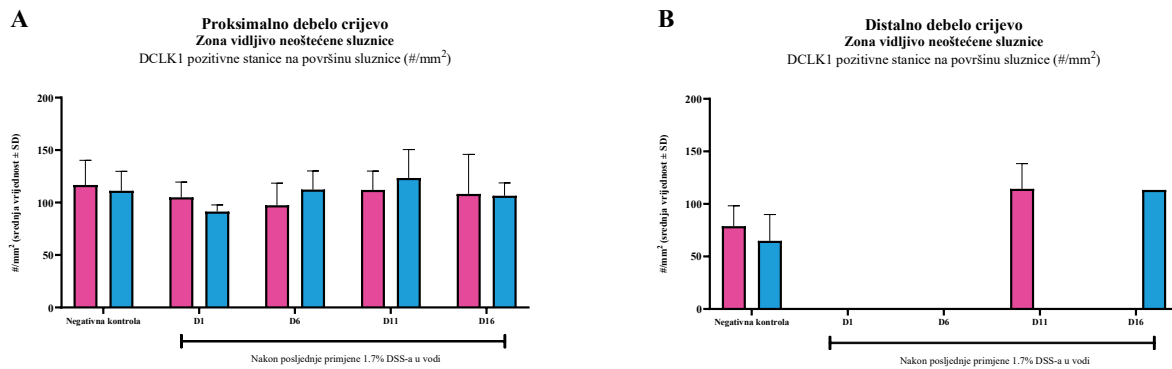
Slika 40 Kvantifikacija CHGA-pozitivne površine u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

Broj DCLK1-pozitivnih stanica ne mijenja se ni kod ženki ni kod mužjaka tijekom promatranih vremenskih točaka. U distalnom debelom crijevu mužjaka zona vidljivo neoštećene sluznice nije prisutna od D1 – D11, dok kod ženki u istom segmentu izostaje na D1 i D6 (**slika 41**).



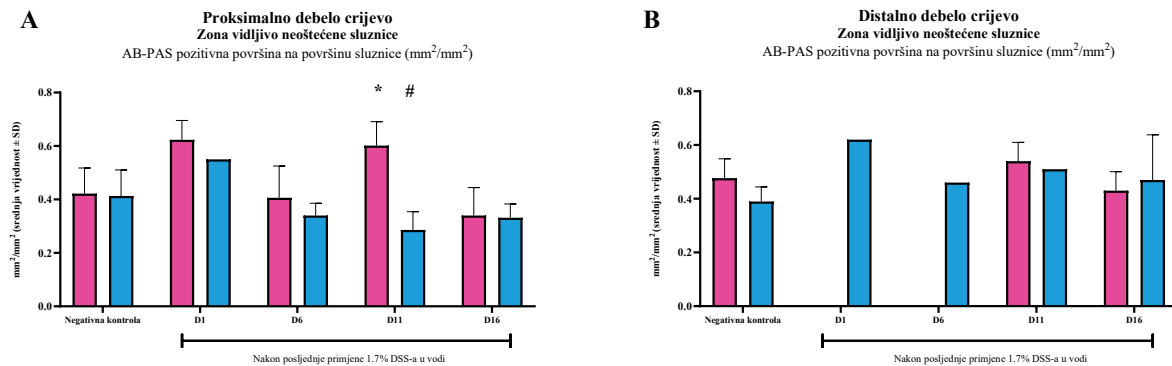
Slika 41 Kvantifikacija DCLK1-pozitivnih stanica u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

AB-PAS-pozitivna površina značajno raste na D11 u proksimalnom dijelu debelog crijeva ženki u odnosu na negativnu kontrolu te na istu vremensku točku kod mužjaka. U proksimalnom debelom crijevu ženki zona vidljivo neoštećene sluznice nije prisutna na D1 i D6 nakon posljednje primjene DSS-a (slika 42).



Slika 42 Kvantifikacija AB-PAS-pozitivne površine u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva

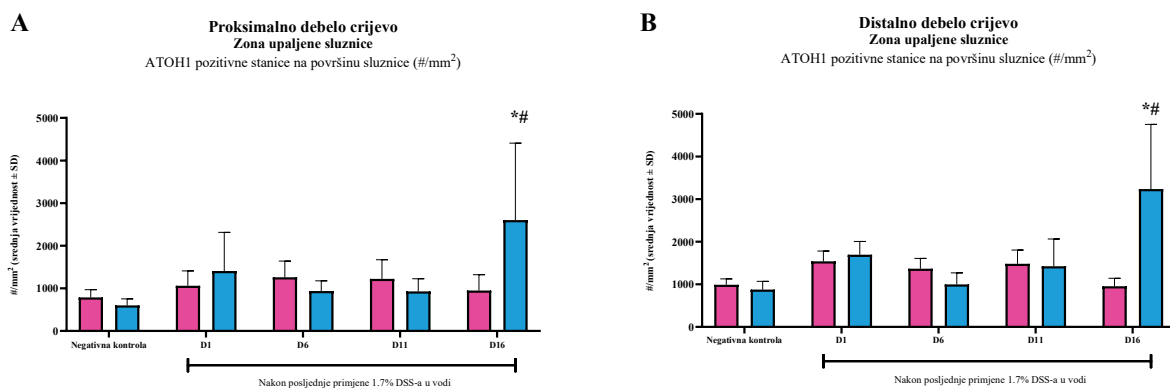
A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženka u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

5.8.2. Zona upaljene sluznice

Broj ATOH1-pozitivnih stanica značajno se povećava u proksimalnom i distalnom debelom crijevu mužjaka na D16 u usporedbi s negativnom kontrolom te sa ženkama u istom promatranom razdoblju (**slika 43**).



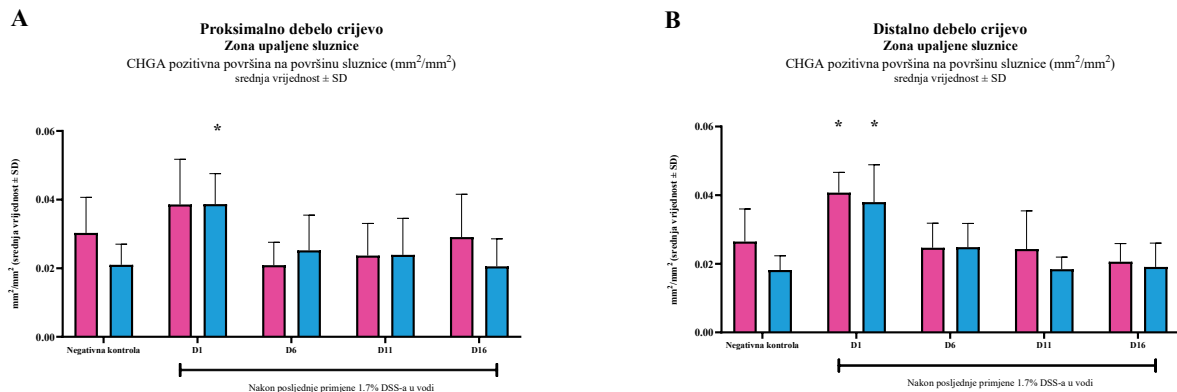
Slika 43 Kvantifikacija ATOH1-pozitivnih stanica u zoni upaljene sluznice debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

Površina enteroendokrinih stanica povećava se na D1 nakon primjene DSS-a kod ženki i mužjaka u proksimalnom i distalnom dijelu debelog crijeva, dok je u distalnom dijelu debelog crijeva u istom razdoblju zabilježen porast CHGA-pozitivne površine kod mužjaka u usporedbi s negativnom kontrolnom skupinom (**slika 44**).



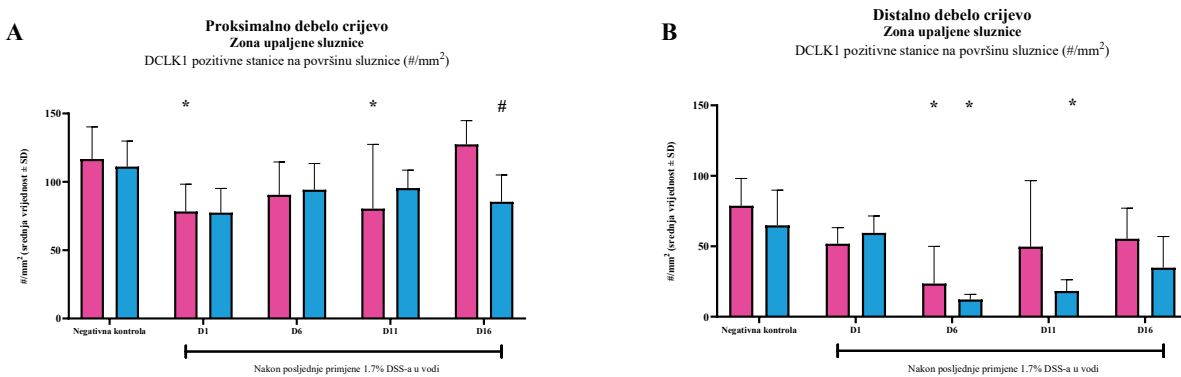
Slika 44 Kvantifikacija CHGA-pozitivne površine u zoni upaljene sluznice debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženka u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

Broj crijevnih kemosenzornih stanica u proksimalnom dijelu debelog crijeva ženki značajno se smanjuje na D1 i D11 nakon prestanka primjene DSS-a, u usporedbi s negativnom kontrolom. Posljednjeg promatranog dana ponovno se povećava te pokazuje značajnu razliku u odnosu na mužjake. U distalnom debelom crijevu zabilježeno je značajno smanjenje broja DCLK1-pozitivnih stanica kod ženki i mužjaka na D6, a dodatno i kod mužjaka na D11, u usporedbi s negativnom kontrolom (slika 45).



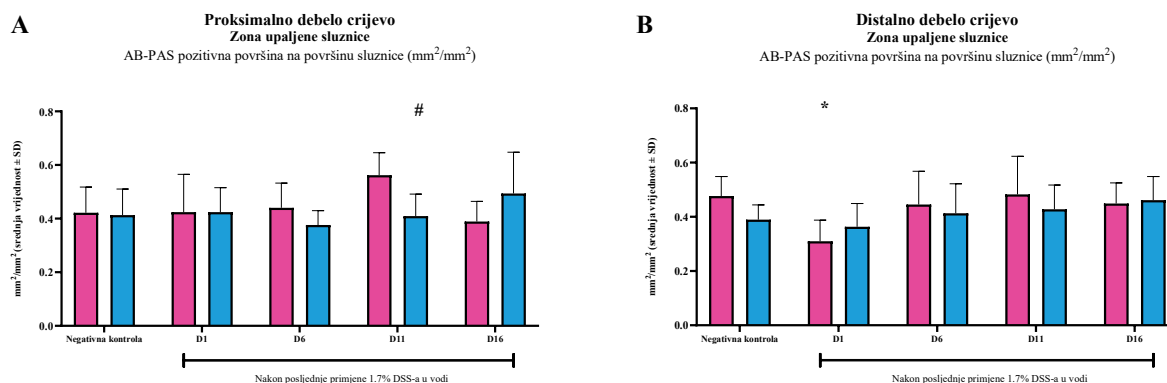
Slika 45 Kvantifikacija DCLK1-pozitivnih stanica u zoni upaljene sluznice debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženka u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

Površina vrčastih stanica obojenih AB-PAS metodom značajno je manja u proksimalnom debelom crijevu mužjaka u odnosu na ženke u zoni upaljene sluznice na D11. U distalnom debelom crijevu ženki površina vrčastih stanica značajno se smanjuje na D1 nakon posljednje primjene DSS-a, u usporedbi s negativnom kontrolom (**slika 46**).



Slika 46 Kvantifikacija AB-PAS-pozitivne površine u zoni upaljene sluznice debelog crijeva

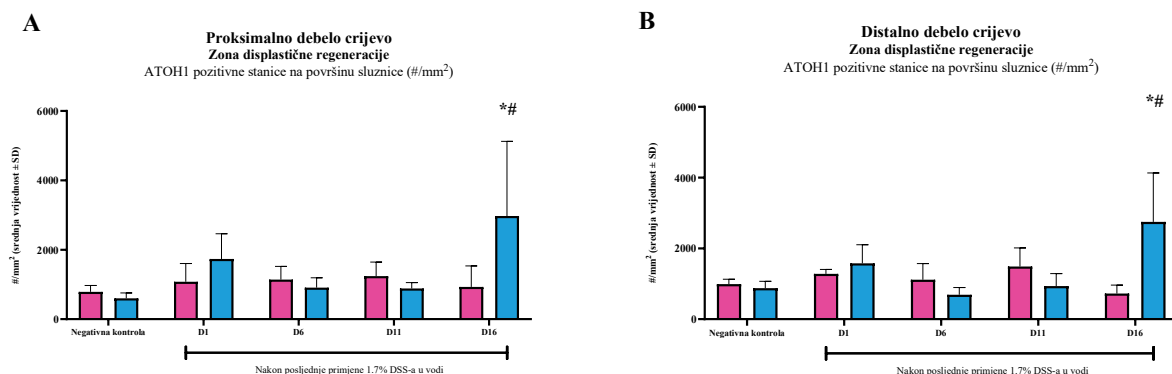
A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

5.8.3. Zona displastične regeneracije

Broj ATOH1-pozitivnih stanica značajno se povećava u zoni displastične regeneracije proksimalnog i distalnog debelog crijeva mužjaka na D16 u usporedbi s negativnom kontrolom te sa ženkama u istom promatranom razdoblju (**slika 47**).



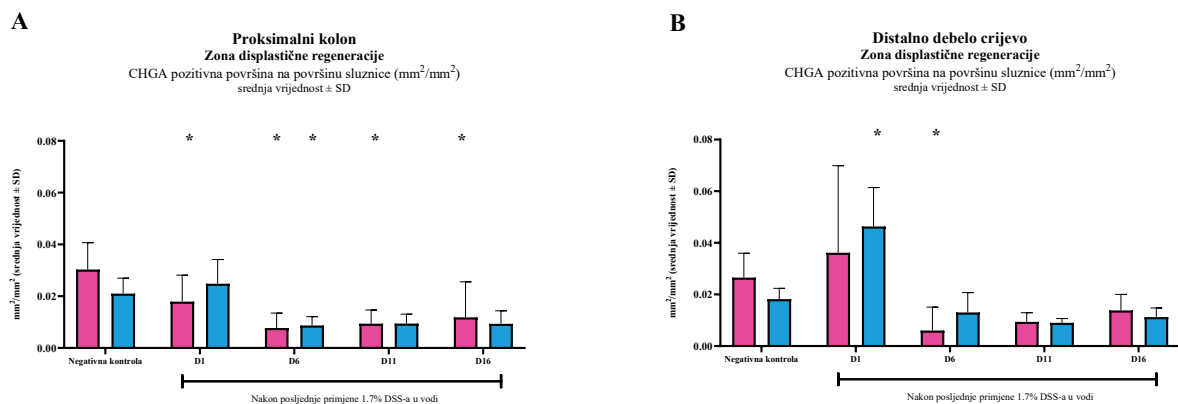
Slika 47 Kvantifikacija ATOH1-pozitivnih stanica u zoni displastične regeneracije debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

Površina enteroendokrinih stanica značajno se povećava u proksimalnom debelom crijevu na D1 kod ženki, da bi se od D6 do D16 značajno smanjila u usporedbi s negativnom kontrolnom skupinom. U istom dijelu debelog crijeva kod mužjaka zabilježena je značajno manja CHGA-pozitivna površina na D6 u odnosu na negativnu kontrolu. Analizirajući CHGA-pozitivnu površinu u debelom crijevu, uočena je statistički veća površina kod mužjaka na D1 u odnosu na negativnu kontrolu, dok je kod ženki u istom segmentu crijeva zabilježena statistički manja površina na D6 nakon posljednje primjene DSS-a u usporedbi s pripadajućom negativnom kontrolom (**slika 48**).



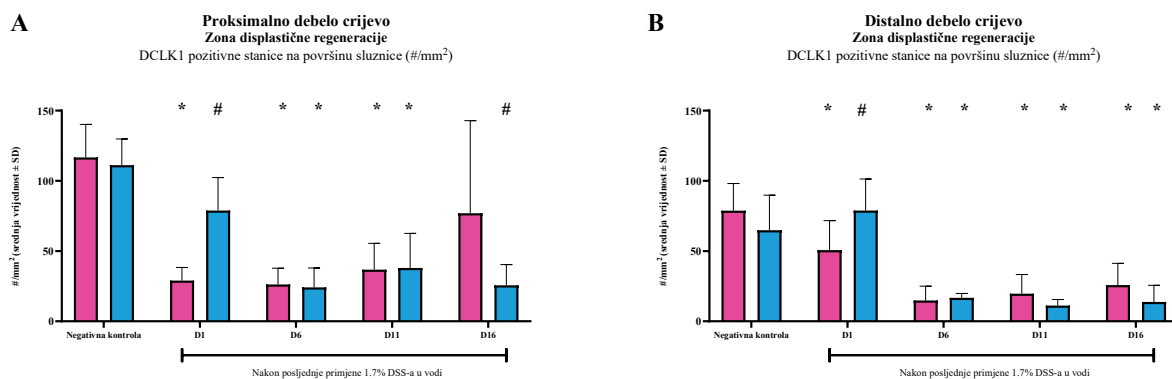
Slika 48 Kvantifikacija CHGA-pozitivne površine u zoni displastične regeneracije debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

U proksimalnom i distalnom debelom crijevu ženki i mužjaka vidljiv je trend smanjenja broja crijevnih kemosenzornih stanica nakon primjene DSS-a, pri čemu je na D1 zabilježen značajno veći broj pozitivnih stanica kod mužjaka u odnosu na ženke. Nadalje, u proksimalnom debelom crijevu na D16 dolazi do značajnog povećanja broja tih stanica kod ženki u usporedbi s mužjacima. U razdobljima D6 i D11 u proksimalnom te D6 – D16 u distalnom dijelu debelog crijeva zabilježen je značajan pad broja DCLK1-pozitivnih stanica kod oba spola u usporedbi s pripadajućom negativnom kontrolom (**slika 49**).



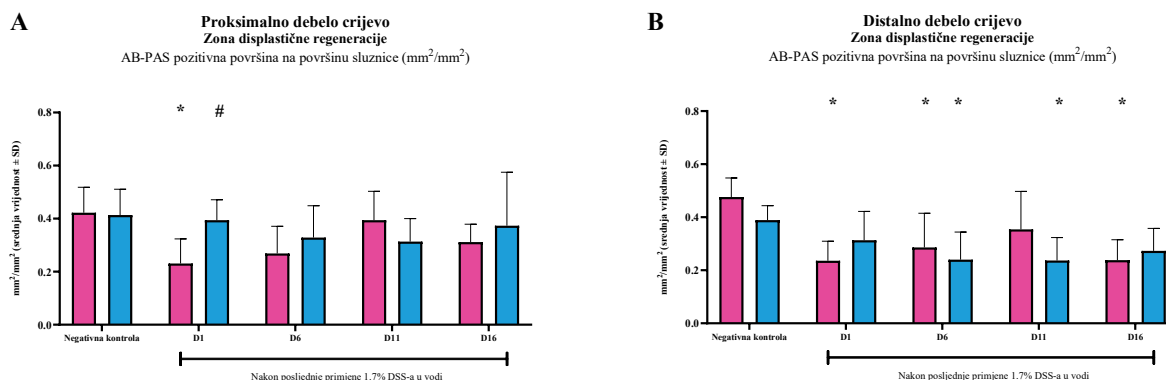
Slika 49 Kvantifikacija DCLK1-pozitivnih stanica u zoni displastične regeneracije debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženka u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

Pozitivna površina vrčastih stanica označena AB-PAS bojenjem značajno je manja u proksimalnom debelom crijevu ženki na D1 u usporedbi s negativnom kontrolom i istim razdobljem kod mužjaka. U distalnom debelom crijevu značajno pada površina vrčastih stanica na D1 i D6 kod ženki te na D6 i D11 nakon posljednje primjene DSS-a kod mužjaka u usporedbi s pripadajućom negativnom kontrolom (**slika 50**).



Slika 50 Kvantifikacija AB-PAS-pozitivne površine u zoni displastične regeneracije debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

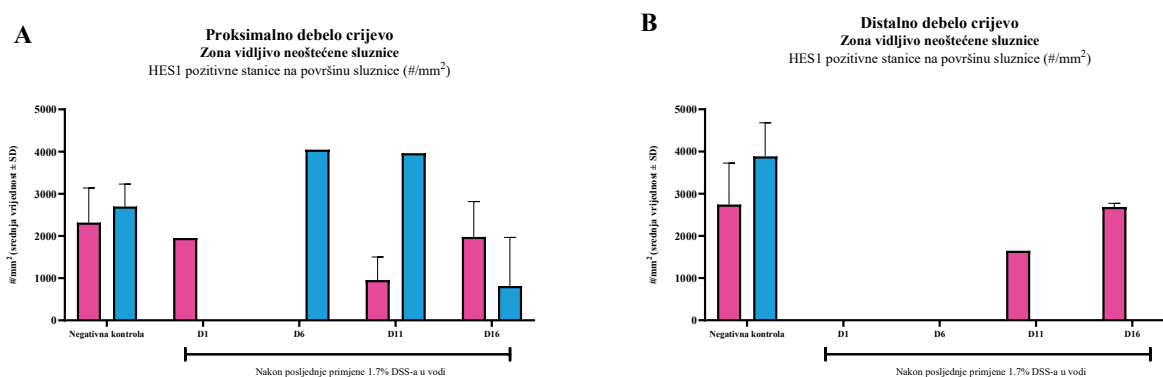
*p < 0,05 nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, #p < 0,05 nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

5.9. DIGITALNA ANALIZA APSORPTIVNIH EPITELNIH STANICA DEBELOG CRIJEVA

5.9.1. Zona vidljivo neoštećene sluznice

Nisu uočene značajne razlike u broju HES1-pozitivnih stanica u proksimalnom i distalnom debelom crijevu ženki i mužjaka, što se može pripisati malom broju uzoraka koji su sadržavali zonu vidljivo neoštećene sluznice. Naime, u skupinama D1 kod mužjaka i D6 kod ženki u proksimalnom te u skupinama D1, D6, D11 i D16 kod mužjaka te D1 i D6 kod ženki u distalnom dijelu debelog crijeva nije zabilježena zona vidljivo neoštećene sluznice (**slika 51**).



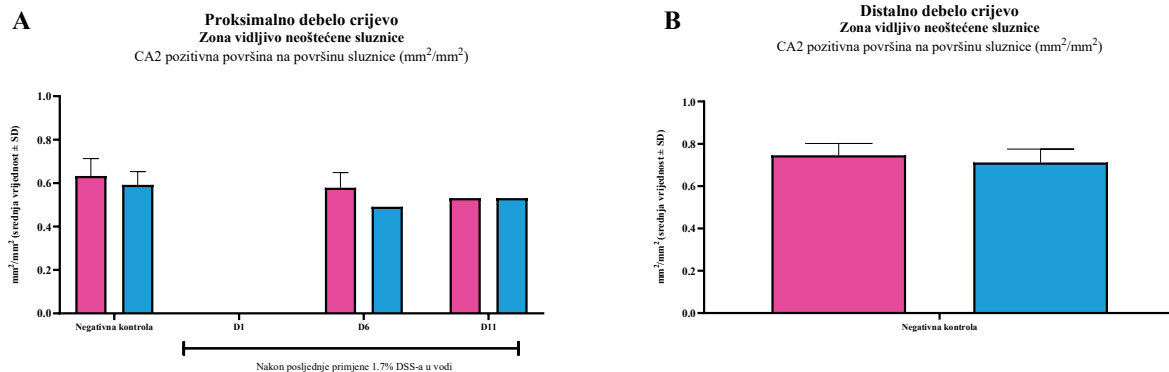
Slika 51 Kvantifikacija HES1-pozitivnih stanica u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženka u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

U kvantifikaciji digitalnim patološkim softverom također nisu uočene značajne razlike u CA2-pozitivnoj površini u proksimalnom i distalnom debelom crijevu ženki i mužjaka, što se može pripisati malom broju uzoraka koji su sadržavali zonu vidljivo neoštećene sluznice. Kod oba spola, u razdobljima D1 i D16 u proksimalnom te u svim razdobljima distalnog dijela debelog crijeva nije zabilježena zona vidljivo neoštećene sluznice (**slika 52**).



Slika 52 Kvantifikacija CA2-pozitivne površine u zoni vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva

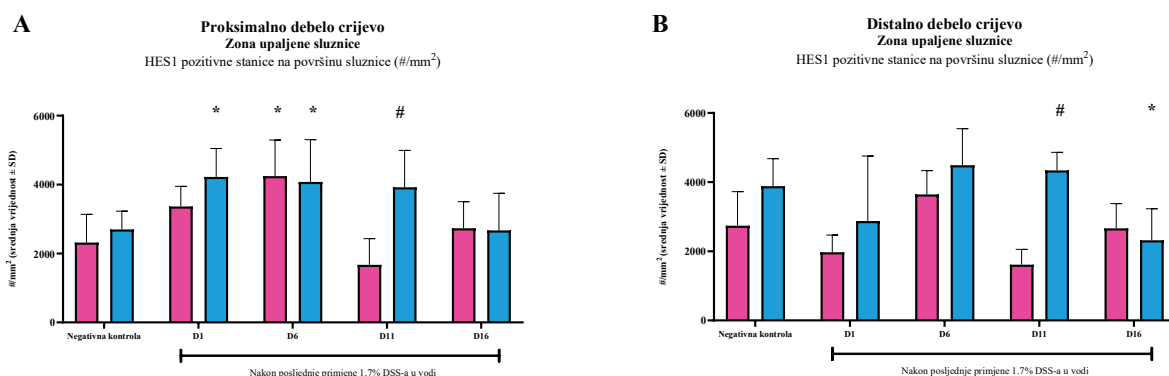
A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

5.9.2. Zona upaljene sluznice

Broj HES1-pozitivnih stanica značajno se povećava kod ženki i mužjaka u proksimalnom debelom crijevu na D6 nakon posljednje primjene DSS-a, a kod ženki i na D1, u usporedbi s negativnom kontrolom. Nasuprot tome, na D16 u distalnom dijelu debelog crijeva zabilježen je značajan pad broja pozitivnih stanica kod mužjaka u odnosu na negativnu kontrolu. U vremenskoj točki D11 u mužjaka je utvrđen značajan porast broja pozitivnih apsorptivnih progenitorskih stanica u proksimalnom i distalnom debelom crijevu u usporedbi sa ženkama (slika 53).



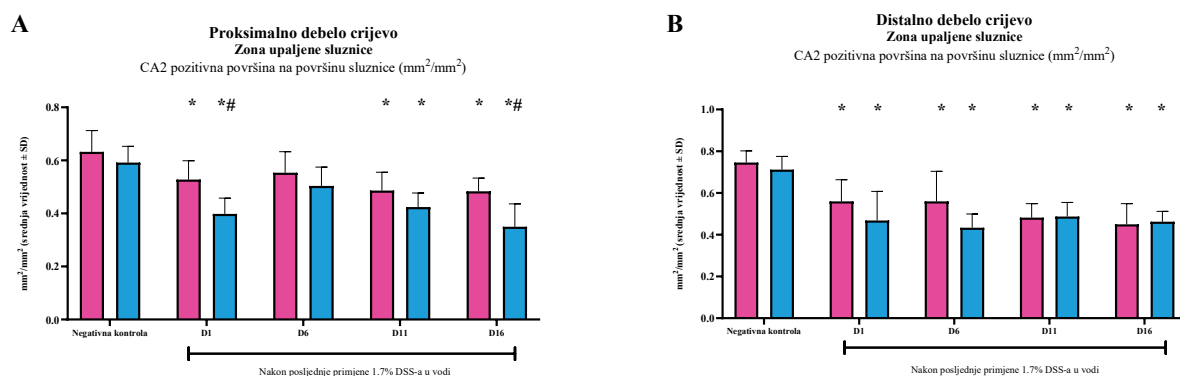
Slika 53 Kvantifikacija HES1-pozitivnih stanica u zoni upaljene sluznice debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

CA2-pozitivna površina u sluznici debelog crijeva značajno se smanjuje u debelom crijevu ženki i mužjaka kod kojih je primijenjen DSS u svim vremenskim točkama distalnog debelog crijeva, dok je u proksimalnom debelom crijevu slična situacija, osim na D6. Prvi i zadnji dan (D1 i D16) razdoblja nakon posljednje primjene DSS-a u proksimalnom debelom crijevu zabilježena je značajno manja CA2-pozitivna površina kod mužjaka nego kod ženki (**slika 54**).



Slika 54 Kvantifikacija CA2-pozitivne površine u zoni upaljene sluznice debelog crijeva

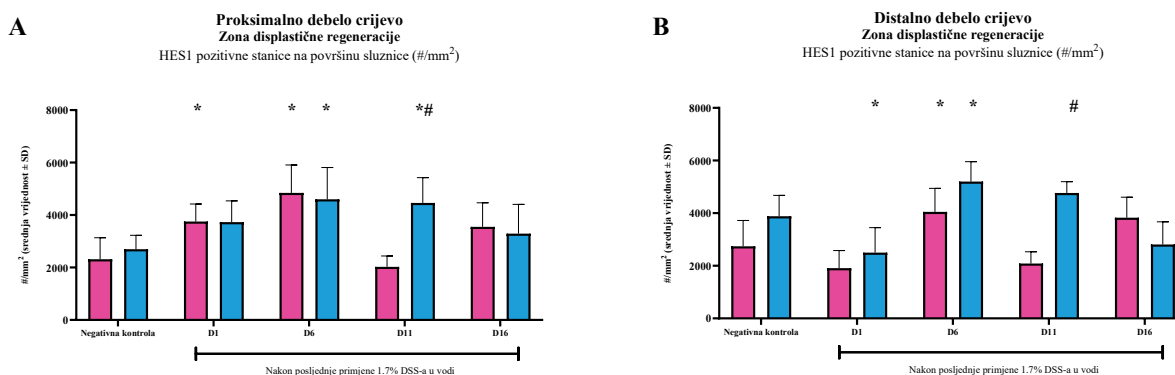
A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

5.9.3. Zona displastične regeneracije

Broj apsorptivnih progenitorskih stanica značajno se povećava u proksimalnom i distalnom dijelu debelog crijeva kod ženki i mužjaka nakon primjene DSS-a, s vrhuncem na D6, nakon čega postupno opada. Na D11 nakon posljednje primjene DSS-a, u oba dijela debelog crijeva, mužjaci pokazuju značajno više pozitivnih stanica u usporedbi sa ženkama. U oba dijela debelog crijeva i kod oba spola na D6 nakon posljednje primjene DSS-a značajno je više HES1-pozitivnih stanica u odnosu na pripadajuću negativnu kontrolu. Na D1 nakon posljednje primjene DSS-a u proksimalnom dijelu ženki zabilježen je veći broj, a u distalnom dijelu debelog crijeva mužjaka zabilježen je manji broj apsorptivnih progenitorskih stanica u odnosu na negativnu kontrolu (**slika 55**).



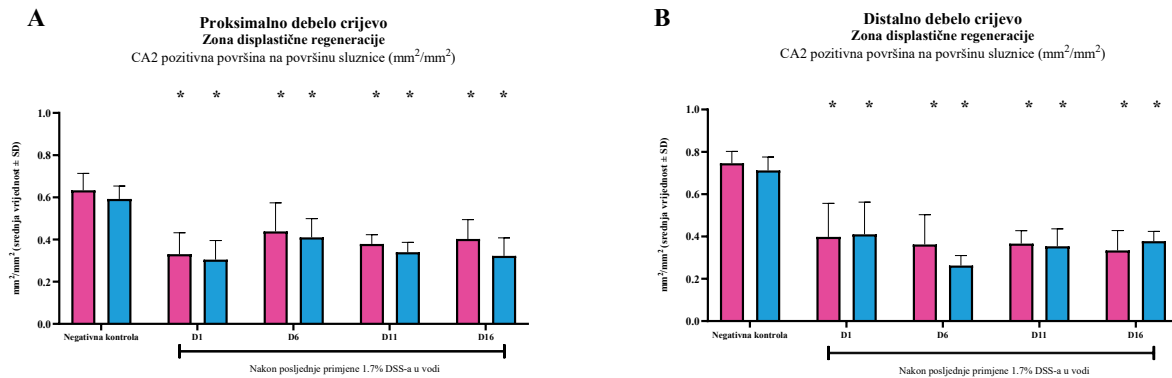
Slika 55 Kvantifikacija HES1-pozitivnih stanica u zoni displastične regeneracije debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženkama u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

CA2-pozitivna površina značajno se smanjuje u debelom crijevu ženki i mužjaka kod kojih je primijenjen DSS u svim vremenskim točkama proksimalnog i distalnog debelog crijeva. U svim promatranim vremenskim točkama nakon posljednje primjene DSS-a statistički je manja površina apsorptivnih stanica u oba spola i u oba dijela debelog crijeva u usporedbi s negativnom kontrolom (slika 56).



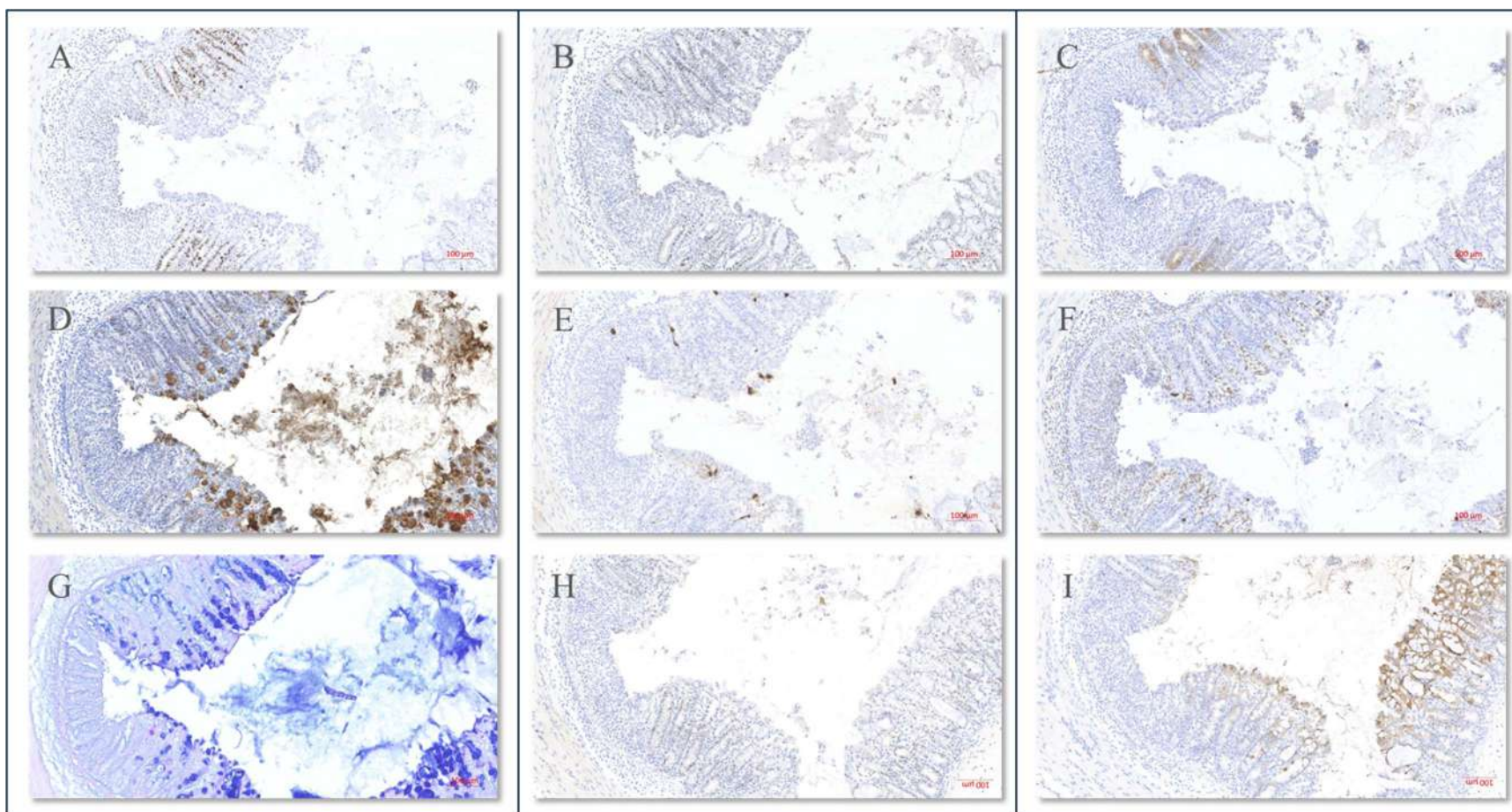
Slika 56 Kvantifikacija CA2-pozitivne površine u zoni displastične regeneracije debelog crijeva

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

* $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj negativnoj kontrolnoj skupini, # $p < 0,05$ nasuprot ženka u odgovarajućoj skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

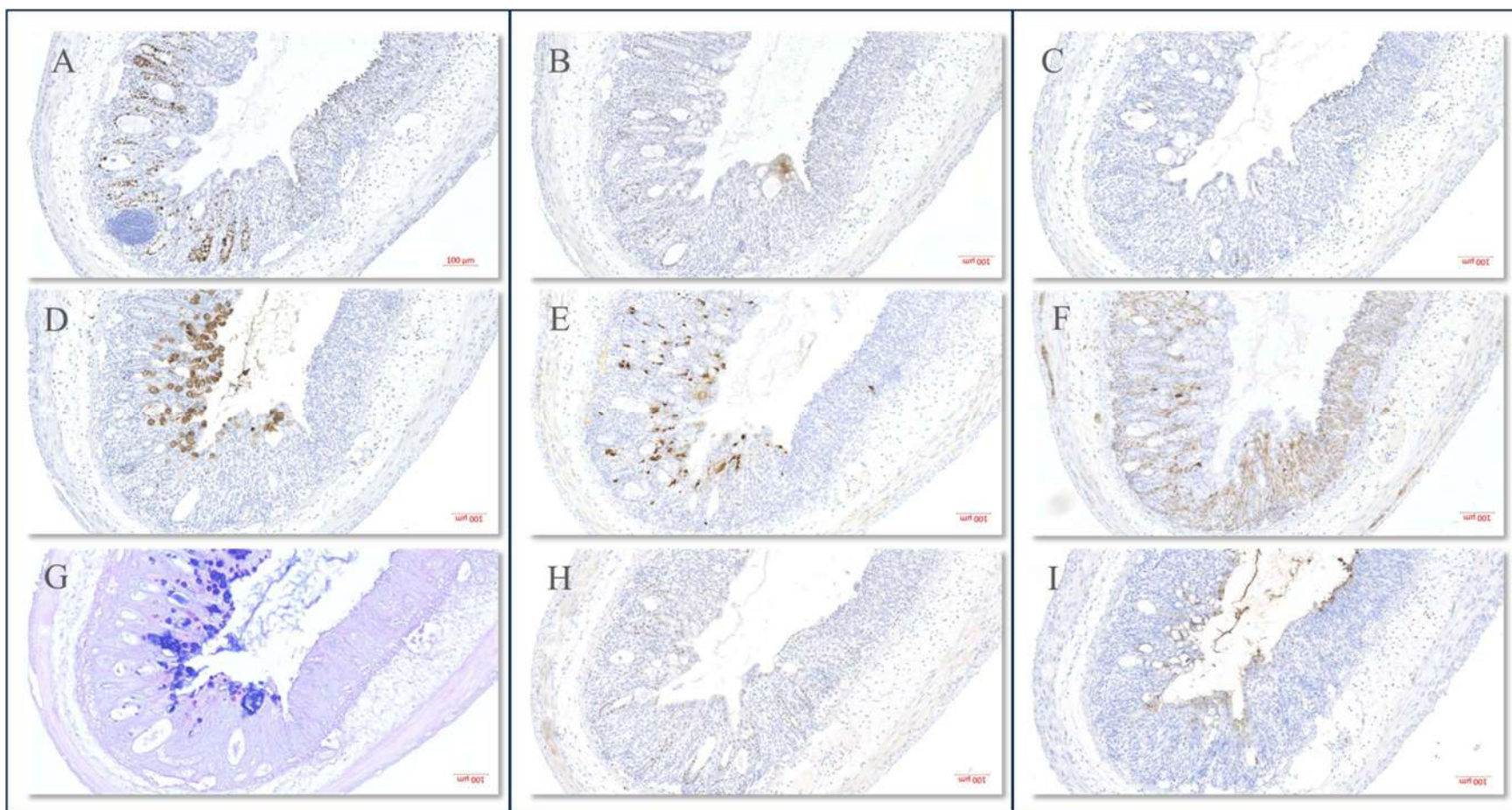
Reprezentativne histološke slike IHC Ki67, IHC LGR5, IHC CLDN2, IHC ATOH1, IHC CHGA, IHC DCLK1, AB-PAS, IHC HES1 i IHC CA2 bojenja na proksimalnom i distalnom dijelu debelog crijeva ženki i mužjaka za D1, D6, D11 i D16 nakon posljednje primjene DSS-a prikazane su na slikama 57- 64.



Slika 57 Reprezentativne histološke slike proksimalnog debelog crijeva ženki na D1 nakon posljednje primjene DSS-a

A) IHC Ki67. B) IHC LGR5. C) IHC CLDN2. D) IHC ATOH1. E) IHC CHGA. F) IHC DCLK1. G) AB-PAS. H) IHC HES1. I) IHC CA2.

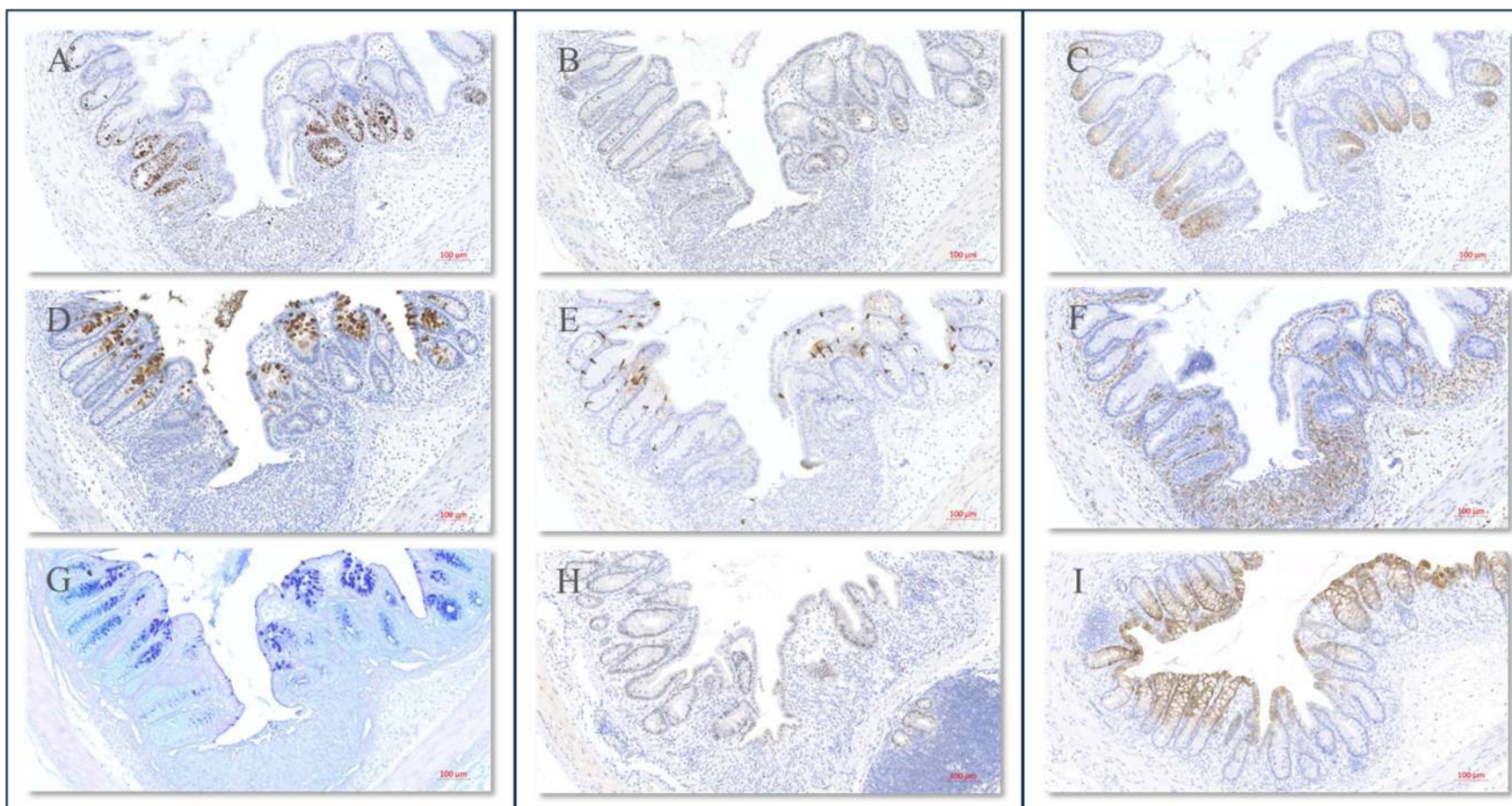
Slika prikazana pri digitalnom povećanju 10x, Zen softver, Zeiss. Skala: 100 µm.



Slika 58 Reprezentativne histološke slike distalnog debelog crijeva mužjaka na D1 nakon posljednje primjene DSS-a

A) IHC Ki67. B) IHC LGR5. C) IHC CLDN2. D) IHC ATOH1. E) IHC CHGA. F) IHC DCLK1. G) AB-PAS. H) IHC HES1. I) IHC CA2.

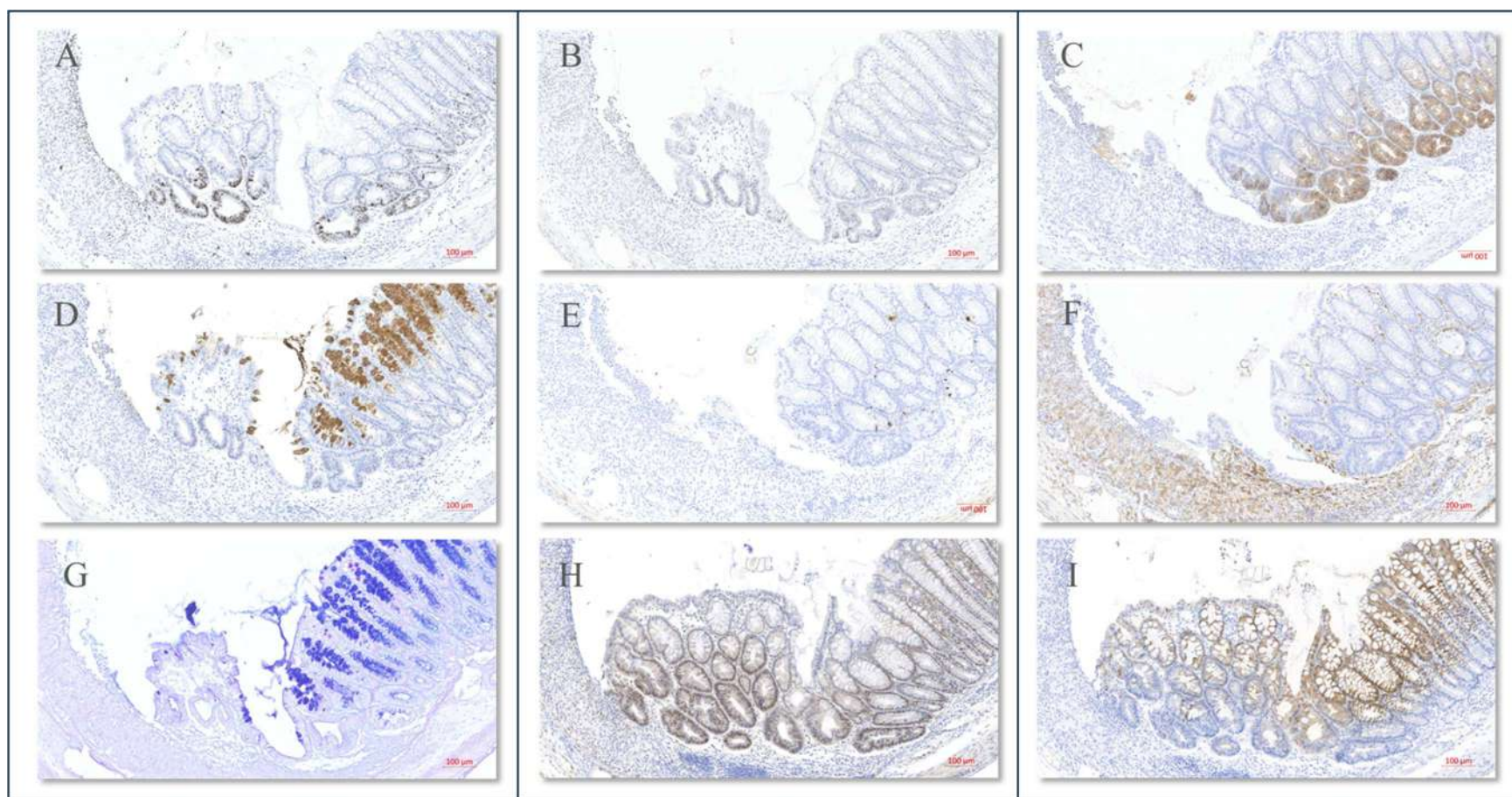
Slika prikazana pri digitalnom povećanju 10x, Zen softver, Zeiss. Skala: 100 µm.



Slika 59 Reprezentativne histološke slike distalnog debelog crijeva ženki na D6 nakon posljednje primjene DSS-a

A) IHC Ki67. B) IHC LGR5. C) IHC CLDN2. D) IHC ATOH1. E) IHC CHGA. F) IHC DCLK1. G) AB-PAS. H) IHC HES1. I) IHC CA2.

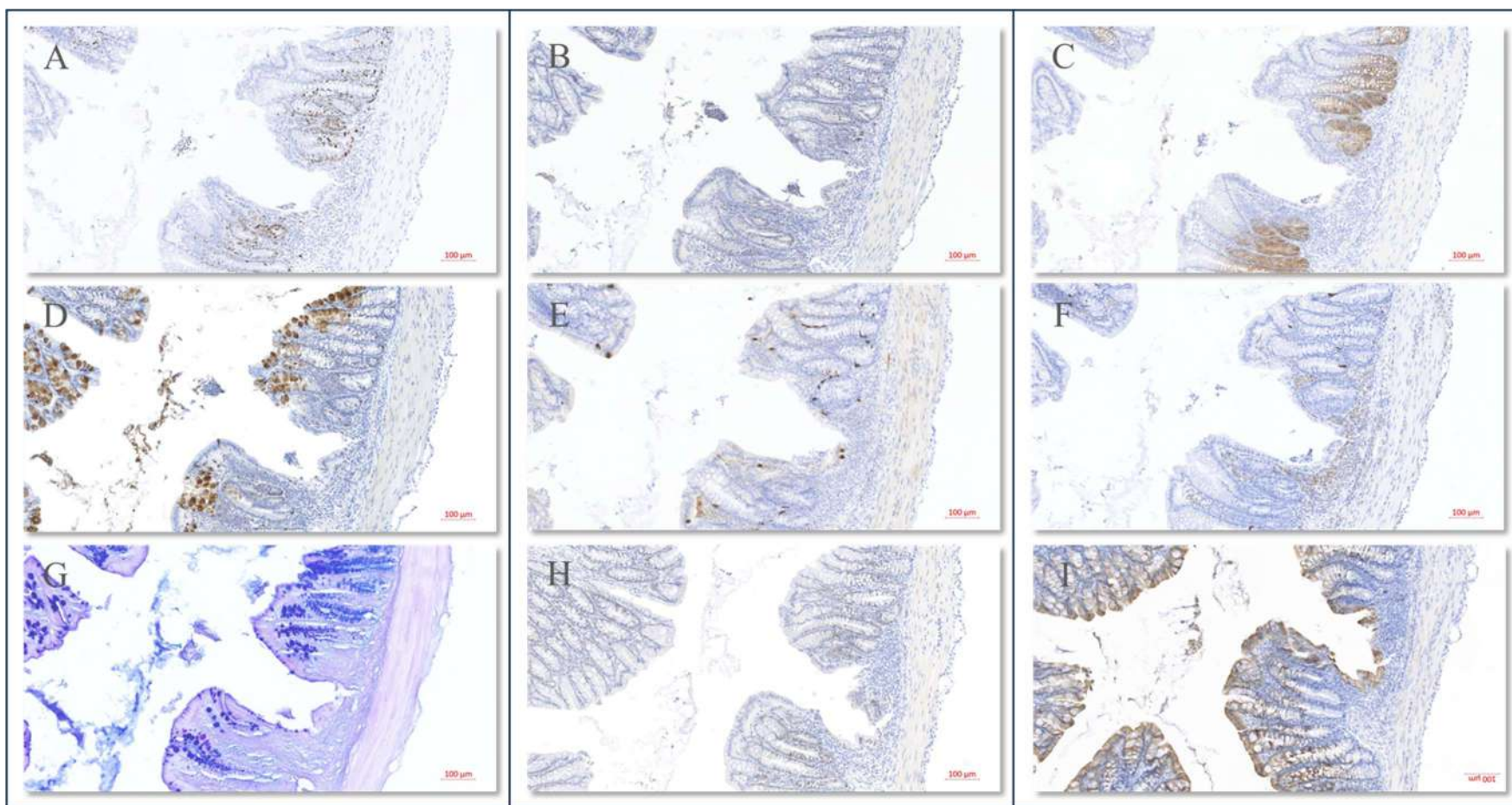
Slika prikazana pri digitalnom povećanju 10x, Zen softver, Zeiss. Skala: 100 µm.



Slika 60 Reprezentativne histološke slike proksimalnog debelog crijeva mužjaka na D6 nakon posljednje primjene DSS-a

A) IHC Ki67. B) IHC LGR5. C) IHC CLDN2. D) IHC ATOH1. E) IHC CHGA. F) IHC DCLK1. G) AB-PAS. H) IHC HES1. I) IHC CA2.

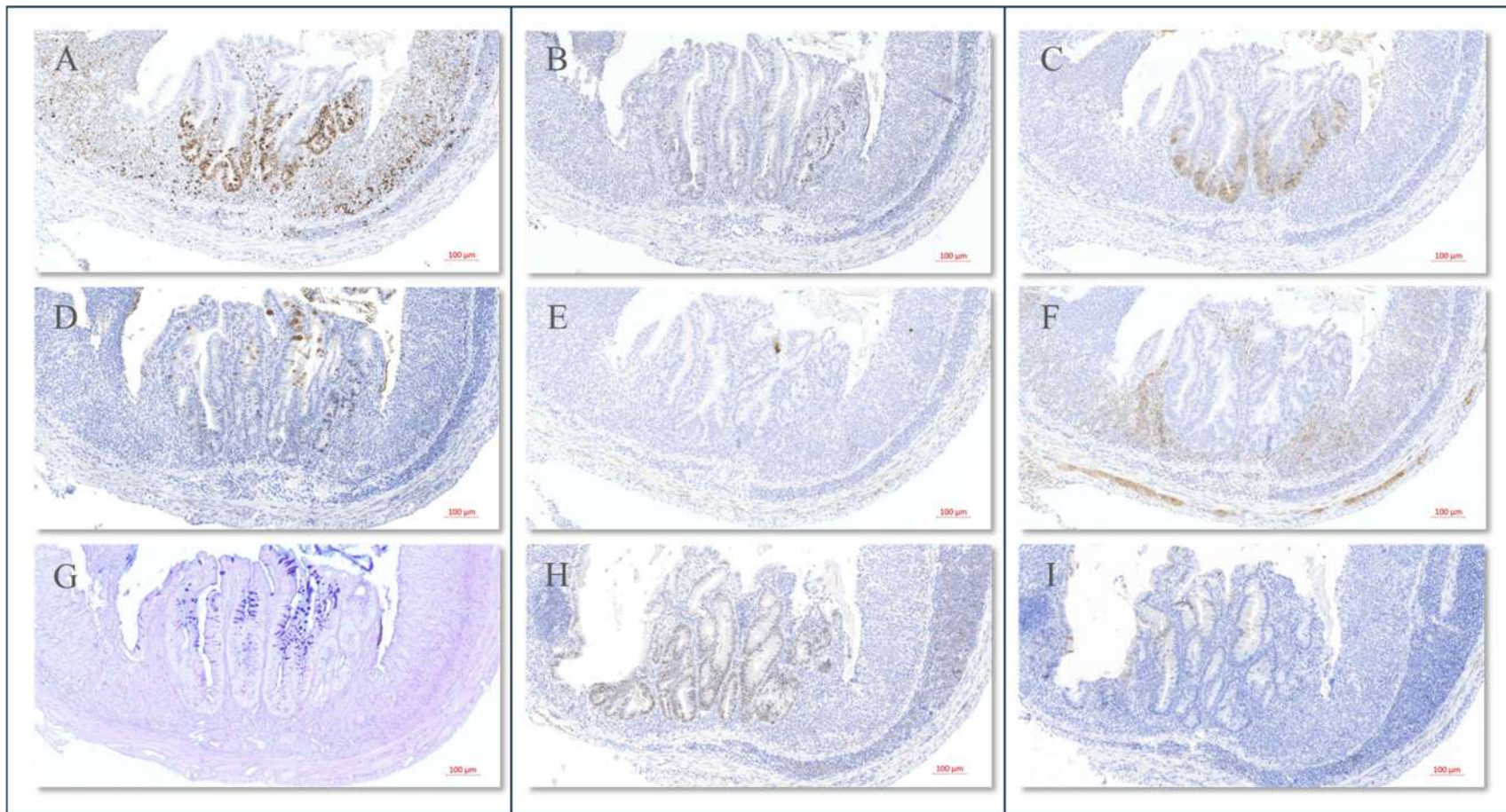
Slika prikazana pri digitalnom povećanju 10x, Zen softver, Zeiss. Skala: 100 µm.



Slika 61 Reprezentativne histološke slike proksimalnog debelog crijeva ženki na D11 nakon posljednje primjene DSS-a

A) IHC Ki67. B) IHC LGR5. C) IHC CLDN2. D) IHC ATOH1. E) IHC CHGA. F) IHC DCLK1. G) AB-PAS. H) IHC HES1. I) IHC CA2.

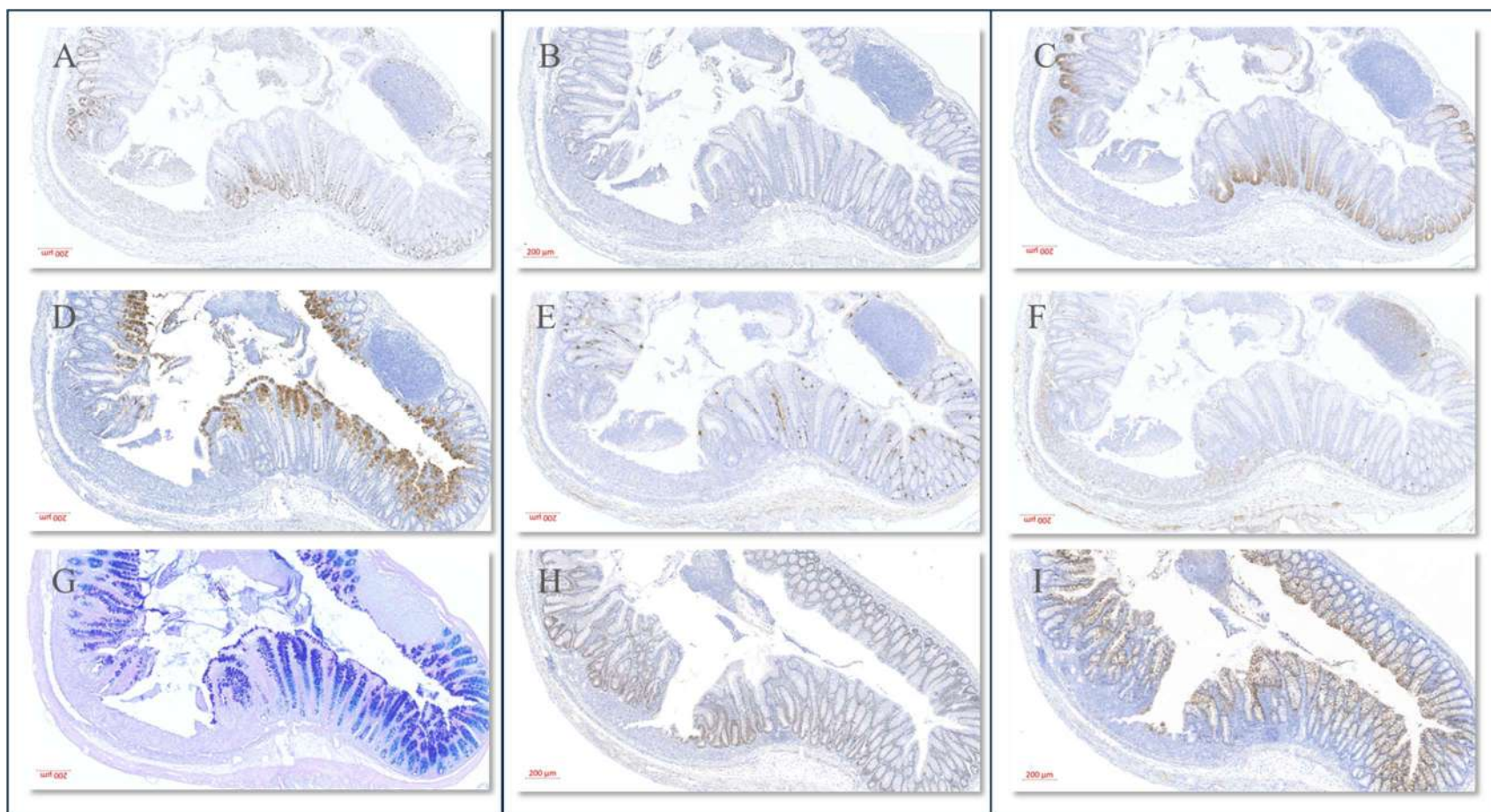
Slika prikazana pri digitalnom povećanju 10x, Zen softver, Zeiss. Skala: 100 µm.



Slika 62 Reprezentativne histološke slike distalnog debelog crijeva mušjaka na D11 nakon posljednje primjene DSS-a

A) IHC Ki67. B) IHC LGR5. C) IHC CLDN2. D) IHC ATOH1. E) IHC CHGA. F) IHC DCLK1. G) AB-PAS. H) IHC HES1. I) IHC CA2.

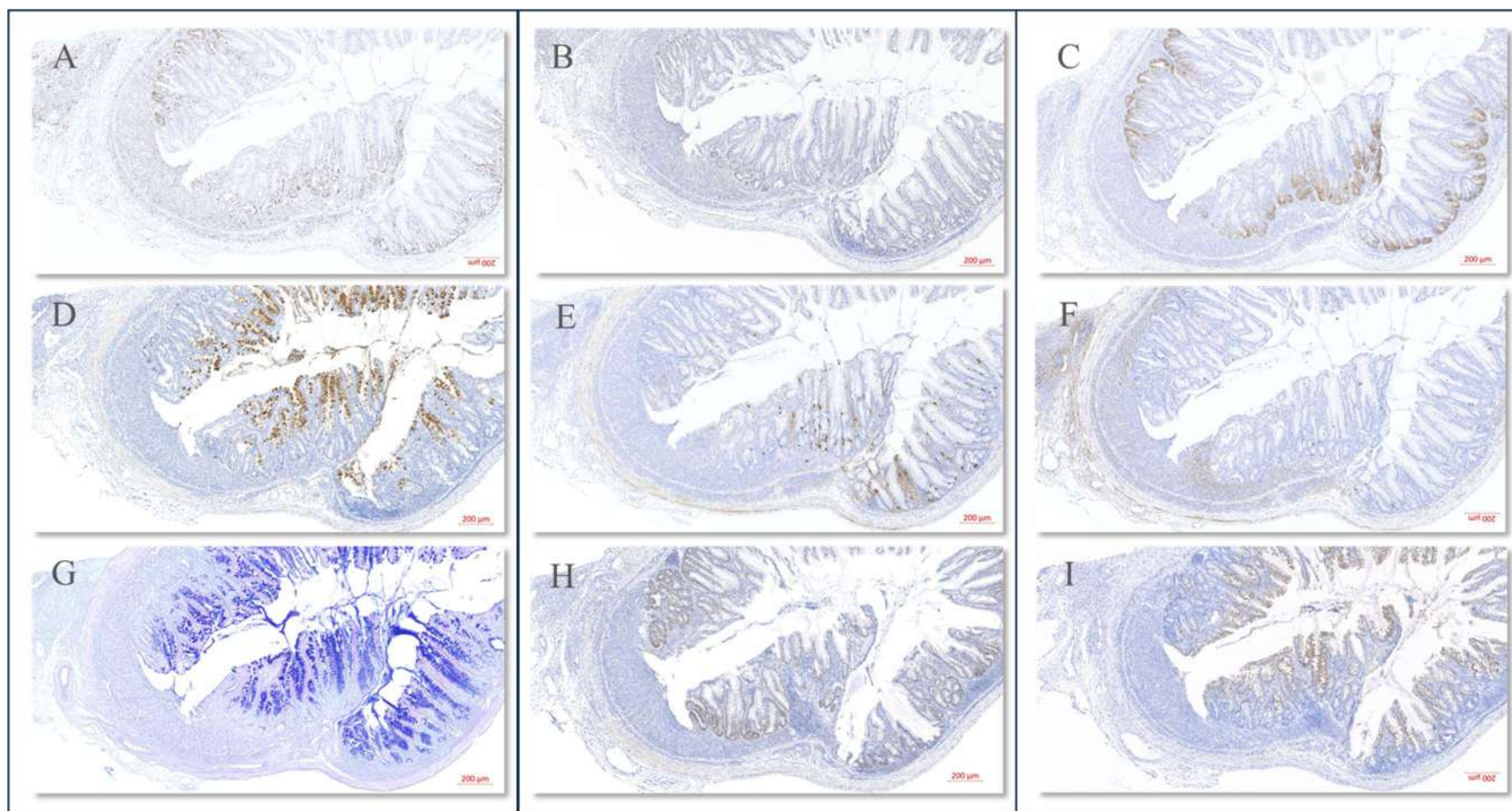
Slika prikazana pri digitalnom povećanju 10x, Zen softver, Zeiss. Skala: 100 µm.



Slika 63 Reprezentativne histološke slike distalnog debelog crijeva ženki na D16 nakon posljednje primjene DSS-a

A) IHC Ki67. B) IHC LGR5. C) IHC CLDN2. D) IHC ATOH1. E) IHC CHGA. F) IHC DCLK1. G) AB-PAS. H) IHC HES1. I) IHC CA2.

Slika prikazana pri digitalnom povećanju 5x, Zen softver, Zeiss. Skala: 200 µm.



Slika 64 Reprezentativne histološke slike proksimalnog debelog crijeva mušjaka na D16 nakon posljednje primjene DSS-a

A) IHC Ki67. B) IHC LGR5. C) IHC CLDN2. D) IHC ATOH1. E) IHC CHGA. F) IHC DCLK1. G) AB-PAS. H) IHC HES1. I) IHC CA2.

Slika prikazana pri digitalnom povećanju 5x, Zen softver, Zeiss. Skala: 200 µm.

5.10. ANALIZA POVEZANOSTI EPITELNIH BILJEGA DEBELOG CRIJEVA

U analizi povezanosti epitelnih biljega debelog crijeva međusobno su uspoređene vrijednosti Ki67, LGR5, CLDN2, ATOH1, CHGA, DCLK1, AB-PAS, HES1 i CA2 u negativnoj kontrolnoj skupini te zajednički za razdoblja D1, D6, D11 i D16 nakon posljednje primjene DSS-a u zoni vidljivo neoštećene sluznice, upaljene sluznice i displastične regeneracije.

Pearsonova korelacija u GraphPad Prism softveru korištena je za međusobnu usporedbu podataka dobivenih softverom za digitalnu patologiju. U rezultatima su prikazane tablice s r-vrijednostima, dok je jakost korelacije određena prema literaturi (EVANS, 1996) (**tablica 13**).

Tablica 13 Raspon i jakost korelacije (r)

Raspon korelacije	Jakost korelacije
1.000	vrlo jaka
0.900	
0.800	
0.700	jaka
0.600	
0.500	
0.400	umjerena
0.300	
0.200	
0.100	vrlo slaba
0.000	
-0.100	
-0.200	slaba
-0.300	
-0.400	
-0.500	umjerena
-0.600	
-0.700	
-0.800	jaka
-0.900	
-1.000	

5.10.1. Povezanost epitelnih biljega negativne kontrolne skupine

Analiza je u negativnoj kontroli proksimalnog debelog crijeva ženki pokazala statistički značajnu jaku pozitivnu korelaciju između Ki67- i LGR5-pozitivnih stanica te između CHGA- i AB-PAS-pozitivne površine, kao i između DCLK1-pozitivnih stanica i AB-PAS-pozitivne površine. Jaka negativna korelacija u istom dijelu debelog crijeva ženki uočena je između DCLK1-pozitivnih stanica i CA2-pozitivne površine (**tablica 14**).

Tablica 14 Povezanost epitelnih biljega u negativnoj kontroli proksimalnog dijela debelog crijeva ženki

U tablici su prikazane r vrijednosti.

Proksimalni dio debelog crijeva ženki									
Negativna kontrolna skupina									
Biljezi	Ki67	LGR5	CLDN2	ATOH1	CHGA	DCLK1	AB-PAS	HES1	CA2
Ki67	1.000	0.714	0.307	0.513	0.172	0.211	-0.176	-0.446	-0.235
LGR5	0.714	1.000	0.035	0.534	-0.003	0.289	0.066	-0.254	-0.143
CLDN2	0.307	0.035	1.000	0.153	0.480	0.359	0.085	-0.561	-0.613
ATOH1	0.513	0.534	0.153	1.000	0.205	-0.193	-0.143	-0.389	0.256
CHGA	0.172	-0.003	0.480	0.205	1.000	0.606	0.648	-0.316	-0.349
DCLK1	0.211	0.289	0.359	-0.193	0.606	1.000	0.673	-0.091	-0.623
AB-PAS	-0.176	0.066	0.085	-0.143	0.648	0.673	1.000	0.368	-0.373
HES1	-0.446	-0.254	-0.561	-0.389	-0.316	-0.091	0.368	1.000	0.265
CA2	-0.235	-0.143	-0.613	0.256	-0.349	-0.623	-0.373	0.265	1.000

U distalnom dijelu debelog crijeva ženki uočena je statistički značajna jaka povezanost između Ki67- i LGR5-pozitivnih stanica te između CLDN2- i CHGA-pozitivne površine, kao i između DCLK1-pozitivnih stanica i Ki67-pozitivnih stanica. Jaka negativna korelacija u istom dijelu debelog crijeva ženki uočena je između DCLK1-pozitivnih stanica i ATOH1-pozitivnih stanica te CA2-pozitivne površine (**tablica 15**).

Tablica 15 Povezanost epitelnih biljega u negativnoj kontroli distalnog dijela debelog crijeva ženki

U tablici su prikazane *r* vrijednosti.

Distalni dio debelog crijeva ženki									
Negativna kontrolna skupina									
Biljezi	Ki67	LGR5	CLDN2	ATOH1	CHGA	DCLK1	AB-PAS	HES1	CA2
Ki67	1.000	0.658	0.468	-0.331	0.441	0.637	-0.504	-0.308	-0.469
LGR5	0.658	1.000	0.177	0.306	0.353	-0.028	-0.320	-0.432	-0.004
CLDN2	0.468	0.177	1.000	-0.451	0.851	0.632	0.162	-0.085	-0.478
ATOH1	-0.331	0.306	-0.451	1.000	-0.131	-0.724	0.604	-0.181	0.284
CHGA	0.441	0.353	0.851	-0.131	1.000	0.568	-0.218	-0.127	-0.426
DCLK1	0.637	-0.028	0.632	-0.724	0.568	1.000	-0.424	-0.112	-0.677
AB-PAS	-0.504	-0.320	0.162	0.604	-0.218	-0.424	1.000	0.418	0.008
HES1	-0.308	-0.432	-0.085	-0.181	-0.127	-0.112	0.418	1.000	0.357
CA2	-0.469	-0.004	-0.478	0.284	-0.426	-0.677	0.008	0.357	1.000

U proksimalnom dijelu debelog crijeva mužjaka negativne kontrole uočena je jaka pozitivna korelacija između AB-PAS- i CHGA-pozitivne površine te DCLK1-pozitivnih stanica, kao i između CA2-pozitivne površine i HES1-pozitivnih stanica. Jaka, ali negativna korelacija uočena je u istom dijelu debelog crijeva mužjaka između CA2-pozitivne površine i DCLK1-pozitivnih stanica, kao i između CLDN2-pozitivne površine i HES1-pozitivnih stanica (**tablica 16**).

Tablica 16 Povezanost epitelnih biljega u negativnoj kontroli proksimalnog dijela debelog crijeva mužjaka

U tablici su prikazane r vrijednosti.

Proksimalni dio debelog crijeva mužjaka									
Negativna kontrolna skupina									
Biljezi	Ki67	LGR5	CLDN2	ATOH1	CHGA	DCLK1	AB-PAS	HES1	CA2
Ki67	1.000	0.140	0.263	-0.442	-0.205	0.481	0.491	-0.308	-0.599
LGR5	0.140	1.000	0.374	-0.182	0.562	0.217	0.579	-0.360	-0.587
CLDN2	0.263	0.374	1.000	0.049	0.115	0.245	0.537	-0.647	-0.583
ATOH1	-0.442	-0.182	0.049	1.000	-0.219	0.049	-0.177	0.099	0.182
CHGA	-0.205	0.562	0.115	-0.219	1.000	0.115	0.181	-0.289	-0.324
DCLK1	0.481	0.217	0.245	0.049	0.115	1.000	0.537	0.007	-0.583
AB-PAS	0.491	0.579	0.537	-0.177	0.181	0.537	1.000	-0.277	-0.497
HES1	-0.308	-0.360	-0.647	0.099	-0.289	0.007	-0.277	1.000	0.655
CA2	-0.599	-0.587	-0.583	0.182	-0.324	-0.583	-0.497	0.655	1.000

U distalnom dijelu debelog crijeva mužjaka negativne kontrole jaka pozitivna korelacija vidljiva je između LGR5-pozitivnih stanica i CHGA-pozitivne površine, AB-PAS- i CLDN2-pozitivne površine, kao i između AB-PAS-pozitivne površine i DCLK1-pozitivnih stanica te između HES1-pozitivnih stanica i CA2-pozitivne površine. S druge strane, jaka, ali negativna korelacija vidljiva je između Ki67- i ATOH1-pozitivnih stanica te HES1-pozitivnih stanica, LGR5-pozitivnih stanica i CA2-pozitivne površine, HES1- i DCLK1-pozitivnih stanica, CLDN2-pozitivne površine i ATOH1-pozitivnih stanica te CA2-pozitivne površine i DCLK1-pozitivnih stanica (**tablica 17**).

Tablica 17 Povezanost epitelnih biljega u negativnoj kontroli distalnog dijela debelog crijeva mužjaka

U tablici su prikazane r vrijednosti.

Distalni dio debelog crijeva mužjaka									
Negativna kontrolna skupina									
Biljezi	Ki67	LGR5	CLDN2	ATOH1	CHGA	DCLK1	AB-PAS	HES1	CA2
Ki67	1.000	0.193	0.262	-0.635	0.085	0.512	0.451	-0.631	-0.475
LGR5	0.193	1.000	0.414	-0.055	0.675	0.486	0.082	-0.531	-0.789
CLDN2	0.262	0.414	1.000	-0.636	0.716	0.402	0.717	-0.454	-0.581
ATOH1	-0.635	-0.055	-0.636	1.000	-0.070	-0.106	-0.474	0.384	0.335
CHGA	0.085	0.675	0.716	-0.070	1.000	0.523	0.496	-0.409	0.416
DCLK1	0.512	0.486	0.402	-0.106	0.523	1.000	0.716	-0.897	-0.783
AB-PAS	0.451	0.082	0.717	-0.474	0.496	0.716	1.000	-0.633	-0.463
HES1	-0.631	-0.531	-0.454	0.384	-0.409	-0.897	-0.633	1.000	0.892
CA2	-0.475	-0.789	-0.581	0.335	0.416	-0.783	-0.463	0.892	1.000

5.10.2. Povezanost epitelnih biljega zone vidljivo neoštećene sluznice debelog crijeva

U zoni vidljivo neoštećene sluznice proksimalnog dijela debelog crijeva ženki utvrđena je statistički značajna umjerena pozitivna korelacija između broja Ki67- i LGR5-pozitivnih stanica, ATOH1-pozitivnih stanica te CLDN2-pozitivne površine, kao i između CHGA- i AB-PAS-pozitivne površine. U istom dijelu debelog crijeva uočen je i umjeren, ali negativan odnos između LGR5- i DCLK1-pozitivnih stanica te između CLDN2- i AB-PAS-pozitivne površine (**tablica 18**).

Tablica 18 Povezanost epitelnih biljega u zoni vidljivo neoštećene sluznice proksimalnog dijela debelog crijeva ženki

U tablici su prikazane r vrijednosti. / - nema dovoljno uzoraka.

Proksimalni dio debelog crijeva ženki									
Zona vidljivo neoštećene sluznice									
Biljezi	Ki67	LGR5	CLDN2	ATOH1	CHGA	DCLK1	AB-PAS	HES1	CA2
Ki67	1.000	0.461	0.111	-0.052	0.153	-0.293	-0.145	0.117	-0.598
LGR5	0.461	1.000	-0.332	0.075	-0.086	-0.526	0.077	-0.075	-0.099
CLDN2	0.111	-0.332	1.000	0.520	-0.099	0.285	-0.596	0.304	/
ATOH1	-0.052	0.075	0.520	1.000	-0.073	-0.015	-0.227	-0.402	0.505
CHGA	0.153	-0.086	-0.099	-0.073	1.000	0.230	0.456	0.269	0.371
DCLK1	-0.293	-0.526	0.285	-0.015	0.230	1.000	-0.281	0.180	-0.634
AB-PAS	-0.145	0.077	-0.596	-0.227	0.456	-0.281	1.000	0.093	/
HES1	0.117	-0.075	0.304	-0.402	0.269	0.180	0.093	1.000	/
CA2	-0.598	-0.099	/	0.505	0.371	-0.634	/	/	1.000

U distalnom dijelu debelog crijeva ženki iste zone zabilježena je jaka pozitivna korelacija između CLDN2-pozitivne površine i Ki67-pozitivnih stanica te između LGR5- i ATOH1-pozitivnih stanica, dok je vrlo jaka, ali negativna korelacija utvrđena između CLDN2- i AB-PAS-pozitivne površine (**tablica 19**).

Tablica 19 Povezanost epitelnih biljega u zoni vidljivo neoštećene sluznice distalnog dijela debelog crijeva ženki

U tablici su prikazane r vrijednosti. / - nema dovoljno uzoraka.

Distalni dio debelog crijeva ženki									
Zona vidljivo neoštećene sluznice									
Biljezi	Ki67	LGR5	CLDN2	ATOH1	CHGA	DCLK1	AB-PAS	HES1	CA2
Ki67	1.000	0.363	0.762	-0.235	0.225	-0.913	0.156	-0.093	/
LGR5	0.363	1.000	0.701	0.653	0.756	0.655	0.156	/	/
CLDN2	0.762	0.701	1.000	-0.548	0.701	/	0.526	/	/
ATOH1	-0.235	0.653	-0.548	1.000	0.848	/	0.965	/	/
CHGA	0.225	0.756	0.701	0.848	1.000	0.994	0.980	/	/
DCLK1	-0.913	0.655	/	/	0.994	1.000	0.925	/	/
AB-PAS	0.156	0.156	0.526	0.965	0.980	0.925	1.000	-0.845	/
HES1	-0.093	/	/	/	/	/	-0.845	1.000	/
CA2	/	/	/	/	/	/	/	/	1.000

U proksimalnom dijelu debelog crijeva mužjaka zabilježena je jaka pozitivna korelacija između ATOH1- i LGR5-pozitivnih stanica, a negativna između Ki67-pozitivnih stanica i CHGA-pozitivne površine. Vrlo jaka negativna korelacija u istom dijelu debelog crijeva mužjaka vidljiva je između Ki67- i HES1-pozitivnih stanica (**tablica 20**).

Tablica 20 Povezanost epitelnih biljega u zoni vidljivo neoštećene sluznice proksimalnog dijela debelog crijeva mužjaka

U tablici su prikazane r vrijednosti. / - nema dovoljno uzoraka.

Proksimalni dio debelog crijeva mužjaka									
Zona vidljivo neoštećene sluznice									
Biljezi	Ki67	LGR5	CLDN2	ATOH1	CHGA	DCLK1	AB-PAS	HES1	CA2
Ki67	1.000	0.315	0.161	0.174	-0.665	-0.043	-0.031	/	/
LGR5	0.315	1.000	-0.127	0.785	-0.406	-0.381	-0.031	-0.957	/
CLDN2	0.161	-0.127	1.000	-0.104	0.374	0.573	-0.358	0.627	/
ATOH1	0.174	0.785	-0.104	1.000	-0.426	-0.186	0.371	-0.512	/
CHGA	-0.665	-0.406	0.374	-0.426	1.000	-0.229	-0.114	/	/
DCLK1	-0.043	-0.381	0.573	-0.186	-0.229	1.000	0.430	/	/
AB-PAS	-0.031	-0.031	-0.358	0.371	-0.114	0.430	1.000	/	/
HES1	/	-0.957	0.627	-0.512	/	/	/	1.000	/
CA2	/	/	/	/	/	/	/	/	1.000

U distalnom dijelu debelog crijeva mužjaka zabilježena je vrlo jaka pozitivna korelacija između CLDN2-pozitivne površine i LGR5-pozitivnih stanica, kao i između CHGA- i AB-PAS-pozitivne površine (**tablica 21**).

Tablica 21 Povezanost epitelnih biljega u zoni vidljivo neoštećene sluznice distalnog dijela debelog crijeva mužjaka

U tablici su prikazane r vrijednosti. / - nema dovoljno uzoraka.

Distalni dio debelog crijeva mužjaka									
Zona vidljivo neoštećene sluznice									
Biljezi	Ki67	LGR5	CLDN2	ATOH1	CHGA	DCLK1	AB-PAS	HES1	CA2
Ki67	1.000	/	/	/	/	/	0.349	/	/
LGR5	/	1.000	0.926	/	/	/	0.349	/	/
CLDN2	/	0.926	1.000	/	/	/	0.269	/	/
ATOH1	/	/	/	1.000	/	/	/	/	/
CHGA	/	/	/	/	1.000	/	0.825	/	/
DCLK1	/	/	/	/	/	1.000	/	/	/
AB-PAS	0.349	0.349	0.269	/	0.825	/	1.000	/	/
HES1	/	/	/	/	/	/	/	1.000	/
CA2	/	/	/	/	/	/	/	/	1.000

5.10.3. Povezanost epitelnih biljega zone upaljene sluznice debelog crijeva

U proksimalnom dijelu debelog crijeva ženki uočena je slaba do umjerena pozitivna povezanost između LGR5-pozitivnih stanica te HES1- i Ki67-pozitivnih stanica, kao i između DCLK1-pozitivnih stanica i CLDN2- i CHGA-pozitivne površine. U istom području zabilježena je slaba negativna korelacija između HES1-pozitivnih stanica i AB-PAS-pozitivne površine (tablica 22).

Tablica 22 Povezanost epitelnih biljega u zoni upaljene sluznice proksimalnog dijela debelog crijeva ženki

U tablici su prikazane r vrijednosti.

Proksimalni dio debelog crijeva ženki									
Zona upaljene sluznice									
Biljezi	Ki67	LGR5	CLDN2	ATOH1	CHGA	DCLK1	AB-PAS	HES1	CA2
Ki67	1.000	0.536	0.054	-0.043	0.255	-0.260	-0.262	0.153	0.016
LGR5	0.536	1.000	-0.226	0.123	0.196	-0.238	-0.262	0.444	0.254
CLDN2	0.054	-0.226	1.000	0.064	0.148	0.391	-0.259	0.094	0.191
ATOH1	-0.043	0.123	0.064	1.000	-0.229	-0.084	0.187	0.135	0.226
CHGA	0.255	0.196	0.148	-0.229	1.000	0.349	-0.131	-0.026	0.263
DCLK1	-0.260	-0.238	0.391	-0.084	0.349	1.000	-0.230	0.057	0.263
AB-PAS	-0.262	-0.262	-0.259	0.187	-0.131	-0.230	1.000	-0.389	-0.051
HES1	0.153	0.444	0.094	0.135	-0.026	0.057	-0.389	1.000	0.506
CA2	0.016	0.254	0.191	0.226	0.263	0.263	-0.051	0.506	1.000

U distalnom dijelu debelog crijeva ženki vidljiva je umjerena pozitivna korelacija između LGR5-pozitivnih stanica i Ki67- i HES1-pozitivnih stanica te CHGA-pozitivne površine. Nadalje, CHGA-pozitivna površina pokazuje pozitivnu korelaciju s ATOH1- i DCLK1-pozitivnim stanicama te CA2-pozitivnom površinom. U istom segmentu crijeva uočena je umjereno jaka negativna korelacija između CLDN2-pozitivne površine i CHGA- odnosno CA2-pozitivne površine, kao i LGR5-pozitivnih stanica. Dodatno, zabilježena je i negativna povezanost između Ki67-pozitivnih stanica i CA2-pozitivne površine (**tablica 23**).

Tablica 23 Povezanost epitelnih biljega u zoni upaljene sluznice distalnog dijela debelog crijeva ženki

U tablici su prikazane r vrijednosti.

Distalni dio debelog crijeva ženki									
Zona upaljene sluznice									
Biljezi	Ki67	LGR5	CLDN2	ATOH1	CHGA	DCLK1	AB-PAS	HES1	CA2
Ki67	1.000	0.336	0.122	-0.017	0.018	-0.072	-0.308	-0.117	-0.372
LGR5	0.336	1.000	-0.441	0.228	0.448	0.060	-0.308	0.265	0.239
CLDN2	0.122	-0.441	1.000	-0.157	-0.455	0.239	0.159	0.072	-0.318
ATOH1	-0.017	0.228	-0.157	1.000	0.445	-0.035	-0.030	-0.277	0.298
CHGA	0.018	0.448	-0.455	0.445	1.000	0.363	-0.214	-0.118	0.460
DCLK1	-0.072	0.060	0.239	-0.035	0.363	1.000	0.052	-0.162	0.100
AB-PAS	-0.308	-0.308	0.159	-0.030	-0.214	0.052	1.000	0.046	0.304
HES1	-0.117	0.265	0.072	-0.277	-0.118	-0.162	0.046	1.000	0.235
CA2	-0.372	0.239	-0.318	0.298	0.460	0.100	0.304	0.235	1.000

U zoni upaljene sluznice proksimalnog dijela debelog crijeva muškaka utvrđena je slaba pozitivna korelacija između LGR5-pozitivnih stanica te HES1- i Ki67-pozitivnih stanica, kao i između ATOH1-pozitivnih stanica i AB-PAS-pozitivne površine. Slaba negativna povezanost vidljiva je između CA2-pozitivne površine i Ki67-, LGR5- te ATOH1-pozitivnih stanica, dok je slaba do umjerena negativna korelacija zabilježena između AB-PAS-pozitivne površine i HES1-pozitivnih stanica te CA2-pozitivne površine (**tablica 24**).

Tablica 24 Povezanost epitelnih biljega u zoni upaljene sluznice proksimalnog dijela debelog crijeva muškaka

U tablici su prikazane r vrijednosti.

Proksimalni dio debelog crijeva muškaka									
Zona upaljene sluznice									
Biljezi	Ki67	LGR5	CLDN2	ATOH1	CHGA	DCLK1	AB-PAS	HES1	CA2
Ki67	1.000	0.483	0.255	0.204	0.045	-0.255	0.310	0.274	-0.489
LGR5	0.483	1.000	-0.123	0.425	-0.240	-0.178	0.310	-0.178	-0.394
CLDN2	0.255	-0.123	1.000	0.193	0.041	0.274	0.042	0.211	-0.095
ATOH1	0.204	0.425	0.193	1.000	-0.096	0.126	0.558	-0.308	-0.425
CHGA	0.045	-0.240	0.041	-0.096	1.000	-0.103	0.053	0.317	0.241
DCLK1	-0.255	-0.178	0.274	0.126	-0.103	1.000	0.234	-0.035	0.214
AB-PAS	0.310	0.310	0.042	0.558	0.053	0.234	1.000	-0.349	-0.117
HES1	0.274	-0.178	0.211	-0.308	0.317	-0.035	-0.349	1.000	0.326
CA2	-0.489	-0.394	-0.095	-0.425	0.241	0.214	-0.117	0.326	1.000

U distalnom dijelu debelog crijeva muškaka iste zone uočene su slabe do umjerene pozitivne korelacije između Ki67-pozitivnih stanica i CLDN2-pozitivne površine te HES1-pozitivnih stanica, LGR5- i ATOH1-pozitivnih stanica, DCLK1-pozitivnih stanica i ATOH1-pozitivnih stanica, kao i CHGA- i CA2-pozitivne površine. Umjereno jaka, ali negativna korelacija zabilježena je u istom dijelu crijeva muškaka između HES1-pozitivnih stanica i CA2-pozitivne površine (**tablica 25**).

Tablica 25 Povezanost epitelnih biljega u zoni upaljene sluznice distalnog dijela debelog crijeva muškaka

U tablici su prikazane r vrijednosti.

Distalni dio debelog crijeva muškaka									
Zona upaljene sluznice									
Biljezi	Ki67	LGR5	CLDN2	ATOH1	CHGA	DCLK1	AB-PAS	HES1	CA2
Ki67	1.000	0.305	0.515	0.152	-0.050	-0.171	-0.035	0.388	-0.307
LGR5	0.305	1.000	0.240	0.485	-0.033	0.161	-0.035	-0.039	0.071
CLDN2	0.515	0.240	1.000	0.153	-0.090	-0.287	0.267	0.304	-0.188
ATOH1	0.152	0.485	0.153	1.000	-0.093	0.373	0.341	-0.335	0.245
CHGA	-0.050	-0.033	-0.090	-0.093	1.000	0.425	-0.225	0.120	-0.113
DCLK1	-0.171	0.161	-0.287	0.373	0.425	1.000	0.092	-0.459	0.441
AB-PAS	-0.035	-0.035	0.267	0.341	-0.225	0.092	1.000	-0.086	0.149
HES1	0.388	-0.039	0.304	-0.335	0.120	-0.459	-0.086	1.000	-0.151
CA2	-0.307	0.071	-0.188	0.245	-0.113	0.441	0.149	-0.151	1.000

5.10.4. Povezanost epitelnih biljega zone displastične regeneracije debelog crijeva

U proksimalnom dijelu debelog crijeva ženki zabilježena je jaka pozitivna povezanost između Ki67- i LGR5-pozitivnih stanica, kao i između DCLK1-pozitivnih stanica i CLDN2-pozitivne površine. Slaba do umjerena pozitivna korelacija uočena je između HES1-pozitivnih stanica te Ki67- i LGR5-pozitivnih stanica, kao i između AB-PAS-pozitivne površine i ATOH1-pozitivnih stanica (**tablica 26**).

Tablica 26 Povezanost epitelnih biljega u zoni displastične regeneracije proksimalnog dijela debelog crijeva ženki

U tablici su prikazane r vrijednosti.

Proksimalni dio debelog crijeva ženki									
Zona displastične regeneracije									
Biljezi	Ki67	LGR5	CLDN2	ATOH1	CHGA	DCLK1	AB-PAS	HES1	CA2
Ki67	1.000	0.645	0.144	-0.107	0.230	0.024	-0.272	0.349	-0.166
LGR5	0.645	1.000	-0.230	-0.073	0.239	-0.175	-0.272	0.356	-0.067
CLDN2	0.144	-0.230	1.000	0.019	-0.048	0.601	0.195	-0.069	0.173
ATOH1	-0.107	-0.073	0.019	1.000	-0.045	-0.039	0.040	-0.114	0.069
CHGA	0.230	0.239	-0.048	-0.045	1.000	-0.014	-0.143	-0.081	0.050
DCLK1	0.024	-0.175	0.601	-0.039	-0.014	1.000	0.105	-0.175	0.186
AB-PAS	-0.272	-0.272	0.195	0.040	-0.143	0.105	1.000	-0.448	0.098
HES1	0.349	0.356	-0.069	-0.114	-0.081	-0.175	-0.448	1.000	0.118
CA2	-0.166	-0.067	0.173	0.069	0.050	0.186	0.098	0.118	1.000

U distalnom dijelu debelog crijeva ženki utvrđena je slaba do umjerena pozitivna korelacija između Ki67-pozitivnih stanica i CLDN2-pozitivne površine te HES1-pozitivnih stanica, između LGR5- i HES1-pozitivnih stanica, između CHGA-pozitivne površine i DCLK1-pozitivnih stanica te CA2-pozitivne površine, kao i između AB-PAS- i CA2-pozitivne površine. Jaka negativna povezanost u ovom dijelu crijeva zabilježena je između CLDN2- i CHGA-pozitivne površine te između Ki67-pozitivnih stanica i CA2-pozitivne površine, dok je slaba negativna korelacija opažena između Ki67-pozitivnih stanica i CHGA-pozitivne površine (**tablica 27**).

Tablica 27 Povezanost epitelnih biljega u zoni displastične regeneracije distalnog dijela debelog crijeva mužjaka

U tablici su prikazane r vrijednosti.

Distalni dio debelog crijeva ženki									
Zona displastične regeneracije									
Biljezi	Ki67	LGR5	CLDN2	ATOH1	CHGA	DCLK1	AB-PAS	HES1	CA2
Ki67	1.000	0.310	0.539	-0.069	-0.358	-0.276	-0.052	0.366	-0.664
LGR5	0.310	1.000	-0.142	0.070	0.039	0.086	-0.052	0.360	-0.087
CLDN2	0.539	-0.142	1.000	-0.082	-0.728	-0.289	0.059	0.170	-0.263
ATOH1	-0.069	0.070	-0.082	1.000	0.173	0.115	0.322	-0.370	0.182
CHGA	-0.358	0.039	-0.728	0.173	1.000	0.451	-0.018	-0.116	0.356
DCLK1	-0.276	0.086	-0.289	0.115	0.451	1.000	-0.010	-0.265	0.271
AB-PAS	-0.052	-0.052	0.059	0.322	-0.018	-0.010	1.000	-0.041	0.403
HES1	0.366	0.360	0.170	-0.370	-0.116	-0.265	-0.041	1.000	-0.269
CA2	-0.664	-0.087	-0.263	0.182	0.356	0.271	0.403	-0.269	1.000

U zoni displastične regeneracije proksimalnog dijela debelog crijeva mužjaka utvrđena je jaka pozitivna korelacija između DCLK1-pozitivnih stanica i CHGA-pozitivne površine. Umjerena pozitivna povezanost uočena je između LGR5-pozitivnih stanica i Ki67- i ATOH1-pozitivnih stanica te između AB-PAS-pozitivne površine i ATOH1-pozitivnih stanica. U istom dijelu crijeva zabilježena je umjerena negativna korelacija između CLDN2-pozitivne površine i CHGA-pozitivne površine te DCLK1-pozitivnih stanica (**tablica 28**).

Tablica 28 Povezanost epitelnih biljega u zoni displastične regeneracije proksimalnog dijela debelog crijeva mužjaka

U tablici su prikazane r vrijednosti.

Proksimalni dio debelog crijeva mužjaka									
Zona displastične regeneracije									
Biljezi	Ki67	LGR5	CLDN2	ATOH1	CHGA	DCLK1	AB-PAS	HES1	CA2
Ki67	1.000	0.470	0.291	0.125	-0.297	-0.211	0.015	0.061	-0.326
LGR5	0.470	1.000	-0.006	0.446	-0.093	-0.131	0.015	-0.159	0.001
CLDN2	0.291	-0.006	1.000	0.077	-0.490	-0.421	0.080	0.244	0.167
ATOH1	0.125	0.446	0.077	1.000	-0.005	-0.040	0.456	-0.268	-0.148
CHGA	-0.297	-0.093	-0.490	-0.005	1.000	0.700	0.318	-0.063	-0.091
DCLK1	-0.211	-0.131	-0.421	-0.040	0.700	1.000	0.220	-0.092	-0.162
AB-PAS	0.015	0.015	0.080	0.456	0.318	0.220	1.000	-0.158	0.283
HES1	0.061	-0.159	0.244	-0.268	-0.063	-0.092	-0.158	1.000	0.078
CA2	-0.326	0.001	0.167	-0.148	-0.091	-0.162	0.283	0.078	1.000

U distalnom dijelu debelog crijeva mužjaka utvrđena je jaka pozitivna korelacija između CHGA-pozitivne površine i DCLK1-pozitivnih stanica, između ATOH1-pozitivnih stanica i CA2-pozitivne površine, između AB-PAS- i CA2-pozitivne površine te između Ki67- i HES1-pozitivnih stanica. Slaba pozitivna povezanost vidljiva je između LGR5-pozitivnih stanica i Ki67- i ATOH1-pozitivnih stanica, između CLDN2-pozitivne površine i Ki67- i LGR5-pozitivnih stanica te između DCLK1-pozitivnih stanica i AB-PAS-pozitivne površine. Jaka negativna korelacija u istom segmentu zabilježena je između Ki67-pozitivnih stanica i DCLK1-pozitivnih stanica te CHGA-pozitivne površine, kao i između CLDN2-pozitivne površine i DCLK1-pozitivnih stanica te CHGA-pozitivne površine. Umjereno jaka, ali negativna korelacija uočena je između HES1-pozitivnih stanica i DCLK1-pozitivnih stanica te AB-PAS-pozitivne površine, kao i između CA2-pozitivne površine i Ki67-pozitivnih stanica (**tablica 29**).

Tablica 29 Povezanost epitelnih biljega u zoni displastične regeneracije distalnog dijela debelog crijeva mužjaka

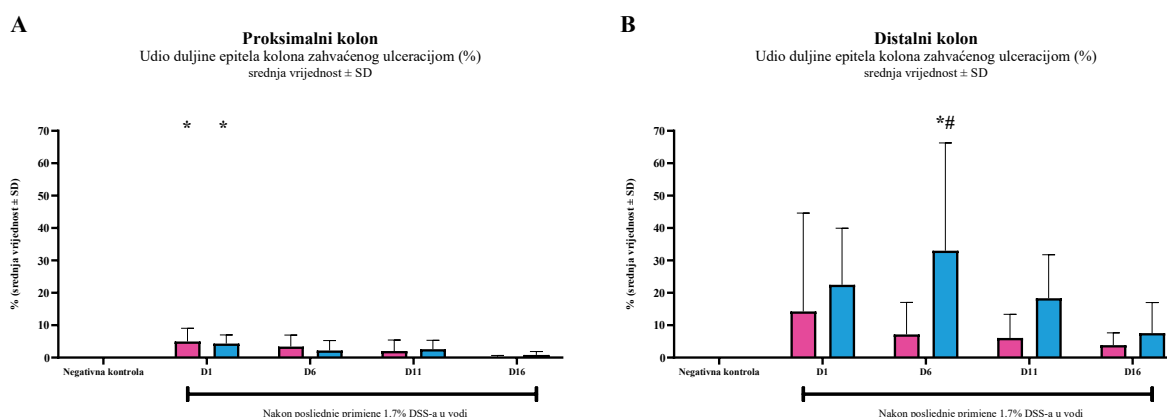
U tablici su prikazane r vrijednosti.

Distalni dio debelog crijeva mužjaka									
Zona displastične regeneracije									
Biljezi	Ki67	LGR5	CLDN2	ATOH1	CHGA	DCLK1	AB-PAS	HES1	CA2
Ki67	1.000	0.468	0.584	-0.036	-0.600	-0.642	-0.165	0.632	-0.476
LGR5	0.468	1.000	0.354	0.495	-0.269	-0.256	-0.165	0.082	-0.133
CLDN2	0.584	0.354	1.000	0.120	-0.642	-0.628	-0.147	0.515	-0.295
ATOH1	-0.036	0.495	0.120	1.000	-0.034	0.139	0.301	-0.457	0.506
CHGA	-0.600	-0.269	-0.642	-0.034	1.000	0.760	0.267	-0.561	0.106
DCLK1	-0.642	-0.256	-0.628	0.139	0.760	1.000	0.417	-0.587	0.465
AB-PAS	-0.165	-0.165	-0.147	0.301	0.267	0.417	1.000	-0.370	0.517
HES1	0.632	0.082	0.515	-0.457	-0.561	-0.587	-0.370	1.000	-0.479
CA2	-0.476	-0.133	-0.295	0.506	0.106	0.465	0.517	-0.479	1.000

5.11. MORFOMETRIJSKA ANALIZA OŠTEĆENJA EPITELA I REEPITELIZACIJE

5.11.1. Morfometrijska analiza oštećenja epitela

U negativnoj kontrolnoj skupini nije zabilježena ulceracija (0 % u svih analiziranih jedinki), dok je u skupinama s primjenom DSS-a postotak ulcerirane površine bio značajno povećan u odnosu na negativnu kontrolu. Prvog dana nakon prestanka primjene DSS-a (D1) zabilježeno je povećanje postotka ulceriranog epitela kod ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva u usporedbi s negativnom kontrolom. U distalnom dijelu debelog crijeva uočen je veći udio epitela zahvaćenog ulceracijama kod mužjaka na D6 nakon posljednje primjene DSS-a u usporedbi sa ženjkama u istom razdoblju i s pripadajućom negativnom kontrolom (**slika 65**).



Slika 65 Udio duljine epitela debelog crijeva zahvaćenog ulceracijom

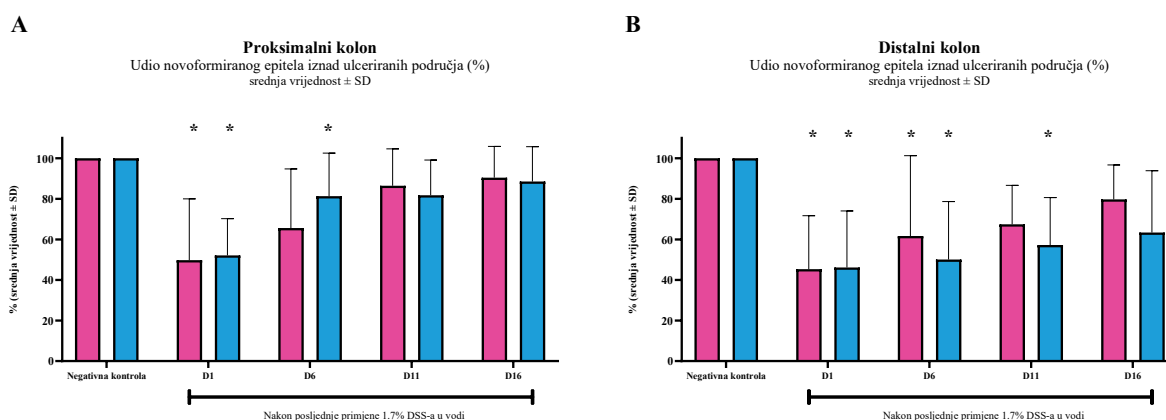
A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

$p < 0,05$ nasuprot mužjacima u odgovarajućoj skupini, * $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj 1,7 % DSS skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

5.11.2. Morfometrijska analiza reepitelizacije

U negativnoj kontrolnoj skupini nije bilo ulceracija, stoga reepitelizacija nije analizirana. U proksimalnom dijelu debelog crijeva ženki i mužjaka uočen je značajno manji udio novoformiranog epitela na D1, a samo kod mužjaka i na D6 nakon posljednje primjene DSS-a u usporedbi s negativnom kontrolnom skupinom. U distalnom dijelu debelog crijeva zabilježen je značajno manji udio novoformiranog epitela kod oba spola na D1 i D6, a samo kod mužjaka i na D11 nakon posljednje primjene DSS-a u usporedbi s negativnom kontrolom (**slika 66**).



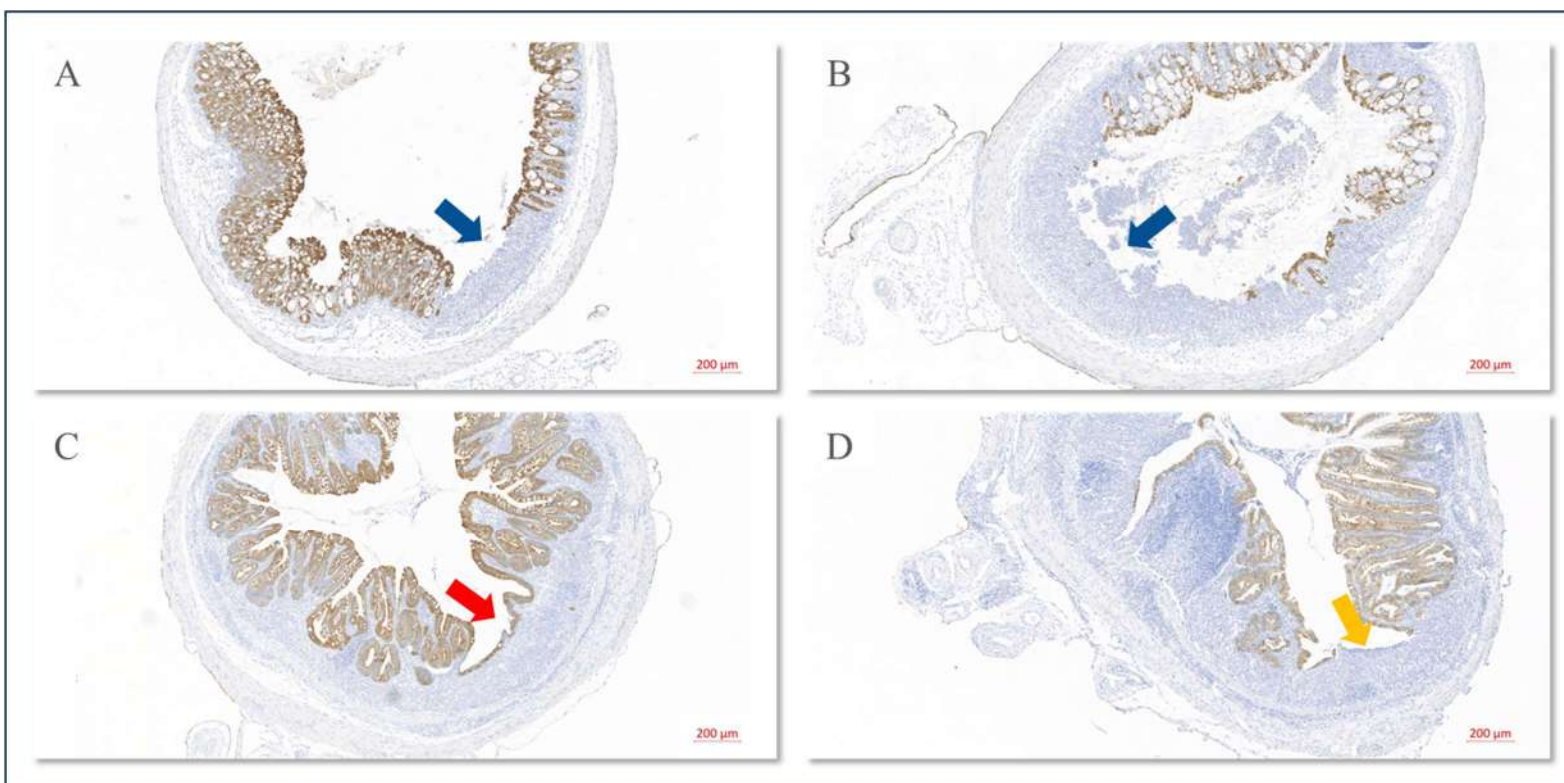
Slika 66 Udio novoformiranog epitela iznad ulceriranih područja

A) Usporedba između ženki i mužjaka u proksimalnom dijelu debelog crijeva. B) Usporedba između ženki i mužjaka u distalnom dijelu debelog crijeva.

$p < 0,05$ nasuprot mužjacima u odgovarajućoj skupini, * $p < 0,05$ nasuprot odgovarajućoj 1,7 % DSS skupini, dvofaktorska analiza varijance; Šidákov test višestrukih usporedbi, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ružičasta boja – ženke, plava boja – mužjaci.

Ulceracije i reepitelizacija u debelom crijevu ženki i mužjaka na D1 i D16 nakon posljednje primjene DSS-a prikazane su na **slici 67**.



Slika 67 Prikaz ulceracija i reepitelizacije u debelom crijevu miševa, IHC PAN-CK

A) Ulkus u distalnom dijelu debelog crijeva ženki na D1. B) Ulkus u distalnom dijelu debelog crijeva mužjaka na D1. C) Potpuna reepitelizacija ulkusa u distalnom dijelu debelog crijeva kod ženki na D16. D) Nepotpuna reepitelizacija ulkusa u distalnom dijelu debelog crijeva kod mužjaka na D16.

Slika prikazana pri digitalnom povećanju 2,5x, Zen softver, Zeiss. Skala: 200 µm.

Plava strelica – ulkus, žuta strelica – nepotpuna reepitelizacija, crvena strelica – potpuna reepitelizacija.

6. RASPRAVA

Rezultati studije ukazuju na spolne razlike u zastupljenosti matičnih i terminalno diferenciranih stanica unutar kripti debelog crijeva zdravih miševa te na razlike između proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva unutar istog spola.

6.1. BAZALNE VRIJEDNOSTI EPITELNIH BILJEGA DEBELOG CRIJEVA

6.1.1. Razlike u zastupljenosti epitelnih stanica kripe debelog crijeva između mužjaka i ženki miševa

U provedenoj studiji digitalnom patološkom analizom tkiva debelog crijeva zdravih ženki miševa utvrđen je veći udio Ki67- i LGR5-pozitivnih stanica u odnosu na mužjake. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima studije koja je analizirala gensku ekspresiju *Lgr5* te potvrdila veću ekspresiju u tkivu zdravog debelog crijeva ženki u usporedbi s mužjacima (ZHOU i sur., 2018.). Zanimljivo je da prema literaturnim podacima ženke imaju i veći rezervoar intestinalnih matičnih stanica u tankom crijevu od mužjaka (HUDRY i sur., 2024.), te se može ustvrditi da među spolovima duž crijeva postoje značajne razlike u prisutnosti LGR5-pozitivnih matičnih stanica. U ovoj studiji dokazana je i jaka pozitivna povezanost između Ki67- i LGR5-pozitivnih stanica u analiziranim uzorcima oba segmenta debelog crijeva negativne kontrolne skupine ženki. LGR5-pozitivne matične stanice debelog crijeva aktivno se dijele (HAGEBARTH i CLEVERS, 2009.), pri čemu većina ovih stanica izražava proliferacijski biljeg Ki67, što upućuje na funkcionalno preklapanje između broja matičnih stanica i proliferacije (BASAK i sur., 2014.), budući da je veći udio stanica koje eksprimiraju LGR5 ujedno dio Wnt/ β -kateninskog signalnog puta odgovornog za proliferaciju epitelnih stanica (ZHENG i sur., 2022.). Nadalje, pokazano je da je aktivacija Wnt/ β -kateninskog signalnog puta, ključna za popravak i regeneraciju tkiva, izraženija u epitelnim stanicama crijeva ženki, što bi se moglo povezati s većom ekspresijom tog proteina u epitelnim stanicama debelog crijeva (ZITTER i sur., 2023.). Rezultati studije ukazuju na to da sluznica debelog crijeva ženki sadrži veći rezervoar matičnih stanica u bazi kripe te je predisponirana za bržu aktivaciju nakon oštećenja u smjeru diferencijacije epitelnih stanica. S obzirom na to da je proliferacijska zona u bazi kripe kod ljudi veća u proksimalnom nego u distalnom dijelu debelog crijeva, rezultati većeg broja Ki67-pozitivnih stanica u tom dijelu debelog

crijeva kod miša mogu se povezati s rezultatima dobivenima na zdravom humanom crijevu (SUNG i sur., 2025.).

Također, digitalnom patološkom analizom tkiva debelog crijeva zdravih ženki miševa uočen je veći udio sekretornih stanica u vidu ATOH1-pozitivnih stanica, kao i veća CHGA-pozitivna površina. U ovom istraživanju kod ženki je, u usporedbi s mužjacima, utvrđena veća proteinska ekspresija CHGA, biljega za enteroendokrine stanice. Uspoređujući ekspresiju Chga mRNA između debelog crijeva ženki i mužjaka, autori nisu utvrdili razliku u količini Chga mRNA među spolovima (ZHOU i sur., 2018.). Moji rezultati pokazuju da su, u usporedbi sa ženkama, unutar kripti oba segmenta debelog crijeva negativne kontrolne skupine mužjaka zastupljenije apsorptivne stanice. U proksimalnom i distalnom dijelu debelog crijeva mužjaka postoji jaka pozitivna povezanost između progenitorskih i zrelih apsorptivnih stanica. Transkripcijski faktor Hes1 unutar Notch signalnog puta usmjerava diferencijaciju epitelnih stanica prema apsorptivnoj liniji (FRE i sur., 2005.). Pozitivna korelacija između ekspresije progenitorskih i zrelih apsorptivnih stanica u debelom crijevu zdravih miševa može se tumačiti Notch-Hes1 mehanizmom, koji potiče progenitorske stanice prema apsorptivnoj liniji te suprimira sekretornu diferencijaciju i održava homeostazu epitelnog sloja (DEMITRACK i SAMUELSON, 2016.). Ne postoje literaturni podatci koji bi objasnili zapaženu povezanost spola i diferencijacije epitelnih stanica, odnosno povećanu prisutnost kolonocita kod mužjaka.

6.1.2. Razlike u zastupljenosti epitelnih stanica kripe debelog crijeva između proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva

U oba spola utvrđen je veći broj Ki67- i DCLK1-pozitivnih stanica te veća CLDN2-pozitivna površina u odnosu na ukupnu površinu sluznice u proksimalnom dijelu debelog crijeva u usporedbi s distalnim dijelom. Veći broj Ki67-pozitivnih stanica u proksimalnom dijelu debelog crijeva miša oba spola odražava razlike u zdravom humanom crijevu, gdje je pokazano da je proliferacijska zona u bazi kripe kod ljudi veća u proksimalnom nego u distalnom dijelu debelog crijeva (SUNG i sur., 2025.). Broj i distribucija crijevnih kemosenzornih stanica pokazuju da ih je više u tankom nego u debelom crijevu miša (CHENG i sur., 2018.). Međutim, do danas ne postoje studije koje uspoređuju njihov broj između proksimalnog i distalnog segmenta debelog crijeva,

niti kod ljudi niti kod pokusnih životinja. U ovom radu korelacijskom analizom pokazano je da u negativnoj kontrolnoj skupini proksimalnog i distalnog debelog crijeva oba spola zdravih miševa postoji jaka negativna povezanost između broja crijevnih kemosenzornih stanica i zrelih apsorptivnih stanica te snažna pozitivna korelacija broja kemosenzornih stanica i površine vrčastih stanica (TAO i sur., 2025.). IL-25 ne djeluje izravno na zrele apsorptivne stanice, već posredno putem osi kemosenzorna stanica – ILC2 – epitel preko IL-13, koji kao ključni medijator usmjerava razvoj epitelnih stanica kripe prema sekretornoj liniji te potiče diferencijaciju vrčastih stanica, dok istodobno smanjuje apsorptivni fenotip i mijenja barijernu funkciju epitela (SHANG i sur., 2025.). Rezultati ove studije pokazuju da je u oba spola CLDN2-pozitivna površina, izražena u odnosu na ukupnu površinu sluznice, veća u proksimalnom dijelu debelog crijeva u usporedbi s distalnim dijelom. Literaturni podatci o provedenim imunohistokemijskim i molekularnim analizama pokazuju da se CLDN2 može nalaziti u epitelnim stanicama kripti debelog crijeva, no regionalne razlike u njegovoj ekspresiji u zdravom debelom crijevu miša nisu jasno dokumentirane u literaturi. Nasuprot tome, kod ljudi je opisano da je u zdravom debelom crijevu ekspresija CLDN2 izraženija u proksimalnom nego u distalnom dijelu debelog crijeva (LAMERIS i sur., 2013.).

Rezultati provedene studije ukazuju na to da je u oba spola broj ATOH1- i HES1-pozitivnih stanica te CA2-pozitivna površina veća u distalnom nego u proksimalnom dijelu debelog crijeva. U literaturi nisu dokumentirane razlike u ekspresiji ATOH1, HES1 i CA2 između proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva miša ili čovjeka, ali je dokazano da je ekspresija CA2 veća u debelom nego u tankom crijevu zdravih miševa (PAN i sur., 2007.).

6.2. DSS-INDUCIRANI MODEL KOLITISA KOD MIŠEVA

Cilj rada bio je pomnije istražiti proces obnove epitela nakon oštećenja sluznice debelog crijeva izazvanog DSS-om. Primjena DSS-a tijekom šest uzastopnih dana izazvala je upalu unutar sluznice i pojavu dubokih oštećenja sluznice, dok su neki dijelovi sluznice, pogotovo u proksimalnom dijelu debelog crijeva, naizgled ostali nezahvaćeni upalom. Unutar promatranog razdoblja nakon prestanka izloženosti DSS-u dokumentirane su spolne razlike u razini oštećenja sluznice debelog crijeva, odnosno u dinamici širenja upale, procesu zacjeljivanja i zastupljenosti displastične regeneracije epitela. Oštećenje sluznice izazvano primjenom DSS-a izraženije je u debelom crijevu mužjaka i u distalnom dijelu debelog crijeva.

U literaturi je dostupno vrlo malo podataka koji raščlanjuju debelo crijevo na više histomorfoloških entiteta nakon primjene DSS-a jer se histopatološke ocjene obično fokusiraju na najizraženiju upalu i oštećenje tkiva u modelu. U ovoj su studiji definirane specifične histopatološke zone kako bi se preciznije ocijenile promjene i kvantificirali epitelni biljezi: zona displastične regeneracije uz leziju, zona upaljene sluznice te zona vidljivo neoštećene sluznice. Najizraženije histopatološke promjene nakon primjene DSS-a u debelom crijevu oba spola miševa uočene su u području neposredno uz ulceracije, odnosno u zoni displastične regeneracije.

6.2.1. Upala, oštećenje i reepitelizacija debelog crijeva

Prvi dan nakon prestanka primjene DSS-a kod miševa u tkivu debelog crijeva prisutne su sljedeće histopatološke promjene: bazalna limfoplazmocitoza, difuzna upala lamine proprije, erozije, ulkusi, dilatacija i gubitak kripti te hiperproliferacija epitela s displazijom niskog stupnja. Do šestog i 11. dana nakon posljednje primjene DSS-a bilježe se širenje upale i ulceracija, elongacija i aberantna regeneracija kripti, kao što su „back to back” kripti i grananje kripti, gubitak vrčastih stanica, reepitelizacija te stvaranje polipoznih tvorbi i novih limfnih folikula. U posljednjem promatranom razdoblju zamijećeni su širenje upale u okolno masno tkivo, dilatacija limfnih žila, fibrotične promjene i displazija epitela visokog stupnja.

Ženke u usporedbi s mužjacima pokazuju brže smanjenje upale i oporavak epitela nakon DSS-induciranog kolitisa, osobito u proksimalnom dijelu debelog crijeva. U skupinama miševa

kojima je induciran DSS-kolitis debelo crijevo mužjaka pokazuje izraženiju upalu i opsežnije oštećenje epitela u gotovo svim analiziranim zonama debelog crijeva i vremenskim točkama. Kod mužjaka se također bilježi veći broj difuzno proširenih lezija u vidu ulkusa te sporije zaraštavanje, osobito u distalnom dijelu debelog crijeva. Uz to, u debelom crijevu mužjaka češće izostaje pojava zone vidljivo neoštećene sluznice, što upućuje na difuzno rasprostranjenu upalu i oštećenje epitela. Rezultati prikazane studije potvrđuju ranije objavljene rezultate da ženke u usporedbi s mužjacima imaju manje upalnog infiltrata i oštećenja kripti nakon akutno izazvanog DSS-kolitisa (BÁBÍČKOVÁ i sur., 2015.). Jedan od čimbenika boljeg odgovora ženki na upalu mogla bi biti veća prisutnost hormona 17β -estradiola (E_2), za koji je dokazano da je važan modulator imunološkog odgovora, integriteta epitelne barijere i proliferacije epitelnih stanica. 17β -estradiol ima značajan utjecaj na imunološki sustav, modulirajući urođeni i adaptivni imunološki odgovor te funkciju crijevne barijere, iako mehanizmi njegove regulacije tkivne upale još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni (CHAKRABORTY i sur., 2023.). Djeluje putem triju receptora: estrogenskih receptora α i β ($ER\alpha$ i $ER\beta$), koji kao nuklearni receptori reguliraju transkripciju gena, te membranskog receptora vezanog uz G-protein (GPER1), koji posreduje brze signalne odgovore (WATSON i sur., 2008.). Najnovije studije na pokusnim miševima pokazuju da epitelne stanice debelog crijeva pokazuju značajnu ekspresiju $ER\alpha$, $ER\beta$ i GPER1, kao i Cyp19A1, koji katalizira proizvodnju 17β -estradiola, odnosno estrogena. Ženke miševa kojima nedostaje $ER\alpha$ u epitelnim stanicama debelog crijeva pokazale su zaštitu od ozljeda izazvanih DSS-om, dok su mužjaci pokazali povećanu upalu i sklonost lezijama (PEREDA i sur., 2025.). Kliničke studije provedene na pacijentima s upalnim bolestima crijeva pokazale su pojačanu ekspresiju GPER-a i $ER\alpha$, uz istodobno smanjenu ekspresiju $ER\beta$ (XU i sur., 2022.). U istom kontekstu upalnih bolesti crijeva kod ljudi također je pokazano da estrogen i progesteron ublažavaju stres endoplazmatskog retikuluma, smanjuju proizvodnju proupalnih citokina, potiču zacjeljivanje rana te poboljšavaju barijernu funkciju crijevnog epitela (VAN DER GIESSEN i sur., 2019.).

U usporedbi s proksimalnim dijelom debelog crijeva distalni dio obilježen je izraženijom upalom, težim epitelnim oštećenjem, većim udjelom ulceracija i sporijim stvaranjem novog epitela nakon primjene DSS-a, što je posebno nepovoljno kod mužjaka. Studije pokazuju da je štetni učinak DSS-a u modelu kolitisa kod miševa posredovan njegovim dekstranskim komponentama, pri čemu DSS formira komplekse s masnim kiselinama srednjeg lanca, kojih ima više u distalnom

dijelu debelog crijeva te koje mogu aktivirati upalne signalne putove u kolonocitima (LAROUÏ i sur., 2012.). Vrlo je malo literaturnih podataka o histopatološkoj usporedbi proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva miša nakon primjene DSS-a budući da se većina studija fokusira samo na analizu distalnog dijela crijeva, koji je glavno mjesto oštećenja u ovom modelu kolitisa (AHMAD i sur., 2023.).

6.2.2. Proliferacija i diferencijacija sekretornih i apsorptivnih epitelnih stanica debelog crijeva

Analiza proliferacije epitelnih stanica pokazuje da se nakon DSS-induciranog oštećenja debelog crijeva dinamika proliferativnog odgovora razlikuje između spolova i histoloških zona sluznice. Osim što ženke imaju veće bazalne vrijednosti Ki67 i LGR5 proteina u debelom crijevu, rezultati upućuju i na spolno specifične razlike u dinamici proliferativnih promjena tijekom faze oporavka epitela debelog crijeva nakon kolitisa: kod ženki se u ranijim promatranim vremenskim točkama bilježi brži i intenzivniji porast broja Ki67-pozitivnih stanica, dok se kod mužjaka slična aktivacija javlja tek u posljednjem promatranom razdoblju nakon primjene DSS-a, pogotovo u proksimalnom dijelu debelog crijeva. Tijekom akutne faze DSS-induciranog kolitisa obično dolazi do smanjene proliferacije epitela, što se očituje smanjenim brojem Ki67-pozitivnih stanica (ARAKI i sur., 2010.), dok se u fazi oporavka, nakon prestanka primjene DSS-a, proliferacija epitela povećava kao odgovor na oštećenje i početak regeneracije (GUPTA, 2013.). Rezultati provedene studije u skladu su s objavljenim literaturnim podatcima, no ujedno su uočene značajne spolne razlike u dinamici proliferacijske aktivnosti. Povećanje broja Ki67-pozitivnih stanica u upaljenoj i displastičnoj sluznici kod mužjaka nastupa kasnije nego kod ženki, što može biti povezano s težim oštećenjem sluznice, ponajprije u distalnom dijelu debelog crijeva, te upućivati na produljen proces regeneracije sluznice kod mužjaka (SAIZ i sur., 2017.).

Rezultati studije ukazuju na spolno specifične razlike u dinamici aktivacije intestinalnih matičnih stanica tijekom regeneracije epitela debelog crijeva, pri čemu se kod ženki u ranim promatranim vremenskim točkama bilježi porast broja LGR5-pozitivnih stanica unutar vidljivo neoštećene i upaljene sluznice u odnosu na negativnu kontrolu. Broj LGR5-pozitivnih stanica, slično kao i broj Ki67-pozitivnih stanica, kod ženki je u usporedbi s mužjacima u ranim fazama

oporavka nakon primjene DSS-a bio veći u svim promatranim zonama proksimalnog i distalnog dijela debelog crijeva. Kod mužjaka do porasta ekspresije LGR5 dolazi tek u posljednjem promatranom razdoblju nakon prestanka primjene DSS-a. Rezultati studije mogu upućivati na to da je kod ženki promptna aktivacija matičnih stanica nakon oštećenja sluznice debelog crijeva povezana s činjenicom da je rezervoar matičnih stanica u bazi kripe debelog crijeva veći kod ženki u usporedbi s mužjacima (*vide supra*). Studija provedena na mješovitoj skupini ženki i mužjaka, u kojoj je akutni kolitis induciran DSS-om u koncentracijama od 0,5 % do 3 %, pokazala je smanjen broj LGR5-pozitivnih stanica u cjelokupnom tkivu debelog crijeva (GIRISH i sur., 2026.). Rezultati ove studije potvrdili su da se nakon primjene DSS-a znatno smanjuje broj LGR5-pozitivnih stanica u cjelokupnoj sluznici debelog crijeva, prvenstveno zbog potpune destrukcije sluznice u zonama ulceracija koje kod muškog spola zauzimaju veću površinu nego kod ženki. Kod mužjaka je najveći broj ulceracija u distalnom dijelu zabilježen na D6, dok se značajan porast LGR5-pozitivnih stanica javlja tek na D16, što upućuje na odgođeni početak regeneracije. S druge strane, među spolovima je utvrđena jasna razlika u dinamici obnove epitela unutar upaljene sluznice i sluznice s displastičnom regeneracijom epitela kripe. U dosad objavljenim studijama autori nisu posvetili posebnu pažnju spolno uvjetovanim razlikama u prisutnosti LGR5-pozitivnih stanica u segmentima očuvane sluznice. U provedenoj studiji kod ženki je uočena snažna pozitivna korelacija između Ki67- i LGR5-pozitivnih stanica, kako u negativnoj kontroli tako i nakon primjene DSS-a. Ovaj rezultat potvrđuje povezanost proliferacije i aktivnosti matičnih stanica. Porast broja LGR5-pozitivnih stanica neposredno po završetku izloženosti DSS-u, koji je zabilježen kod ženki, sugerira bržu mobilizaciju rezervoara matičnih stanica kripe te se može povezati s dokumentiranim cijeljenjem. Watanabe i suradnici zabilježili su kod ženki jaku pozitivnu povezanost broja Ki67- i LGR5-pozitivnih stanica tijekom petodnevnog razdoblja regeneracije nakon primjene 1,5 % i 3 % DSS-a (WATANABE i sur., 2026.).

Značajna razlika među spolovima jest porast broja sekretornih progenitorskih stanica u posljednjem promatranom razdoblju kod mužjaka u odnosu na ženke u oba dijela debelog crijeva. Naime, u posljednjem promatranom razdoblju nakon primjene DSS-a u području neoštećene i upaljene sluznice te sluznice s displastičnom regeneracijom epitela zabilježen je značajno veći broj ATOH1-pozitivnih sekretornih stanica kod mužjaka u usporedbi s negativnom kontrolnom skupinom. S druge strane, kod ženki tijekom cijelog promatranog razdoblja broj ATOH1-

pozitivnih stanica ne odstupa od vrijednosti zabilježenih u negativnoj kontroli. U provedenoj studiji upalni odgovor mužjaka bio je izraženiji nego kod ženki, dapače, udio lezija povećao se tijekom promatranog razdoblja, odnosno od D6 do D16. Dobiveni rezultati slični su literaturnim podacima; pokazano je da mužjaci razvijaju snažniji upalni odgovor u DSS-induciranom kolitisu (BÁBÍČKOVÁ i sur., 2015.), uključujući pojačanu aktivaciju NF- κ B i STAT3 signalnih putova, koji su povezani s regulacijom diferencijacije epitela (HASES i sur., 2022.). Može se pretpostaviti da porast broja LGR5- i ATOH1-pozitivnih stanica na samom kraju razdoblja praćenja unutar naoko neoštećene i upaljene sluznice upućuje na početak značajnije obnove epitela kod mužjaka. S druge strane, kod ženki je porast broja LGR5-pozitivnih stanica u upaljenoj sluznici vidljiv odmah po prestanku izloženosti DSS-u, dok se broj ATOH1-pozitivnih stanica tijekom razdoblja praćenja ne mijenja značajno u odnosu na negativnu kontrolu. Dokazano je da ATOH1-pozitivne stanice mogu djelovati kao fakultativne matične stanice nakon lezije u crijevnom epitelu (ISHIBASHI i sur., 2018.). Naime, transkriptomski i matematički podatci analize modela DSS-a sugeriraju da se matične stanice baze kripe mogu izravno diferencirati u sekretorne epitelne stanice ili dati visoko proliferativne apsorptivne progenitore (BANJAC i sur., 2025.), a fosforilacija ATOH1 čini se ključnom za omogućavanje sekretornim progenitorima da poprime aktivnost sličnu matičnim stanicama tijekom homeostaze i nakon ozljede (TOMIC i sur., 2018.). Dinamika diferencijacije HES1- i ATOH1-pozitivnih progenitorskih stanica mijenja se u upaljenoj sluznici u odnosu na negativnu kontrolu u oba spola, no izraženija je u distalnom debelom crijevu. Istodobni porast broja progenitorskih apsorptivnih stanica uz smanjenje broja zrelih apsorptivnih stanica u oba segmenta i kod oba spola nakon primjene DSS-a upućuje na aktivaciju regeneracijskog odgovora obilježenog povećanom proliferacijom i diferencijacijom prema apsorptivnoj liniji, međutim još nije vidljivo sazrijevanje funkcionalnih apsorptivnih kolonocita. Ovi rezultati u skladu su s literaturom koja pokazuje povećanje broja HES1-pozitivnih stanica u DSS-induciranom kolitisu miševa (NING i sur., 2014.), kao i s istraživanjima u kontekstu ulceroznog kolitisa koja opisuju smanjenu zastupljenost zrelih apsorptivnih stanica (NAKADA i sur., 2020.), što je usporedivo s nalazima ovog rada u mišjem modelu. Diferencijacija ATOH1-pozitivnih stanica u vrčaste stanice ostala je nepromijenjena tijekom razdoblja praćenja u oba spola u usporedbi s negativnom kontrolom, dok se dinamika regeneracije enteroendokrinih i kemosenzornih stanica mijenja tijekom promatranog razdoblja. Rezultati provedene studije

pokazali su da se smjer diferencijacije LGR5-pozitivnih stanica u ATOH1- ili HES1-pozitivne stanice, te dalje u diferencirane enteroendokrine, kemosenzorne i vrčaste stanice te zrele apsorptivne stanice razlikuje unutar neoštećene sluznice, upaljene sluznice i sluznice u neposrednoj blizini ulceracija, odnosno ovisi o upalnom okruženju i stupnju epitelnog oštećenja. Glavna karakteristika zone displastične regeneracije u oba spola jest odgođena diferencijacija sekretornih i apsorptivnih progenitora, pri čemu prevladavaju HES1-pozitivne stanice u odnosu na ATOH1-pozitivne stanice. Broj HES1-pozitivnih stanica prevladava unutar displastičnog epitela i značajno se povećava u odnosu na negativnu kontrolnu skupinu, dok je s druge strane broj diferenciranih apsorptivnih stanica značajno smanjen u odnosu na negativnu kontrolu.

Površina enteroendokrinih stanica povećava se neposredno nakon prestanka primjene DSS-a kod oba spola, osobito u distalnom dijelu debelog crijeva, nakon čega slijedi pad. To je u skladu s literaturnim podacima dobivenima u akutnom DSS-induciranom modelu kolitisa kod štakora (EL-SALHY i UMEZAWA, 2016.) i kod bolesnika s ulceroznim kolitisom, gdje je zamijećen znatno smanjen broj enteroendokrinih stanica unutar epitela zahvaćene sluznice u odnosu na zdravo crijevo (ELSON i sur., 1995.). U ovom istraživanju uočen je pad gustoće enteroendokrinih stanica u zoni uz leziju nakon primjene DSS-a, što je u skladu s ranijim nalazima da DSS narušava diferencijaciju progenitorskih stanica prema enteroendokrinoj liniji i povećava njihovu apoptozu (RAOUF i sur., 2024.). Pozitivna povezanost između CHGA- i AB-PAS-pozitivne površine vidljiva je u rezultatima zone vidljivo neoštećene sluznice distalnog dijela debelog crijeva kod oba spola, što govori u prilog održavanju koordinirane regulacije sekretorne epitelne loze tijekom ozljede debelog crijeva izazvane DSS-om. Iako očita ozljeda epitela nije bila prisutna u analiziranim regijama, tretman DSS-om može izazvati dugotrajnu regenerativnu prilagodbu karakteriziranu koordiniranim širenjem ili održavanjem populacija vrčastih i enteroendokrinih stanica. Budući da vrčaste i enteroendokrine stanice nastaju od zajedničkih sekretornih progenitora, njihov paralelni porast mogao bi upućivati na aktivaciju putova sekretorne diferencijacije tijekom popravka epitela (LO i sur, 2017.).

S druge strane, površina vrčastih stanica smanjuje se u oba spola, kao i broj kemosenzornih stanica, koje se ipak povećavaju kod ženki u proksimalnom debelom crijevu u posljednjem razdoblju nakon primjene DSS-a. Izostanak oporavka kemosenzornih stanica kod mužjaka, za

razliku od ženki kod kojih se njihov broj postupno normalizira u proksimalnom dijelu debelog crijeva, sugerira učinkovitiji regeneracijski i diferencijacijski odgovor epitela kod ženki, osobito u specijaliziranim staničnim populacijama uključenima u kemijsko osjetilno prepoznavanje luminalnog sadržaja debelog crijeva. Osim svoje već opisane uloge u imunološkoj obrani protiv parazita i protozoa, oblikovanju sastava mikrobioma i zaštiti crijevnih barijera, kemosenzorne stanice imaju važnu ulogu i u regeneraciji crijeva. S obzirom na to da kemosenzorne stanice eksprimiraju COX-2, smatra se da mogu lokalno doprinosti produkciji PGE₂ i time sudjelovati u regulaciji regeneracijskog odgovora epitela. Posljedično, poremećaj funkcije ili brojnosti kemosenzornih stanica može dovesti do smanjene dostupnosti PGE₂ i oslabljene regeneracije (MIYOSHI i sur., 2017.).

6.2.3. Uloga CLDN2 u regeneraciji epitela debelog crijeva

U zdravom debelom crijevu ženki i mužjaka miševa ekspresija CLDN2 prisutna je na membranama epitelnih stanica u donjoj i srednjoj trećini kripti, blagog do umjerenog intenziteta, pri čemu nisu utvrđene statistički značajne razlike u ekspresiji ovog proteina između spolova. Također, pokazano je da je ekspresija ovog proteina veća na membranama epitelnih stanica proksimalnog dijela debelog crijeva miša u usporedbi s proksimalnim dijelom nakon izazvanog DSS-kolitisa. Ovi rezultati u skladu su s literaturom na humanim uzorcima crijeva, gdje je također povećana ekspresija CLDN2 vidljiva na membranama epitelnih stanica nediferenciranih stanica u bazi kripe, dok intenzitet ekspresije opada prema vrhu kripe (ESCAFFIT i sur., 2005.). Povećana ekspresija CLDN2 te njegov prijelaz s membrane u citoplazmu nakon primjene DSS-a zabilježeni su u debelom crijevu oba spola, osobito u displastičnoj zoni. Kao što je već prethodno navedeno, povećana ekspresija CLDN2 u DSS-induciranim modelima kolitisa povezana je s povećanom propusnošću epitelnih veza, poremećenom funkcijom epitelne barijere te fazom i jačinom aktivne upale (AHMAD i sur., 2023.). Međutim, dinamika i prostorna raspodjela ovog porasta pokazale su izražene spolne i segmentne razlike; kod ženki je porast CLDN2 uočen ranije nego kod mužjaka te je bolje vremenski usklađen s povećanom proliferacijom epitela, što može upućivati na njegovu ulogu u ranoj fazi adaptivne regeneracije sluznice nakon upalnog oštećenja. To je potvrđeno pojavom umjerene do jake pozitivne korelacije između CLDN2-pozitivne površine i broja Ki67-pozitivnih stanica u zoni displastične regeneracije i vidljivo neoštećene sluznice distalnog debelog

crijeva ženki miševa, dok je kod mužjaka u istom segmentu crijeva zabilježena umjerena pozitivna korelacija u zoni displastične regeneracije i upaljene sluznice. Tijekom oporavka od DSS-induciranog kolitisa kod miševa dokazana je inhibicija EGFR signalnog puta, čiji je CLDN2 dio, smanjena ekspresija tog proteina i posljedična pojava zaraštavanja sluznice debelog crijeva (AHMAD i sur., 2017.). Povećana ekspresija CLDN2, primarno lokalizirana u regenerirajućim kriptama, značajno je povezana s Ki67-pozitivnim stanicama u kriptama debelog crijeva te upućuje na ulogu EGFR/CLDN2 signalizacije u regulaciji proliferacije i/ili migracije stanica kripti, što je u skladu s rezultatima ovog rada (AHMAD i sur, 2023.).

Istovremeno s padom CHGA-pozitivne površine u istim segmentima epitela opaženo je povećanje ekspresije CLDN2, što je u skladu s literaturom koja navodi da upalni citokini poput TNF- α i IL-6 te regenerativni signalni putevi (Wnt/ β -katenin, PI3K/AKT) induciraju ekspresiju CLDN2 u DSS-induciranim modelima kolitisa kao dio epitelne reakcije na oštećenje i upalu (XIAO i sur., 2016.). Iako se oba fenomena pojavljuju paralelno, literatura zasad ne upućuje na izravnu mehanističku povezanost, stoga bi se smanjenje površine enteroendokrinih stanica moglo protumačiti kao posljedica poremećene diferencijacije, dok je porast CLDN2 vjerojatno adaptivni odgovor epitela na upalu i oslabljenu barijeru.

U području displastične regeneracije debelog crijeva nakon primjene DSS-a kod oba spola vidljiva je jaka pozitivna korelacija između broja kemosenzornih stanica i ekspresije CLDN2, što može odražavati zajedničku aktivaciju regeneracijskih i imunoloških mehanizama epitela. Kao što je već prethodno navedeno, crijevne kemosenzorne stanice putem IL-25/ILC2/IL-13 osi sudjeluju u regulaciji epitelne diferencijacije i mogu posredno poticati promjene u proteinima uskih spojeva debelog crijeva, uključujući povećanje ekspresije CLDN2 (SHANG i sur., 2025.). Istodobno, za CLDN2 je već poznato da je povišen u funkcionalno promijenjenom, permeabilnom epitelu tijekom upale i regeneracije sluznice (AHMAD i sur., 2014.). Suprotno tome, smanjenje površine vrčastih stanica prisutno kod oba spola pokazuje da je gubitak mukozne barijere univerzalni odgovor na DSS-inducirano oštećenje, neovisan o spolu u promatranom razdoblju. Takav nalaz u skladu je s literaturom o DSS modelu i ulceroznom kolitisu kod ljudi, u kojima su opisani reducirani broj i veličina vrčastih stanica (JOHANSSON i sur, 2008.).

7. ZAKLJUČCI

Na temelju istraživanja zdravog tkiva debelog crijeva te tkiva nakon DSS-induciranog kolitisa, uključujući oporavak, uz analizu spolnih i segmentnih razlika u debelom crijevu, izvedeni su sljedeći zaključci:

1. U zdravom debelom crijevu miša postoje izražene spolne i segmentne razlike u sastavu i dinamici epitelnih staničnih populacija.
2. Ženke pokazuju veći udio LGR5-pozitivnih matičnih stanica, Ki67-pozitivnih proliferirajućih stanica i sekretornih epitelnih populacija u zdravom debelom crijevu, dok kod mužjaka prevladavaju apsorptivne epitelne stanice.
3. Proksimalni dio debelog crijeva negativne kontrolne skupine, neovisno o spolu, obilježen je višom proliferacijskom aktivnošću, većim brojem Ki67- i DCLK1-pozitivnih stanica te većom ekspresijom CLDN2, dok distalni dio pokazuje višu zastupljenost diferencijacijskih biljega poput ATOH1, HES1 i CA2.
4. DSS-inducirani kolitis uzrokuje izraženo oštećenje sluznice debelog crijeva, s najvećom učestalošću i težinom histoloških promjena u distalnom dijelu debelog crijeva te u područjima uz erozije i ulceracije.
5. Nakon primjene DSS-a upala je kod ženki blaža i brže se povlači, osobito u proksimalnom dijelu debelog crijeva, uz učinkovitiju reepitelizaciju i brži povratak organizacije nalik zdravom epitelnom sloju.
6. Mužjaci razvijaju težu, difuzniju i dugotrajniju upalu nakon DSS-induciranog kolitisa, s većim udjelom ulceracija, sporijim zaraštavanjem epitela i čestim izostankom područja vidljivo neoštećene sluznice.
7. Kod ženki dolazi do rane i snažne aktivacije LGR5-pozitivnih matičnih stanica te povećanja broja Ki67-pozitivnih stanica u svim prethodno definiranim histološkim zonama sluznice, uključujući vidljivo neoštećenu i upaljenu sluznicu nakon primjene DSS-a.
8. Ženke zadržavaju stabilniju diferencijaciju sekretornih stanica te pokazuju selektivni oporavak crijevnih kemosenzornih stanica u proksimalnom dijelu debelog crijeva, za razliku od mužjaka koji pokazuju izraženije poremećaje diferencijacije tijekom

oporavka nakon DSS-induciranog kolitisa, uz kasniji porast ATOH1-pozitivnih sekretornih progenitorskih stanica.

9. Povećana ekspresija CLDN2 u regenerirajućim i displastičnim kriptama tijekom DSS-induciranog kolitisa povezana je s proliferacijom i obnovom epitelnog sloja debelog crijeva, što upućuje na njegovu aktivnu ulogu u regeneracijskom odgovoru sluznice.
10. Spol i anatomske segment debelog crijeva ključni su čimbenici homeostaze, odgovora na DSS-inducirano oštećenje i regeneracije epitela, pri čemu ženke pokazuju povoljniji regeneracijski odgovor od mužjaka.

8. POPIS LITERATURE

AHMAD, R., B. KUMAR, I. THAPA, R. L. TAMANG, S. K. YADAV, M. K. WASHINGTON, G. A. TALMON, A. S. YU, D. K. BASTOLA, P. DHAWAN, A. B. SINGH (2023): Claudin-2 protects against colitis-associated cancer by promoting colitis-associated mucosal healing. *J. Clin. Invest.* 133, e170771.

DOI: 10.1172/JCI170771

AHMAD, R., B. KUMAR, K. PAN, P. DHAWAN, A. B. SINGH (2017): HDAC-4 regulates claudin-2 expression in EGFR-ERK1/2 dependent manner to regulate colonic epithelial cell differentiation. *Oncotarget* 8, 87718–87736.

DOI: 10.18632/oncotarget.21190

AHMAD, R., R. CHATURVEDI, D. OLIVARES-VILLAGÓMEZ, T. HABIB, M. ASIM, P. SHIVESH, D. B. POLK, K. T. WILSON, M. K. WASHINGTON, L. VAN KAER, P. DHAWAN, A. B. SINGH (2014): Targeted colonic claudin-2 expression renders resistance to epithelial injury, induces immune suppression, and protects from colitis. *Mucosal Immunol.* 7, 1340–1353.

DOI:10.1038/mi.2014.21

ALEX, P., N. C. ZACHOS, T. NGUYEN, L. GONZALES, T. E. CHEN, L. S. CONKLIN, M. CENTOLA, X. LI (2009): Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 341–352.

DOI: 10.1002/ibd.20753

ANANTHAKRISHNAN, A. N., G. G. KAPLAN, S. C. NG (2020): Changing global epidemiology of inflammatory bowel diseases: Sustaining health care delivery into the 21st century. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 1252–1260.

DOI: 10.1016/j.cgh.2020.01.028

ARAKI, Y., K. MUKAISYO, H. SUGIHARA, Y. FUJIYAMA, T. HATTORI (2010): Increased apoptosis and decreased proliferation of colonic epithelium in dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Oncol. Rep.* 24, 869–874.

DOI: 10.3892/or.2010.869

ATANGA, R., V. SINGH, J. G. IN (2023): Intestinal enteroendocrine cells: Present and future druggable targets. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 8836.

DOI: 10.3390/ijms24108836

BÁBÍČKOVÁ, J., Ľ. TÓTHOVÁ, E. LENGYELOVÁ, A. BARTOŇOVÁ, J. HODOSY, R. GARDLÍK, P. CELEC (2015): Sex differences in experimentally induced colitis in mice: A role for estrogens. *Inflammation* 38, 1996–2006.

DOI: 10.1007/s10753-015-0180

BANCROFT, J. D., M. GAMBLE (Eds.) (2007): *Theory and practice of histological techniques*. 6th ed. Churchill Livingstone.

BANJAC, I., M. MAIMETS, I. H. C. TSANG, M. DIOLI, S. L. HANSEN, K. KRIZIC, R. B. BRESSAN, C. LÖVKVIST, K. B. JENSEN (2025): Fate mapping in mouse demonstrates early secretory differentiation directly from Lgr5⁺ intestinal stem cells. *Dev. Cell* 60(9): 1281–1289.e6.

DOI: 10.1016/j.devcel.2024.12.023

BARKER, N. (2014): Adult intestinal stem cells: Critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 19–33.

DOI: 10.1038/nrm3721

BARKER, N., H. CLEVERS (2010): Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology* 138, 1681–1696.

DOI: 10.1053/j.gastro.2010.03.002

BARKER, N., J. H. VAN ES, J. KUIPERS, P. KUJALA, M. VAN DEN BORN, M. COZIJNSEN, A. HAEGEBARTH, J. KORVING, H. BEGTHEL, P. J. PETERS, H. CLEVERS (2007): Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003–1007.

DOI: 10.1038/nature06196

BARKER, N., M. VAN DE WETERING, H. CLEVERS (2008): The intestinal stem cell. *Genes Dev.* 22, 1856–1864.

DOI: 10.1101/gad.1674008

BASAK, O., M. VAN DE BORN, J. KORVING, J. BEUMER, S. VAN DER ELST, J. H. VAN ES, H. CLEVERS (2014): Mapping early fate determination in *Lgr5*⁺ crypt stem cells using a novel *Ki67*-RFP allele. *EMBO J.* 33, 2057–2068.

DOI: 10.15252/embj.201488017

BAUMANN, K. (2013): Stem cells: Intestinal stem cell reserves. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 193.

BEKKU, S., H. MOCHIZUKI, T. YAMAMOTO, H. UENO, E. TAKAYAMA, T. TADAKUMA (2000): Expression of carbonic anhydrase I or II and correlation to clinical aspects of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 47, 998–1001.

BEUMER, J., H. CLEVERS (2021): Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22, 39–53.

DOI: 10.1038/s41580-020-0278-0

BIRCHENOUGH, G. M., M. E. JOHANSSON, J. K. GUSTAFSSON, J. H. BERGSTRÖM, G. C. HANSSON (2015): New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol.* 8, 712–719.

DOI: 10.1038/mi.2015.32

BLIKSLAGER, A. T., A. J. MOESER, J. L. GOOKIN, S. L. JONES, J. ODLE (2007): Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol. Rev.* 87, 545–564.
DOI: 10.1152/physrev.00012.2006

BOSSUYT, W., A. KAZANJIAN, N. DE GEEST, S. VAN KELST, G. DE HERTOOGH, K. GEBOES, G. P. BOIVIN, J. LUCIANI, F. FUKS, M. CHUAH, T. VANDENDRIESSCHE, P. MARYNEN, J. COOLS, N. F. SHROYER, B. A. HASSAN (2009): Atonal homolog 1 is a tumor suppressor gene. *PLoS Biol.* 7, e39.
DOI: 10.1371/journal.pbio.1000039

BRESSENOT, A., V. CAHN, S. DANESE, L. PEYRIN-BIROULET (2014): Microscopic features of colorectal neoplasia in inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* 20, 3164–3172.
DOI: 10.3748/wjg.v20.i12.3164

BUCZACKI, S. J., H. I. ZECCHINI, A. M. NICHOLSON, R. RUSSELL, L. VERMEULEN, R. KEMP, D. J. WINTON (2013): Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature* 495, 65–69.
DOI: 10.1038/nature11965

CAI, Z., S. WANG, J. LI (2021): Treatment of inflammatory bowel disease: A comprehensive review. *Front. Med.* 8, 765474.
DOI: 10.3389/fmed.2021.765474

CARMON, K. S., Q. LIN, X. GONG, A. THOMAS, Q. LIU (2012): LGR5 interacts and cointernalizes with Wnt receptors to modulate Wnt/ β -catenin signaling. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2054–2064.
DOI: 10.1128/MCB.00272-12

CASTILLO-AZOFEIFA, D., E. N. FAZIO, R. NATTIV, H. J. GOOD, T. WALD, M. A. PEST, F. J. DE SAUVAGE, O. D. KLEIN, S. ASFAHA (2019): Atoh1⁺ secretory progenitors possess renewal capacity independent of Lgr5⁺ cells during colonic regeneration. *EMBO J.* 38, e99984.
DOI: 10.15252/embj.201899984

CHAKRABORTY, B., J. BYEMERWA, T. KREBS, F. LIM, C. Y. CHANG, D. P. MCDONNELL (2023): Estrogen receptor signaling in the immune system. *Endocr. Rev.* 44, 117–141.

DOI: 10.1210/endrev/bnac017

CHANDRAKESAN, P., R. MAY, D. QU, N. WEYGANT, V. E. TAYLOR, J. D. LI, N. ALI, S. M. SUREBAN, M. QANTE, T. C. WANG, M. S. BRONZE, C. W. HOUCHEN (2015): Dclk1+ small intestinal epithelial tuft cells display the hallmarks of quiescence and self-renewal. *Oncotarget* 6, 30876–30886.

DOI: 10.18632/oncotarget.5129

CHARNEY, A. N., J. D. WAGNER, G. J. BIRNBAUM, J. N. JOHNSTONE (1986): Functional role of carbonic anhydrase in intestinal electrolyte transport. *Am. J. Physiol.* 251, G682–G687.

DOI: 10.1152/ajpgi.1986.251.5.G682

CHASSAING, B., J. D. AITKEN, M. MALLESHPA, M. VIJAY-KUMAR (2014): Dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr. Protoc. Immunol.* 104, 15.25.1–15.25.14.

DOI: 10.1002/0471142735.im1525s104

CHEN, W., M. ZHUO, X. LU, X. XIA, Y. ZHAO, Z. HUANG, J. XU, W. LI, C. YU (2018): SRC-3 protects intestine from DSS-induced colitis by inhibiting inflammation and promoting goblet cell differentiation through enhancement of KLF4 expression. *Int. J. Biol. Sci.* 14, 2051–2064.

DOI: 10.7150/ijbs.28576

CHENG, X., U. VOSS, E. EKBLAD (2018): Tuft cells: Distribution and connections with nerves and endocrine cells in mouse intestine. *Exp. Cell Res.* 369, 105–111.

DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.05.011

CLEVERS, H. (2013): The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell* 154, 274–284.

DOI: 10.1016/j.cell.2013.07.004

CLEVERS, H., F. M. WATT (2018): Defining adult stem cells by function, not by phenotype. *Annu. Rev. Biochem.* 87, 1015–1027.

DOI: 10.1146/annurev-biochem-062917-012341

COOPER, H. S., S. N. MURTHY, R. S. SHAH, D. J. SEDERGRAN (1993): Clinicopathologic study of dextran sulphate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.* 69, 238–249.

DAVIDSON, L. A., J. S. GOLDSBY, E. S. CALLAWAY, M. S. SHAH, N. BARKER, R. S. CHAPKIN (2012): Alteration of colonic stem cell gene signatures during the regenerative response to injury. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1600–1607.

DOI: 10.1016/j.bbadis.2012.06.011

DEMITRACK, E. S., L. C. SAMUELSON (2016): Notch regulation of gastrointestinal stem cells. *J. Physiol.* 594, 4791–4803.

DOI: 10.1113/JP271667

DEROCHE, T. C., S. Y. XIAO, X. LIU (2014): Histological evaluation in ulcerative colitis. *Gastroenterol. Rep. (Oxf.)* 2, 178–192.

DOI: 10.1093/gastro/gou031

DHAWAN, P., R. AHMAD, R. CHATURVEDI, J. J. SMITH, R. MIDHA, M. K. MITTAL, M. KRISHNAN, X. CHEN, S. ESCHRICH, T. J. YEATMAN, R. C. HARRIS, M. K. WASHINGTON, K. T. WILSON, R. D. BEAUCHAMP, A. B. SINGH (2011): Claudin-2 expression increases tumorigenicity of colon cancer cells: Role of epidermal growth factor receptor activation. *Oncogene* 30, 3234–3247.

DOI: 10.1038/onc.2011.43

DIELEMAN, L. A., M. J. PALMEN, H. AKOL, E. BLOEMENA, A. S. PEÑA, S. G. MEUWISSEN, E. P. VAN REES (1998): Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin. Exp. Immunol.* 114, 385–391.

DOI: 10.1046/j.1365-2249.1998.00728.x

EICHELE, D. D., K. K. KHARBANDA (2017): Dextran sulfate sodium colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* 23, 6016–6029.

DOI: 10.3748/wjg.v23.i33.6016

EL-SALHY, M., A. DANIELSSON, R. STENLING, L. GRIMELIUS (1997): Colonic endocrine cells in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.* 242, 413–419.

DOI: 10.1046/j.1365-2796.1997.00237.x

EL-SALHY, M., K. UMEZAWA (2016): Treatment with novel AP-1 and NF- κ B inhibitors restores the colonic endocrine cells to normal levels in rats with DSS-induced colitis. *Int. J. Mol. Med.* 37, 556–564.

DOI: 10.3892/ijmm.2016.2481

EL-SALHY, M., K. UMEZAWA, J. G. HATLEBAKK, O. H. GILJA (2017): Abnormal differentiation of stem cells into enteroendocrine cells in rats with DSS-induced colitis. *Mol. Med. Rep.* 15, 2106–2112.

DOI: 10.3892/mmr.2017.6266

ELSON, C. O., R. B. SARTOR, G. S. TENNYSON, R. H. RIDDELL (1995): Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109, 1344–1367.

DOI: 10.1016/0016-5085(95)90599-5

ERBEN, U., C. LODDENKEMPER, K. DOERFEL, S. SPIECKERMANN, D. HALLER, M. M. HEIMESAAT, M. ZEITZ, B. SIEGMUND, A. A. KÜHL (2014): Histomorphology of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease (IBD) mouse models and its relevance for IBD in men. *J. Comp. Pathol.* 150, 377–393.

ESCAFFIT, F., F. BOUDREAU, J. F. BEAULIEU (2005): Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. *J. Cell. Physiol.* 203, 15–26.

DOI: 10.1002/jcp.20189

EVANS, J. D. (1996): Straightforward statistics for the behavioural sciences. Thomson Brooks/Cole Publishing Co.

FEAKINS, R., P. BORRALHO NUNES, A. DRIESSEN, I. O. GORDON, N. ZIDAR, P. BALDIN, B. CHRISTENSEN, S. DANESE, N. HERLIHY, M. IACUCCI, M. B. LOUGHREY, F. MAGRO, A. MOOKHOEK, M. SVRCEK, F. ROSINI (2024): Definitions of histological abnormalities in inflammatory bowel disease: An ECCO position paper. *J. Crohn's Colitis* 18, 175–191.

DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjad142

FLEMING, S. E., M. D. FITCH, S. DEVRIES, M. L. LIU, C. KIGHT (1991): Nutrient utilization by cells isolated from rat jejunum, cecum and colon. *J. Nutr.* 121, 869–878.

DOI: 10.1093/jn/121.6.869

FRE, S., M. HUYGHE, P. MOURIKIS, S. ROBINE, D. LOUVARD, S. ARTAVANIS-TSAKONAS (2005): Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* 435, 964–968.

DOI: 10.1038/nature03589

GARGALLO-PUYUELO, C. J., E. RICART, E. IGLESIAS, R. DE FRANCISCO, J. P. GISBERT, C. TAXONERA, M. MAÑOSA, M. AGUAS PERIS, E. M. NAVARRETE-MUÑOZ, A. SANAHUJA, J. GUARDIOLA, F. MESONERO, M. RIVERO TIRADO, J. BARRIO, I. VERA MENDOZA, L. DE CASTRO PARGA, E. GARCÍA-PLANELLA, X. CALVET, M. D. MARTÍN ARANZ, S. GARCÍA et al. (2024): Sex-related differences in the phenotype and course of inflammatory bowel disease: SEXEII study of ENEIDA. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 22, 2280–2290.

DOI: 10.1016/j.cgh.2024.05.013

GERBE, F., J. H. VAN ES, L. MAKRINI, B. BRULIN, G. MELLITZER, S. ROBINE, B. ROMAGNOLO, N. F. SHROYER, J. F. BOURGAUX, C. PIGNODEL, H. CLEVERS, P. JAY (2011): Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.* 192, 767–780.

DOI: 10.1083/jcb.201010127

GERSEMANN, M., S. BECKER, I. KÜBLER, M. KOSLOWSKI, G. WANG, K. R. HERRLINGER, J. GRIGER, P. FRITZ, K. FELLERMANN, M. SCHWAB, J. WEHKAMP, E. F. STANGE (2009): Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation* 77, 84–94.

DOI: 10.1016/j.diff.2008.09.008

GIRISH, N., C. Y. LIU, S. GADEOCK, M. L. GOMEZ, Y. HUANG, Z. SHARIFKHODAEI, M. K. WASHINGTON, D. B. POLK (2021): Persistence of Lgr5⁺ colonic epithelial stem cells in mouse models of inflammatory bowel disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 321, G308–G324.

DOI: 10.1152/ajpgi.00248.2020

GRETEN, F. R., S. I. GRIVENNIKOV (2019): Inflammation and cancer: Triggers, mechanisms, and consequences. *Immunity* 51, 27–41.

DOI: 10.1016/j.immuni.2019.06.025

GRIVENNIKOV, S., E. KARIN, J. TERZIC, D. MUCIDA, G. Y. YU, S. V. VALLABHAPURAPU, J. SCHELLER, S. ROSE-JOHN, H. CHEROUTRE, L. ECKMANN, M. KARIN (2009): IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 15, 103–113.

DOI: 10.1016/j.ccr.2009.01.001

GUENIN-MACE, L., P. KONIECZNY, S. NAIK (2023): Immune-epithelial cross talk in regeneration and repair. *Annu. Rev. Immunol.* 41, 207–228.

DOI: 10.1146/annurev-immunol-101721-062818

GUNAWARDENE, A. R., B. M. CORFE, C. A. STATON (2011): Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *Int. J. Exp. Pathol.* 92, 219–231.

DOI: 10.1111/j.1365-2613.2011.00767.x

GUPTA, J. (2013): p38 α MAPK in inflammation-associated colorectal cancer. Doctoral thesis, Madrid.

GUSTAFSSON, J. K., M. E. V. JOHANSSON (2022): The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 19, 785–803.

DOI: 10.1038/s41575-022-00675-x

HASES, L., M. BIRGERSSON, R. INDUKURI, A. ARCHER, C. WILLIAMS (2022): Colitis induces sex-specific intestinal transcriptomic responses in mice. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 10408.

DOI: 10.3390/ijms231810408

HENDEL, S. K., L. KELLERMANN, A. HAUSMANN, N. BINDSLEV, K. B. JENSEN, O. H. NIELSEN (2022): Tuft cells and their role in intestinal diseases. *Front. Immunol.* 13, 822867.

DOI: 10.3389/fimmu.2022.822867

HERMANEK, P. (1987): Dysplasia in the gastrointestinal tract: Definition and clinical significance. *Surg. Endosc.* 1, 5–10.

DOI: 10.1007/BF00703080

HERRMANN, H., H. BÄR, L. KREPLAK, S. V. STRELKOV, U. AEBI (2007): Intermediate filaments: From cell architecture to nanomechanics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 562–573.

DOI: 10.1038/nrm2197

HICKEY, J. W., W. R. BECKER, S. A. NEVINS, A. HORNING, A. E. PEREZ, C. ZHU, B. ZHU, B. WEI, R. CHIU, D. C. CHEN, D. L. COTTER, E. D. ESPLIN, A. K. WEIMER, C. CARACCIO, V. VENKATARAAMAN, C. M. SCHÜRCH, S. BLACK, M. BRBIĆ, K. CAO, S. CHEN, M. SNYDER (2023): Organization of the human intestine at single-cell resolution. *Nature* 619, 572–584.

Nature 619, 572–584.

DOI: 10.1038/s41586-023-05915-x

HU, J., J. LI, C. DAI, J. REN, W. YANG, C. HE, F. MENG, C. DAI, S. ZENG (2023): HES1 deficiency impairs development of human intestinal mesenchyme by suppressing WNT5A expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 655, 50–58.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.03.014

HUANG, L., J. H. BERNINK, A. GILADI, D. KRUEGER, G. J. F. VAN SON, M. H. GEURTS, G. BUSSLINGER, L. LIN, H. BEGTHEL, M. ZANDVLIET, C. J. BUSKENS, W. A. BEMELMAN, C. LÓPEZ-IGLESIAS, P. J. PETERS, H. CLEVERS (2024): Tuft cells act as regenerative stem cells in the human intestine. *Nature* 634, 929–935.

DOI: 10.1038/s41586-024-07952-6

HUDRY, B., S. KHADAYATE, I. MIGUEL-ALIAGA (2016): The sexual identity of adult intestinal stem cells controls organ size and plasticity. *Nature* 530, 344–348.

DOI: 10.1038/nature16953

HUGENHOLTZ, F., W. M. DE VOS (2018): Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 149–160.

DOI: 10.1007/s00018-017-2693-8

ISHIBASHI, F.; SHIMIZU, H.; NAKATA, T.; ET AL. (2018): Contribution of ATOH1+ cells to the homeostasis, repair, and tumorigenesis of the colonic epithelium. *Stem Cell Rep.* 10(1): 27–42.

DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.11.006

ISO, T., L. KEDES, Y. HAMAMORI (2003): HES and HERP families: Multiple effectors of the Notch signalling pathway. *J. Cell. Physiol.* 194, 237–255.

DOI: 10.1002/jcp.10208

JOHANSSON, M. E. V., J. K. GUSTAFSSON, K. E. SJÖBERG, J. PETERSSON, L. HOLM, H. SJÖVALL, G. C. HANSSON (2010): Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulphate colitis model. *PLoS One* 5, e12238.

DOI: 10.1371/journal.pone.0012238

- JOHANSSON, M. E., M. PHILLIPSON, J. PETERSSON, A. VELCICH, L. HOLM, G. C. HANSSON (2008): The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 15064–15069.
DOI: 10.1073/pnas.0803124105
- KIM, B., J. L. BARNETT, C. G. KLEER, H. D. APPELMAN (1999): Endoscopic and histological patchiness in treated ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 94.
DOI: 10.1111/j.1572-0241.1999.01533.x
- KIM, T. H., R. A. SHIVDASANI (2011): Genetic evidence that intestinal Notch functions vary regionally and operate through a common mechanism of Math1 repression. *J. Biol. Chem.* 286, 11427–11433.
DOI: 10.1074/jbc.M110.188797
- KIM, T., J. H. TAO-CHENG, L. E. EIDEN, Y. P. LOH (2001): Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell* 106, 499–509.
DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00459-7
- KIM, Y. S., S. B. HO (2010): Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12, 319–330.
DOI: 10.1007/s11894-010-0131-2
- KIVELÄ, A. J., J. KIVELÄ, J. SAARNIO, S. PARKKILA (2005): Carbonic anhydrases in normal gastrointestinal tract and gastrointestinal tumours. *World J. Gastroenterol.* 11, 155–163.
DOI: 10.3748/wjg.v11.i2.155
- KJÆRGAARD, S., T. S. R. JENSEN, U. R. FEDDERSEN, N. BINDSLEV, K. V. GRUNDDAL, S. S. POULSEN, H. B. RASMUSSEN, E. BUDTZ-JØRGENSEN, M. BERNER-HANSEN (2021): Decreased number of colonic tuft cells in quiescent ulcerative colitis patients. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 33, 817–824.
DOI: 10.1097/MEG.0000000000001959

KLEIN, S. L., K. L. FLANAGAN (2016): Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 626–638.

DOI: 10.1038/nri.2016.90

KLEINKE, T., S. WAGNER, H. JOHN, D. HEWETT-EMMETT, S. PARKKILA, W. G. FORSSMANN, G. GROS (2005): A distinct carbonic anhydrase in the mucus of the colon of humans and other mammals. *J. Exp. Biol.* 208, 487–496.

DOI: 10.1242/jeb.01398

KNOOP, K. A., R. D. NEWBERRY (2018): Goblet cells: Multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. *Mucosal Immunol.* 11, 1551–1557.

DOI: 10.1038/s41385-018-0039-y

KUMAR, V., A. K. ABBAS, J. C. ASTER (2020): *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 10th ed. Elsevier.

KUROKAWA, K., Y. HAYAKAWA, K. KOIKE (2020): Plasticity of intestinal epithelium: Stem cell niches and regulatory signals. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 357.

DOI: 10.3390/ijms22010357

LAMERIS, A. L., S. HUYBERS, K. KAUKINEN, T. H. MÄKELÄ, R. J. BINDELS, J. G. HOENDEROP, P. I. NEVALAINEN (2013): Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 48, 58–69.

DOI: 10.3109/00365521.2012.741616

LANGNER, C., F. MAGRO, A. DRIESSEN, A. ENSARI, G. J. MANTZARIS, V. VILLANACCI, G. BECHEANU, P. BORRALHO NUNES, G. CATHOMAS, W. FRIES, A. JOURET-MOURIN, C. MESCOLI, G. DE PETRIS, C. A. RUBIO, N. A. SHEPHERD, M. VIETH, R. ELIAKIM, EUROPEAN SOCIETY OF PATHOLOGY, EUROPEAN CROHN'S AND COLITIS FOUNDATION (2014): The histopathological approach to inflammatory bowel disease: A practice guide. *Virchows Arch.* 464, 511–527.

DOI: 10.1007/s00428-014-1543-4

LAROUÏ, H., S. A. INGERSOLL, H. C. LIU, M. T. BAKER, S. AYYADURAI, M. A. CHARANIA, F. LAROUÏ, Y. YAN, S. V. SITARAMAN, D. MERLIN (2012): Dextran sulfate sodium (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. *PLoS One* 7, e32084.
DOI: 10.1371/journal.pone.0032084

LAROUX, F. S., H. H. NORRIS, J. HOUGHTON, K. P. PAVLICK, S. BHARWANI, D. M. MERRILL, J. FUSELER, R. CHERVENAK, M. B. GRISHAM (2004): Regulation of chronic colitis in athymic nu/nu (nude) mice. *Int. Immunol.* 16, 77–89.
DOI: 10.1093/intimm/dxh006

LE BERRE, C., S. DANESE, L. PEYRIN-BIROULET (2023): Can we change the natural course of inflammatory bowel disease? *Ther. Adv. Gastroenterol.* 16, 17562848231163118.
DOI: 10.1177/17562848231163118

LEE, S. H., J. E. KWON, M. L. CHO (2018): Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intest. Res.* 16, 26–42.
DOI: 10.5217/ir.2018.16.1.26

LENTI, M. V., G. SANTACROCE, G. BROGLIO, C. M. ROSSI, A. DI SABATINO (2024): Recent advances in intestinal fibrosis. *Mol. Aspects Med.* 96, 101251.
DOI: 10.1016/j.mam.2024.101251

LI, T., C. GENG, X. LI, S. SONG, Y. LI, C. WANG (2026): Activated Notch signaling pathway protects the intestinal barrier in DSS-induced colitis by regulating tight junctions. *Eur. J. Med. Res.* 31, 117.
DOI: 10.1186/s40001-026-03941-9

LINDEMANS, C. A., M. CALAFIORE, A. M. MERTELSMANN, M. H. O'CONNOR, J. A. DUDAKOV, R. R. JENQ, E. VELARDI, L. F. YOUNG, O. M. SMITH, G. LAWRENCE, J. A. IVANOV, Y. Y. FU, S. TAKASHIMA, G. HUA, M. L. MARTIN, K. P. O'ROURKE, Y. H. LO, M. MOKRY, M. ROMERA-HERNANDEZ, T. CUPEDO et al. (2015): Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature* 528, 560–564.

DOI: 10.1038/nature16460

LIU, C. Y., C. M. CHAM, E. B. CHANG (2021): Epithelial wound healing in inflammatory bowel diseases: The next therapeutic frontier. *Transl. Res.* 236, 35–51.

DOI: 10.1016/j.trsl.2021.06.001

LIU, Y., Y. G. CHEN (2020): Intestinal epithelial plasticity and regeneration via cell dedifferentiation. *Cell Regen.* 9, 14.

DOI: 10.1186/s13619-020-00053-5

LO, Y. H., E. CHUNG, Z. LI, Y. W. WAN, M. M. MAHE, M. S. CHEN, T. K. NOAH, K. N. BELL, H. K. YALAMANCHILI, T. J. KLISCH, Z. LIU, J. S. PARK, N. F. SHROYER (2016): Transcriptional regulation by ATOH1 and its target SPDEF in the intestine. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 51–71.

DOI: 10.1016/j.jcmgh.2016.10.001

LÖNNERHOLM, G., O. SELKING, P. J. WISTRAND (1985): Amount and distribution of carbonic anhydrases CA I and CA II in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 88, 1151–1161.

DOI: 10.1016/s0016-5085(85)80074-3

LOW, D., D. D. NGUYEN, E. MIZOGUCHI (2013): Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. *Drug Des. Dev. Ther.* 7, 1341–1357.

DOI: 10.2147/DDDT.S40107

MAGRO, F., C. LANGNER, A. DRIESSEN, A. ENSARI, K. GEBOES, G. J. MANTZARIS, V. VILLANACCI, G. BECHEANU, P. BORRALHO NUNES, G. CATHOMAS, W. FRIES, A. JOURET-MOURIN, C. MESCOLI, G. DE PETRIS, C. A. RUBIO, N. A. SHEPHERD, M. VIETH, R. ELIAKIM, ESP, ECCO (2013): European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J. Crohn's Colitis* 7, 827–851.
DOI: 10.1016/j.crohns.2013.06.001

MAJUMDAR, D., J. P. TIERNAN, A. J. LOBO, C. A. EVANS, B. M. CORFE (2012): Keratins in colorectal epithelial function and disease. *Int. J. Exp. Pathol.* 93, 305–318.
DOI: 10.1111/j.1365-2613.2012.00830.x

MANKERTZ, J., B. HILLENBRAND, S. TAVALLI, O. HUBER, M. FROMM, J. D. SCHULZKE (2004): Functional crosstalk between Wnt signalling and Cdx-related transcriptional activation in the regulation of the claudin-2 promoter activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 1001–1007.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.12.185

MEI, X., M. GU, M. LI (2020): Plasticity of Paneth cells and their ability to regulate intestinal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 11, 349.
DOI: 10.1186/s13287-020-01857-7

MIKHAEL, M., Y. S. KHAN (2023): Anatomy, Abdomen and Pelvis: Lymphatic Drainage. In: StatPearls. StatPearls Publishing.

MISHIRO, T., R. KUSUNOKI, A. OTANI, M. M. ANSARY, M. TONGU, N. HARASHIMA, T. YAMADA, S. SATO, Y. AMANO, K. ITOH, S. ISHIHARA, Y. KINOSHITA (2013): Butyric acid attenuates intestinal inflammation in murine DSS-induced colitis model via milk fat globule-EGF factor 8. *Lab. Invest.* 93, 834–843.
DOI: 10.1038/labinvest.2013.70

MISSIAGLIA, E., B. JACOBS, G. D'ARIO, A. F. DI NARZO, C. SONESON, E. BUDINSKA, V. POPOVICI, L. VECCHIONE, S. GERSTER, P. YAN, A. D. ROTH, D. KLINGBIEL, F. T. BOSMAN, M. DELORENZI, S. TEJPAR (2014): Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. *Ann. Oncol.* 25, 1995–2001.

DOI: 10.1093/annonc/mdu275

MIYOSHI, H. (2017): Wnt-expressing cells in the intestines: Guides for tissue remodeling. *J. Biochem.* 161, 19–25.

DOI: 10.1093/jb/mvw070

MIYOSHI, H., K. L. VANDUSSEN, N. P. MALVIN, S. H. RYU, Y. WANG, N. M. SONNEK, C. W. LAI, T. S. STAPPENBECK (2017): Prostaglandin E2 promotes intestinal repair through an adaptive cellular response of the epithelium. *EMBO J.* 36, 5–24.

DOI: 10.15252/emboj.201694660

MOWAT, A. M., W. W. AGACE (2014): Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 667–685.

DOI: 10.1038/nri3738

MULVANEY, J., A. DABDOUB (2012): *Atoh1*, an essential transcription factor in neurogenesis and intestinal and inner ear development: function, regulation, and context dependency. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 13, 281–293.

DOI: 10.1007/s10162-012-0317-4

MUTO, S., M. HATA, J. TANIGUCHI, S. TSURUOKA, K. MORIWAKI, M. SAITOU, K. FURUSE, H. SASAKI, A. FUJIMURA, M. IMAI, E. KUSANO, S. TSUKITA, M. FURUSE (2010): Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 8011–8016.

DOI: 10.1073/pnas.0912901107

NAKADA, N., T. MIKAMI, K. HORIE, R. NAGASHIO, Y. SAKURAI, I. SANOYAMA, T. YOSHIDA, M. SADA, K. KOBAYASHI, Y. SATO, I. OKAYASU, Y. MURAKUMO (2020): Expression of CA2 and CA9 carbonic anhydrases in ulcerative colitis and ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *Pathol. Int.* 70, 523–532.
DOI: 10.1111/pin.12949

NG, S. C., H. Y. SHI, N. HAMIDI, F. E. UNDERWOOD, W. TANG, E. I. BENCHIMOL, R. PANACCIONE, S. GHOSH, J. C. Y. WU, F. K. L. CHAN, J. J. Y. SUNG, G. G. KAPLAN (2017): Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: A systematic review of population-based studies. *Lancet* 390, 2769–2778.
DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32448-0

NING, H., J. LIU, J. TAN, M. YI, X. LIN (2024): The role of the Notch signalling pathway in the pathogenesis of ulcerative colitis: From the perspective of intestinal mucosal barrier. *Front. Med.* 10, 1333531.
DOI: 10.3389/fmed.2023.1333531

NISHITANI, Y., T. TANOUÉ, K. YAMADA, T. ISHIDA, M. YOSHIDA, T. AZUMA, M. MIZUNO (2009): *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. *Int. Immunopharmacol.* 9, 1444–1451.
DOI: 10.1016/j.intimp.2009.08.018

NOAH, T. K., B. DONAHUE, N. F. SHROYER (2011): Intestinal development and differentiation. *Exp. Cell Res.* 317, 2702–2710.
DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.09.006

ODZE, R. D., J. R. GOLDBLUM (2023): *Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas*, 4th ed. Elsevier, Philadelphia.

OKAYASU, I., S. HATAKEYAMA, M. YAMADA, T. OHKUSA, Y. INAGAKI, R. NAKAYA (1990): A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98, 694–702.
DOI: 10.1016/0016-5085(90)90290-H

ORDÁS, I., L. ECKMANN, M. TALAMINI, D. C. BAUMGART, W. J. SANDBORN (2012): Ulcerative colitis. *Lancet* 380, 1606–1619.

DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60150-0

OTTE, M. L., R. LAMA TAMANG, J. PAPAPANAGIOTOU, R. AHMAD, P. DHAWAN, A. B. SINGH (2023): Mucosal healing and inflammatory bowel disease: Therapeutic implications and new targets. *World J. Gastroenterol.* 29, 1157–1172.

DOI: 10.3748/wjg.v29.i7.1157

OU, W., W. XU, Y. WANG, Z. HUA, W. DING, L. CUI, P. DU (2024): Cooperation of Wnt/ β -catenin and Dll1-mediated Notch pathway in Lgr5-positive intestinal stem cells regulates the mucosal injury and repair in DSS-induced colitis mice model. *Gastroenterol. Rep.* 12, goae090.

DOI: 10.1093/gastro/goae090

PAN, P. W., A. RODRIGUEZ, S. PARKKILA (2007): A systematic quantification of carbonic anhydrase transcripts in the mouse digestive system. *BMC Mol. Biol.* 8, 22.

DOI: 10.1186/1471-2199-8-22

PANAH, F. M., K. D. NIELSEN, G. L. SIMPSON, A. SCHÖNHERZ, A. SCHRAMM, C. LAURIDSEN, T. S. NIELSEN, O. HØJBERG, M. FREDBORG, S. PURUP, N. CANIBE (2023): A westernized diet changed the colonic bacterial composition and metabolite concentration in a dextran sulphate sodium pig model for ulcerative colitis. *Front. Microbiol.* 14, 1018242.

DOI: 10.3389/fmicb.2023.1018242

PAWLINA, W., M. H. ROSS (2018): *Histology: A Text and Atlas – With Correlated Cell and Molecular Biology*, 8th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia.

PEREDA, G. A., A. D. KOCINSKI, A. V. BRONCANO, S. K. MCNEER, M. L. RAYMOND, N. P. ZIATS, K. A. BREAU, J. BURCLAFF, S. T. MAGNESS, W. A. GOODMAN (2025): Sex differences in colonic inflammation are driven by epithelial-specific expression of estrogen receptor alpha. *Gastro Hep Adv.* 4, 100624.

DOI: 10.1016/j.gastha.2025.100624

PERŠE, M., A. CERAR (2012): Dextran sulfate sodium colitis mouse model: traps and tricks. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 718617.

DOI: 10.1155/2012/718617

PICKERT, G., C. NEUFERT, M. LEPPKES, Y. ZHENG, N. WITTKOPF, M. WARNTJEN, H. A. LEHR, S. HIRTH, B. WEIGMANN, S. WIRTZ, W. OUYANG, M. F. NEURATH, C. BECKER (2009): STAT3 links IL-22 signalling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J. Exp. Med.* 206, 1465–1472.

DOI: 10.1084/jem.20082683

POSOVSZKY, C. (2017): Development and anatomy of the enteroendocrine system in humans. *Endocr. Dev.* 32, 20–37.

DOI: 10.1159/000475729

PRASAD, S., R. MINGRINO, K. KAUKINEN, K. L. HAYES, R. M. POWELL, T. T. MACDONALD, J. E. COLLINS (2005): Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab. Invest.* 85, 1139–1162.

DOI: 10.1038/labinvest.3700316

QIAO, Y., C. HE, Y. XIA, D. K. W. OCANSEY, F. MAO (2025): Intestinal mucus barrier: A potential therapeutic target for IBD. *Autoimmun. Rev.* 24, 103717.

DOI: 10.1016/j.autrev.2024.103717

RAOUF, Z., S. N. STEINWAY, D. SCHEESE, C. M. LOPEZ, J. W. DUESS, K. TSUBOI, M. SAMPAH, D. KLERK, M. EL BAASSIRI, H. MOORE, C. TRAGESSEY, T. PRINDLE, S. WANG, M. WANG, H. S. JANG, W. B. FULTON, C. P. SODHI, D. J. HACKAM (2024): Colitis-induced small intestinal hypomotility is dependent on enteroendocrine cell loss in mice. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 53–70.

DOI: 10.1016/j.jcmgh.2024.02.017

RIOS-ARCE, N. D., F. L. COLLINS, J. D. SCHEPPER, M. D. STEURY, S. RAEHTZ, H. MALLIN, D. T. SCHOENHERR, N. PARAMESWARAN, L. R. MCCABE (2017): Epithelial barrier function in gut-bone signalling. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1033, 151–183.

DOI: 10.1007/978-3-319-66653-2_8

ROSENTHAL, R., S. MILATZ, S. M. KRUG, B. OELRICH, J. D. SCHULZKE, S. AMASHEH, D. GÜNZEL, M. FROMM (2010): Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J. Cell Sci.* 123, 1913–1921.

DOI: 10.1242/jcs.060665

SADLER, T. W. (2024): *Langman's Medical Embryology*, 15th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, 223–240.

SAIZ, M. L., D. CIBRIAN, M. RAMÍREZ-HUESCA, D. TORRALBA, O. MORENO-GONZALO, F. SÁNCHEZ-MADRID (2017): Tetraspanin CD9 limits mucosal healing in experimental colitis. *Front. Immunol.* 8, 1854.

DOI: 10.3389/fimmu.2017.01854

SAMESHIMA, S., S. KOKETSU, E. TAKESHITA, Y. KUBOTA, T. OKUYAMA, K. SAITO, Y. UEDA, T. SAWADA, M. OYA (2015): Surgical resections of ulcerative colitis associated with dysplasia or carcinoma. *World J. Surg. Oncol.* 13, 70.

DOI: 10.1186/s12957-015-0499-4

SANN, H., M. ERICHSEN, M. HESSMANN, A. PAHL, A. HOFFMEYER (2013): Efficacy of drugs used in the treatment of IBD and combinations thereof in acute DSS-induced colitis in mice. *Life Sci.* 92, 708–718.

DOI: 10.1016/j.lfs.2013.01.028

SCEATS, L. A., A. M. MORRIS, M. K. BUNDORF, K. T. PARK, C. KIN (2019): Sex differences in treatment strategies among patients with ulcerative colitis: A retrospective cohort analysis. *Dis. Colon Rectum* 62, 586–594.

DOI: 10.1097/DCR.0000000000001342

SCHOLZEN, T., J. GERDES (2000): The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182, 311–322.

DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3

SHANG, K., X. QI, T. TIAN, H. SHI, Y. ZHU, F. ZHANG (2025): Regulation of the tuft cell–ILC2 circuit in intestinal mucosal immunity. *Front. Immunol.* 16, 1568062.

DOI: 10.3389/fimmu.2025.1568062

SKINNER, D., C. J. WEHRLE, K. VAN FOSSEN (2023): *Anatomy, Abdomen and Pelvis: Inferior Mesenteric Artery*. StatPearls Publishing.

SMITH, N. R., A. C. GALLAGHER, M. H. WONG (2016): Defining a stem cell hierarchy in the intestine: markers, caveats and controversies. *J. Physiol.* 594, 4781–4790.

DOI: 10.1113/JP271651

SMITH, P. M., M. R. HOWITT, N. PANIKOV, M. MICHAUD, C. A. GALLINI, M. BOHLOOLY-Y, J. N. GLICKMAN, W. S. GARRETT (2013): The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 341, 569–573.

DOI: 10.1126/science.1241165

SOMMER, K., M. WIENDL, T. M. MÜLLER, K. HEIDBREDER, C. VOSKENS, M. F. NEURATH, S. ZUNDLER (2021): Intestinal mucosal wound healing and barrier integrity in IBD—crosstalk and trafficking of cellular players. *Front. Med.* 8, 643973.

DOI: 10.3389/fmed.2021.643973

SPECIAN, R. D., M. R. NEUTRA (1980): Mechanism of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine. *J. Cell Biol.* 85, 626–640.

DOI: 10.1083/jcb.85.3.626

STANDRING, S. (2021): *Gray’s Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*, 42nd ed. Elsevier, London.

STEWART, A. K., C. A. BOYD, R. D. VAUGHAN-JONES (1999): A novel role for carbonic anhydrase: cytoplasmic pH gradient dissipation in mouse small intestinal enterocytes. *J. Physiol.* 516, 209–217.

DOI: 10.1111/j.1469-7793.1999.209aa.x

STURM, A., A. U. DIGNASS (2008): Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 14, 348–353.

DOI: 10.3748/wjg.14.348

SUGIMOTO, K., A. OGAWA, E. MIZOGUCHI, Y. SHIMOMURA, A. ANDOH, A. K. BHAN, R. S. BLUMBERG, R. J. XAVIER, A. MIZOGUCHI (2008): IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* 118, 534–544.

DOI: 10.1172/JCI33194

SUNG, M., E. PARK, Y. CHOI, J. HWANG, E.-S. OH (2025): Regional differences in structure, function, and inflammatory response of the large intestine. *Innov. Acupunct. Med.* 18, 6.

DOI: 10.1186/s44424-025-00006-2

SWAFFORD, D., A. SHANMUGAM, P. RANGANATHAN, I. MANOHARAN, M. HUSSEIN, N. PATEL, H. SIFUENTES, P. A. KONI, P. D. PRASAD, M. THANGARAJU, S. MANICASSAMY (2020): The Wnt- β -catenin–IL-10 signaling axis in intestinal APCs protects mice from colitis-associated colon cancer. *J. Immunol.* 205, 2265–2275.

DOI: 10.4049/jimmunol.1901376

TAO, Z., L. LI, Y. ZHANG, Y. TANG, S. ZHANG, H. YANG, G. JIANG, R. ZHANG, Z. WU, M. HE (2025): The role of the tuft cell–interleukin-25 axis in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Front. Immunol.* 16, 1629060.

DOI: 10.3389/fimmu.2025.1629060

TETTEH, P. W., O. BASAK, H. F. FARIN, K. WIEBRANDS, K. KRETZSCHMAR, H. BEGTHEL, M. VAN DEN BORN, J. KORVING, F. DE SAUVAGE, J. H. VAN ES, A. VAN OUDENAARDEN, H. CLEVERS (2016): Replacement of lost Lgr5-positive stem cells through plasticity of their enterocyte-lineage daughters. *Cell Stem Cell* 18, 203–213.
DOI: 10.1016/j.stem.2016.01.001

TOMIC, G.; MORRISSEY, E.; KOZAR, S.; ET AL. (2018): Phospho-regulation of ATOH1 is required for plasticity of secretory progenitors and tissue regeneration. *Cell Stem Cell* 23(3): 436–443.e7.
DOI: 10.1016/j.stem.2018.07.002

TREUTING, P. M., S. M. DINTZIS, K. S. MONTINE (2018): *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*, 2nd ed. Academic Press, London.

VAN DER GIESSEN, J., C. J. VAN DER WOUDE, M. P. PEPPELENBOSCH, G. M. FÜHLER (2019): A direct effect of sex hormones on epithelial barrier function in inflammatory bowel disease models. *Cells* 8, 261.
DOI: 10.3390/cells8030261

VAN DER POST, S., G. C. HANSSON (2014): Membrane protein profiling of human colon reveals distinct regional differences. *Mol. Cell. Proteomics* 13, 2277–2287.
DOI: 10.1074/mcp.M114.040204

VAN ITALLIE, C. M., J. M. ANDERSON (2013): Claudin interactions in and out of the tight junction. *Tissue Barriers* 1, e25247.
DOI: 10.4161/tisb.25247

VANDUSSEN, K. L., L. C. SAMUELSON (2010): Mouse atonal homolog 1 directs intestinal progenitors to secretory cell rather than absorptive cell fate. *Dev. Biol.* 346, 215–223.
DOI: 10.1016/j.ydbio.2010.07.026

WANG, L., P. Q. YUAN, Y. TACHÉ (2023): Vasculature in the mouse colon and spatial relationships with the enteric nervous system, glia, and immune cells. *Front. Neuroanat.* 17, 1130169.

DOI: 10.3389/fnana.2023.1130169

WATANABE, N., M. KOBAYASHI, T. KURIKI, Y. EBIZUKA, M. HIRATA, R. MIZUGUCHI, M. TAKIMOTO, B. YIDAN, M. LUO, M. TODOROKI, M. S. G. LOLA, X. ZOU, S. JIANG, T. KIGATA, M. SHIBUTANI, T. YOSHIDA, T. OMATSU (2026): Wnt and Treg-associated signalling coordinate mucosal regeneration and MALT formation in a mouse model of chronic colitis. *Int. J. Mol. Sci.* 27, 779.

DOI: 10.3390/ijms27020779

WATSON, C. S., Y. J. JENG, M. Y. KOCHUKOV (2008): Nongenomic actions of estradiol compared with estrone and estriol in pituitary tumor cell signalling and proliferation. *FASEB J.* 22, 3328–3336.

DOI: 10.1096/fj.08-107672

WIRTZ, S., V. POPP, M. KINDERMANN, K. GERLACH, B. WEIGMANN, S. FICHTNER-FEIGL, M. F. NEURATH (2017): Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nat. Protoc.* 12, 1295–1309. DOI: 10.1038/nprot.2017.044

WORTHINGTON, J. J., F. REIMANN, F. M. GRIBBLE (2018): Enteroendocrine cells—sensory sentinels of the intestinal environment and orchestrators of mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 11, 3–20.

DOI: 10.1038/mi.2017.73

XIAO, Y. T., W. H. YAN, Y. CAO, J. K. YAN, W. CAI (2016): Neutralization of IL-6 and TNF- α ameliorates intestinal permeability in DSS-induced colitis. *Cytokine* 83, 189–192.

DOI: 10.1016/j.cyto.2016.04.012

XU, L., G. HUANG, Y. CONG, Y. YU, Y. LI (2022): Sex-related differences in inflammatory bowel diseases: the potential role of sex hormones. *Inflamm. Bowel Dis.* 28, 1766–1775.

DOI: 10.1093/ibd/izac094

- YAN, Y., V. KOLACHALA, G. DALMASSO, H. NGUYEN, H. LAROUI, S. V. SITARAMAN, D. MERLIN (2009): Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sulfate sodium induced colitis. *PLoS One* 4, e6073.
DOI: 10.1371/journal.pone.0006073
- YANG, C., D. MERLIN (2024): Unveiling colitis: a journey through the dextran sulfate sodium-induced model. *Inflamm. Bowel Dis.* 30, 844–853.
DOI: 10.1093/ibd/izad312
- YANG, Q., N. A. BERMINGHAM, M. J. FINEGOLD, H. Y. ZOGHBI (2001): Requirement of *Math1* for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* 294, 2155–2158.
DOI: 10.1126/science.1065718
- YASHIRO, M. (2014): Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 20, 16389–16397.
DOI: 10.3748/wjg.v20.i44.16389
- ZHAO, H., L. SUN, X. XIAO, J. LIN, C. SHAO, L. LIN (2022): Qu-Yu-Jie-Du decoction ameliorates dextran sulphate sodium-induced colitis in mice by modulation of neutrophils and macrophage infiltration. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2022, 3762591.
DOI: 10.1155/2022/3762591
- ZHENG, L., S. L. DUAN (2023): Molecular regulation mechanism of intestinal stem cells in mucosal injury and repair in ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* 29, 2380–2396.
DOI: 10.3748/wjg.v29.i16.2380
- ZHENG, L., S. L. DUAN, X. L. WEN, Y. C. DAI (2022): Molecular regulation after mucosal injury and regeneration in ulcerative colitis. *Front. Mol. Biosci.* 9, 996057.
DOI: 10.3389/fmolb.2022.996057

ZHENG, X., K. TSUCHIYA, R. OKAMOTO, M. IWASAKI, Y. KANO, N. SAKAMOTO, T. NAKAMURA, M. WATANABE (2011): Suppression of HATH1 gene expression directly regulated by HES1 via Notch signalling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 2251–2260.

DOI: 10.1002/ibd.21611

ZHENG, Y., P. A. VALDEZ, D. M. DANILENKO, Y. HU, S. M. SA, Q. GONG, A. R. ABBAS, Z. MODRUSAN, N. GHILARDI, F. J. DE SAUVAGE, W. OUYANG (2008): Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* 14, 282–289.

DOI: 10.1038/nm1720

ZHOU, W., E. A. DAVIS, K. LI, R. A. NOWAK, M. J. DAILEY (2018): Sex differences influence intestinal epithelial stem cell proliferation independent of obesity. *Physiol. Rep.* 6, e13746.

DOI: 10.14814/phy2.13746

ZITTER, R. C., R. M. CHUGH, P. BHANJA, B. F. KIMLER, S. SAHA (2023): LGR5+ intestinal stem cells display sex-dependent radiosensitivity. *Cells* 13, 46.

DOI: 10.3390/cells13010046

9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNASTVENIH RADOVA

9.1. ŽIVOTOPIS

Maja Antolić, DVM, univ. spec. med. vet., rođena je 8. siječnja 1989. godine u Sisku, gdje je završila osnovnu školu i Gimnaziju Sisak, smjer opća gimnazija. Upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2007. godine i diplomirala 2013. godine. Tijekom studija je dobila Rektorovu nagradu za studentski znanstveni rad „Molekularna etiološka retrospektivna studija infektivnih hemolitičkih anemija pasa“. Poslijediplomski studij iz područja Veterinarske patologije upisuje 2016. godine i završava ga 2018. godine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Zaposlena je u biotehnološkoj kompaniji Selvita od 2014. godine, a trenutno obnaša poziciju starijeg znanstvenika i voditelja grupe u histopatološkom laboratoriju. U svom radu sudjeluje u dizajniranju, izvođenju i interpretaciji studija primjenom različitih patoloških tehnika te integracijom kliničkih i eksperimentalnih podataka. Također, provodi analizu primjenom digitalnog patološkog softvera i ocjenjivanje uzoraka životinjskog tkiva u farmakodinamičkim i mehanističkim studijama, uključujući identifikaciju i potvrdu ciljeva i biomarkera, te aktivno sudjeluje u razvoju i implementaciji novih modela i metoda u suradnji s internim odjelima i kliničkim partnerima.

Tijekom stručnog usavršavanja sudjelovala je na brojnim tečajevima i radionicama iz područja patologije, medicine laboratorijskih životinja i istraživačkih metoda. Nositeljica je certifikata iz digitalne patologije koji dodjeljuje *National Society for Histotechnology*, a dodatno se educirala za rad na specijaliziranoj opremi i softverima, uključujući Zeiss AxioVision i Axio Scan.Z1 sustav za digitalizaciju histoloških preparata te Visiopharm i Calopix softver za digitalnu patologiju. Završila je osposobljavanje za rad s laboratorijskim životinjama (ekvivalent FELASA kategorije C). Sudjelovala je na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima te redovito objavljuje znanstvene radove u međunarodnim časopisima iz područja patologije u pretkliničkim istraživanjima, translacijske medicine te gastrointestinalnih animalnih modela.

9.2. LISTA PUBLIKACIJA

9.2.1. Znanstveni radovi objavljeni u časopisima

ANTOLIĆ, M., M. JANJIĆ, I. IVIĆ, V. MILUTINOVIĆ, A. OGNJENOVIĆ, A. VOLAJ-BIJELIĆ, A. MARKOTA, H. BRZICA, I. GLOJNARIĆ, V. ERAKOVIĆ HABER, A. GUDAN KURILJ, S. ČUŽIĆ (2026): Sex Differences in Secretory and Absorptive Progenitor Cell Populations During Colon Regeneration Following DSS-Induced Injury. *Vet Arhiv*. DOI: 10.24099/vet.arhiv.3156.

ČUŽIĆ, S., V. MILUTINOVIĆ, **M. ANTOLIĆ**, A. OGNJENOVIĆ (2024): Necropsy in Mouse Research. In: Čemažar, M., T. Jesenko, U. Lampreht Tratar (eds), *Mouse Models of Cancer. Methods in Molecular Biology*, vol. 2773, Humana, New York, NY, pp. 175–195. DOI: 10.1007/978-1-0716-3714-2_16.

DEKEN, M. A., K. NIEWOLA-STASZKOWSKA, O. PEYRUCHAUD, N. MIKULČIĆ, **M. ANTOLIĆ**, P. SHAH, A. CHEASTY, A. TAGLIAVINI, A. NIZZARDO, M. PERGHER, L. ZIVIANI, S. MILLERI, C. PICKERING, M. LAHN, L. VAN DER VEEN, G. DI CONZA, Z. JOHNSON (2023): Characterization and translational development of IOA-289, a novel autotaxin inhibitor for the treatment of solid tumors. *Immuno-Oncology Technology*, 18, 100384. DOI: 10.1016/j.iotech.2023.100384.

ANZULOVIC ŠANTA, Ž., A. OGNJENOVIĆ, **M. ANTOLIĆ**, S. ČUŽIĆ, I. GLOJNARIĆ, B. HRVAČIĆ, F. BOŽIĆ (2023): Retrospective assessment of nintedanib in the mice model of pulmonary fibrosis: alignment with patient outcomes in idiopathic pulmonary fibrosis. *Veterinarska stanica*, 54, 395–406. DOI: 10.46419/Vs.54.4.4.

SEVELJEVIĆ-JARAN, D., **M. ANTOLIĆ**, A. OGNJENović, O. KALLIOKOSKI, K. S. ABELSON, P. J. HAU (2023): Effects of Multimodal Therapy, Blinding, and Multi-laboratory Protocol Conduct on the Robustness of the Rat Model of Adjuvant Induced Arthritis. *In Vivo*, 37, 115–123.
DOI: 10.21873/invivo.13060.

ČUŽIĆ, S., **M. ANTOLIĆ**, A. OGNJENović, D. STUPIN-POLANČEC, A. PETRINIĆ GRBA, B. HRVAČIĆ, M. DOMINIS KRAMARIĆ, S. MUSLADIN, L. POŽGAJ, I. ZLATAR, D. POLANČEC, G. ARALICA, M. BANIĆ, M. UREK, B. MIJANDRUŠIĆ SINČIĆ, A. ČUBRANIĆ, I. GLOJNARIĆ, M. BOSNAR, V. ERAKOVIĆ HABER (2021): Claudins: Beyond Tight Junctions in Human IBD and Murine Models. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 682614.
DOI: 10.3389/fphar.2021.682614.

BECK, A., D. HUBER, **M. ANTOLIĆ**, Ž. ANZULović, I. REIL, A. POLKINGHORNE, G. BANETH, R. BECK (2019): Retrospective study of canine infectious haemolytic anaemia cases reveals the importance of molecular investigation in accurate postmortal diagnostic protocols. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 65, 81–87.
DOI: 10.1016/j.cimid.2019.05.006.

9.2.2. Kongresni znanstveni radovi

ANTOLIĆ, M., S. SRAKOČIĆ, M. JANJIĆ, V. MILUTINOVIĆ, A. OGNJENović, A. IVIĆ, S. VIDOVIĆ IVIŠ, H. BRZICA, I. GLOJNARIĆ, S. ČUŽIĆ (2026): High-Fat Diet Disrupts Intestinal Crypt Homeostasis by Modulating Epithelial Proliferation and Immune Cell Dynamics in Mice. ECE, May 9–12, 2026, Prague, Czech Republic.

ANTOLIĆ, M., A. VOLAJ-BIJELIĆ, V. MILUTINOVIĆ, A. OGNJENović, A. MARKOTA, M. JANJIĆ, S. VIDOVIĆ IVIŠ, H. BRZICA, I. GLOJNARIĆ, S. ČUŽIĆ (2025): A study of sex differences in the intestinal mucosa healing process using murine DSS-induced colitis model with recovery. UEG Week, October 4–7, 2025, Berlin, Germany.

ANTOLIĆ, M., S. SRAKOČIĆ, V. MILUTINOVIĆ, I. STRAŽIĆ GELJIĆ, A. IVIĆ, A. OGNJENOVIĆ, S. VIDOVIĆ IVIŠ, H. BRZICA, I. GLOJNARIĆ, S. ČUŽIĆ (2025): 20-week high fat diet in the mouse triggers initial process of spermatogenesis arrest. Joint Congress of ESPE and ESE 2025, May 10–13, 2025, Copenhagen, Denmark.

GLOGOŠKI CEDILAK, M., D. BELAMARIĆ, A. OGNJENOVIĆ, M. JANJIĆ, **M. ANTOLIĆ**, V. MILUTINOVIĆ, L. POŽGAJ, S. ČUŽIĆ, M. BOSNAR, V. ERAKOVIĆ HABER (2025): Viability and epithelial cell dynamics in human precision-cut lung slices during prolonged ex vivo incubation. ATS 2025, May 17–21, 2025, San Diego, USA.

IVIĆ, I., A. MARKOTA, V. MEGLIĆ, I. BUSCH, H. BRZICA, A. IVIĆ, A. OGNJENOVIĆ, **M. ANTOLIĆ**, V. MILUTINOVIĆ, I. GLOJNARIĆ, S. ČUŽIĆ (2025): Localized Dry Powder Delivery of Fluticasone Propionate Reduces Pulmonary Inflammation and Improves Lung Function in an HDM-Induced Asthma Model. ATS 2025, May 17–21, 2025, San Diego, USA.

BUSCH, I., B. HRVAČIĆ, I. IVIĆ, H. BRZICA, A. OGNJENOVIĆ, **M. ANTOLIĆ**, V. MILUTINOVIĆ, I. GLOJNARIĆ, S. ČUŽIĆ (2024): Murine Multiple Challenge Bleomycin-Induced Model of Lung Fibrosis Features Elements of Human Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Is Reverted by Nintedanib Treatment. ATS 2024, May 17–22, 2024, San Diego, USA.

JELIĆ, G., A. PERIS, A. BOSAK, M. JANJIĆ, S. VIDOVIĆ IVIŠ, N. PACENTI, **M. ANTOLIĆ**, A. OGNJENOVIĆ, V. MILUTINOVIĆ, S. ČUŽIĆ (2023): Metoda in situ hibridizacije u Odjelu za histopatologiju, Selvita d.o.o. za istraživanje i razvoj. PACIT – Joint meeting of Croatian societies for pathology and clinical cytology, November 23–26, 2023, Dubrovnik, Croatia.

ANTOLIĆ, M., V. MILUTINOVIĆ, A. MARKOTA, A. VOLAJ-BIJELIĆ, A. OGNJENOVIĆ, H. BRZICA, I. GLOJNARIĆ, S. ČUŽIĆ (2023): Crypt-villus dynamics post-DSS exposure in murine colitis model of inflammatory bowel disease. UEG Week, October 14–17, 2023, Copenhagen, Denmark.

OGNJENOVIC, A., S. ČUŽIĆ, **M. ANTOLIĆ**, V. MILUTINOVIC, Ž. ANZULOVIC ŠANTA, B. HRVAČIĆ, I. GLOJNARIĆ (2023): Wnt3 α in a mouse model of bleomycin induced lung fibrosis. 35th European Congress of Pathology, September 9–13, 2023, Dublin, Ireland.

PETRINIĆ GRBA, A., D. ŠTEFOK, M. CEDILAK, A. PARAVIĆ RADIČEVIĆ, **M. ANTOLIĆ**, A. OGNJENOVIC, S. VIDOVIĆ IVIŠ, V. MILUTINOVIC, S. ČUŽIĆ, M. BOSNAR, V. ERAKOVIĆ HABER (2022): Human skin explant as a model for inflammation and wound healing. 3rd International Conference on Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis, October 2022, Chania, Crete, Greece.

ANTOLIĆ, M., K. ŠPIRANEC SPES, A. MARKOTA, A. VOLAJ-BIJELIĆ, V. MILUTINOVIC, A. OGNJENOVIC, A. PARAVIĆ RADIČEVIĆ, I. GLOJNARIĆ, M. BOSNAR, R. SUZUKI, A. J. BROWN, S. ČUŽIĆ, V. ERAKOVIĆ HABER (2022): Claudin-2 overexpression in stem cell zone correlates with increased intestinal permeability and epithelial cell proliferation during short recovery period in acute murine DSS model of inflammatory bowel disease. UEG Week, October 8–10, 2022, Vienna, Austria.

ANTOLIĆ, M., O. MAJSTOROVIC, V. MILUTINOVIC, S. VIDOVIĆ IVIŠ, A. OGNJENOVIC, A. PARAVIĆ RADIČEVIĆ, I. GLOJNARIĆ, S. ČUŽIĆ (2022): Treatment with activin receptor-like kinase 5 inhibitors (ALK5i) differently affect collagen 1A1 deposition in mouse models of toxic and metabolically induced liver fibrosis. 34th European Congress of Pathology, September 3–7, 2022, Basel, Switzerland.

MAJSTOROVIC, O., **M. ANTOLIĆ**, S. ČUŽIĆ, L. MUŠAK, M. CEDILAK, H. BRZICA, M. BOSNAR, I. GLOJNARIĆ (2022): Evaluation of semisynthetic high-fat diets in development of a 4-week mouse NASH model. EASL International Liver Congress, June 22–26, 2022, London, UK.

ANTOLIĆ, M., O. MAJSTOROVIC, V. MILUTINOVIC, A. OGNJENOVIC, I. VIDOVIĆ IVIŠ, H. BRZICA, I. GLOJNARIĆ, S. ČUŽIĆ (2022): Histopathological changes in pancreas in a diet-induced mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. 28th Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology, June 10–11, 2022, Zagreb, Croatia.

OGNJENović, A., S. ČUŽIĆ, **M. ANTOLIĆ**, S. VIDOVIĆ, V. MILUTINOVIĆ, Ž. ANZULOVIĆ ŠANTA, B. HRVAČIĆ, A. MARKOTA, I. GLOJNARIĆ (2021): Club cells are the source of Wnt3 α in a mouse model of bleomycin induced lung fibrosis. Wnt & β -Catenin Targeted Drug Discovery Summit, November 18–20, 2021, virtual.

ANTOLIĆ, M., A. OGNJENović, H. BRZICA, M. DOMINIS KRAMARIĆ, I. GLOJNARIĆ, S. ČUŽIĆ (2021): Quantification of mast cells in dextran sulphate sodium (DSS) chronic colitis as an animal model of inflammatory bowel disease. 33rd European Congress of Pathology, August 19–21, 2021, virtual.

ANZULOVIĆ ŠANTA, Ž., **M. ANTOLIĆ**, A. OGNJENović, S. ČUŽIĆ, I. GLOJNARIĆ, B. HRVAČIĆ (2019): A translational value of pulmonary function tests in a mouse model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis: effects of approved therapies Nintedanib and Pirfenidone. ERS International Congress, September 28–October 2, 2019, Madrid, Spain.

ANTOLIĆ, M., A. OGNJENović, G. ARALICA, M. BANIĆ, V. ERAKOVIĆ HABER, I. GLOJNARIĆ, S. ČUŽIĆ (2019): Expression of Wingless-related integration site-3 α (Wnt-3 α) and Olfactomedin4 (OLFM4) in pseudopyloric metaplasia of small intestine in patients with Crohn disease. 31st European Congress of Pathology, September 7–11, 2019, Nice, France.

ANTOLIĆ, M., A. OGNJENović, D. RELKOVIĆ, O. MAJSTOROVIĆ, A. BRUIĆ, I. GLOJNARIĆ, S. ČUŽIĆ (2019): Lung goblet cell hyperplasia/metaplasia quantification in a murine model of respiratory syncytial virus induced pulmonary inflammation using digital image analysis. 27th Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology, May 31–June 1, 2019, Zagreb, Croatia.

MAJSTOROVIĆ, O., **M. ANTOLIĆ**, A. OGNJENović, S. ČUŽIĆ, A. PARAVIĆ RADIČEVIĆ, M. CEDILAK, M. BOSNAR, H. BRZICA, I. GLOJNARIĆ, D. RELKOVIĆ (2019): Elafibranor effectively reduces development of CDAHFD-induced non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and fibrosis in mice. 2nd Global NASH Congress 2019, February 25–26, 2019, London, UK.

ANZULOVIC, Ž., A. OGNJENOVIC, **M. ANTOLIĆ**, A. MARKOTA, B. HRVAČIĆ, S. ČUŽIĆ, I. GLOJNARIĆ (2018): Digital localization and quantification of Wnt-3 α signalling-edited target approach in a 21-day murine model of idiopathic pulmonary fibrosis. HDIR-5: Translating Science to Medicine – Targets and Therapeutics, November 8–10, 2018, Zagreb, Croatia.

HRVAČIĆ, B., I. GLOJNARIĆ, **M. ANTOLIĆ**, D. PEŠIĆ, S. KOŠTRUN, M. BOSNAR, S. ČUŽIĆ (2018): A novel macrocyclic compound reduces fully developed pulmonary fibrosis in the mouse bleomycin model. Second International Conference on Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis, June 2018, Crete, Greece.

MUSLADIN, S., I. ZLATAR, L. PRIBOLŠAN, K. ILIĆ, P. NIKOLIĆ, **M. ANTOLIĆ**, S. ČUŽIĆ, G. ARALICA, L. PATRLJ, R. KLIČEK, M. BOSNAR, V. ERAKOVIĆ HABER (2017): Isolation and characterization of lamina propria mononuclear cells from human colonic mucosa. UEG Week, October 28–November 1, 2017, Barcelona, Spain.

ANTOLIĆ, M., V. ERAKOVIĆ HABER, Ž. JAVORŠČAK, D. MARKOVIĆ, I. GLOJNARIĆ, L. PATRLJ, R. KLIČEK, M. KOPLJAR, G. ARALICA, A. PAČIĆ, S. ČUŽIĆ (2017): Efficacy assessment of new chemical entities in patient derived xenografts on example of TGF β signal pathway in human colorectal cancer. 26th Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology, June 2, 2017, Zagreb, Croatia.

ANZULOVIC, Ž., **M. ANTOLIĆ**, S. ČUŽIĆ, I. GLOJNARIĆ, B. HRVAČIĆ (2017): Prophylactic treatment with ALK5 inhibitor SB525334 significantly improves lung function tests and reduces accumulation of myofibroblasts in the mouse model of bleomycin induced pulmonary fibrosis. First International Conference on Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis, September 2016, Rhodes, Greece.