

# Indukcija programirane stanične smrti luteolinom

---

**Repić, Ivana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:895135>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-12**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivana Repić

INDUKCIJA PROGRAMIRANE STANIČNE SMRTI LUTEOLINOM

Završni rad

Rijeka, 2022.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Dijana Detel, dr.med

Završni rad obranjen je dana 28. lipnja 2022. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci,  
pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Lara Batičić, dipl. san. ing.
2. Doc. dr. sc. Slađana Bursać, dipl. san. ing.
3. Izv. prof. dr. sc. Dijana Detel, dr. med.

Rad ima \_\_33\_\_ stranice, \_\_9\_\_ slika, \_\_0\_\_ tablica, \_\_26\_\_ literaturnih navoda.

## SAŽETAK

**Uvod:** Ulcerozni kolitis upalna je bolest koja zahvaća debelo crijevo te uzrokuje niz patoloških promjena na sluznici debelog crijeva. Promjene na sluznici jedan su od rizičnih čimbenika koji utiru put ka karcinomu debelog crijeva. Bolest je najčešće kroničnog tijeka s izmjenom razdoblja težih manifestacija i mirnog stanja. Neki od glavnih simptoma su krvavi proljevi, mučnina, glavobolja, malaksalost i gubitak tjelesne mase. Trenutačno dostupni tretmani ulceroznog kolitisa su nezadovoljavajući, dok se prirodni bioaktivni spojevi poput flavonoida smatraju terapijskim agensima u razvoju. Luteolin je jedan od spojeva iz velike skupine flavonoida, a ističe se po protutumorskom, protuupalnom, antioksidativnom i antiapoptotskom učinku u mnogim bolestima.

**Cilj:** na pokusnom modelu ulceroznog kolitisa ispitati učinak luteolina na razvoj i intenzitet kolitisa te proces apoptoze.

**Materijal i metode:** Model ulceroznog kolitisa izazvan je u C57BL/6 miševa primjenom 3 % otopine natrijevog dekstran sulfata (DSS) tijekom sedam dana u vodi za piće. Kako bi se ispitalo terapijsko djelovanje luteolin se primijenio u dvije doze od trećeg do sedmog dana pokusnog perioda, *per os*. Tijekom pokusnog perioda odnosno tijekom razvoja kolitisa pratile su se kliničke promjene i stupanj oštećenja tkiva debeloga crijeva. Izražaj specifičnih proteina određen je Western blot metodom i imunohistokemijski.

**Rezultati:** Luteolin je ublažio simptome DSS-induciranog kolitisa kod miševa, zacijelio oštećenje tkiva debelog crijeva te smanjio upalu. Luteolin je značajno smanjio izražaj nuklearnog čimbenik-kapaB podjedinice p65 i proapoptotskih proteina.

**Zaključak:** Rezultati potvrđuju prethodno pokazane učinke luteolina te sugeriraju da se luteolin može koristiti kao novi terapijski kandidat u liječenju ulceroznog kolitisa ili kao dodatak postojećoj terapiji.

Ključne riječi: Ulcerozni kolitis, luteolin, flavonoid, apoptoza, Western blot

## ABSTRACT

**Introduction:** Ulcerative colitis is an inflammatory disease that affects the colon and causes a number of pathological changes in the colon mucosa. Mucosal changes are one of the risk factors in the development of colon cancer. The disease has a chronic course and it is characterized by periods of severe manifestations and a remission state. Some of the main symptoms are bloody diarrhea, nausea, headache, and weight loss. Currently used treatments of ulcerative colitis are unsatisfactory, while natural bioactive compounds like flavonoides are considered to be emerging therapeutic agents. Luteolin is a natural compound with beneficial effects on a variety of diseases, however, its effect on ulcerative colitis has been poorly studied. Luteolin is one of the members of a large group of flavonoids, and is distinguished by its antitumor, anti-inflammatory, antioxidant, and antiapoptotic effect in many diseases.

**Aim:** using an experimental model of ulcerative colitis investigate the effect of luteolin on the development and intensity of ulcerative colitis and the process of apoptosis.

**Material and methods:** The ulcerative colitis was induced by the administration of 3% dextran sulfate sodium salt (DSS) in drinking water for seven days. To investigate the effect of luteolin on the development of colitis two doses of luteolin are administrated between day 3 and day 7 of the experiment period, orally. During the development of colitis, clinical changes were monitored as well as the degree of damage of the colon tissue by histopathological analysis. The expression of the investigated proteins was determined by the Western blot method and immunohistochemically.

**Results:** Luteolin attenuated symptoms of DSS-induced colitis in mice, ameliorated colon tissue damage, and reduced inflammation. Luteolin significantly reduced the expression of nuclear factor-kappa of subunit p65 and proapoptotic proteins.

**Conclusions:** The results confirmed the anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of luteolin. This suggested that luteolin can be used as a novel therapeutic candidate in the treatment of ulcerative colitis or could be used as a supplement to existing therapy.

Key words: Ulcerative colitis, luteolin, flavonoids, apoptosis, Western blot

## SADRŽAJ

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
1.1. Luteolin .....	1
1.2. Struktura i metabolizam luteolina .....	1
1.3. Biološko djelovanje luteolina .....	2
1.4. Antioksidativno djelovanje luteolina.....	2
1.5. Protuupalno djelovanje luteolina.....	3
1.6. Antitumorsko djelovanje luteolina .....	4
<b>2. Ulcerozni kolitis i podvrste.....</b>	<b>5</b>
2.1. Simptomi i komplikacije ulceroznog kolitisa .....	7
2.2. Dijagnosticiranje ulceroznog kolitisa i distinkcija sličnih stanja .....	8
2.3. Epidemiologija ulceroznog kolitisa.....	8
2.4. Terapija ulceroznog kolitisa .....	9
<b>3. Apoptoza .....</b>	<b>10</b>
3.1. Vanjski put apoptoze .....	11
3.2. Unutarnji put pokretanja apoptoze .....	12
<b>4. Identifikacija proteina - Western Blot .....</b>	<b>13</b>
<b>5. Cilj istraživanja .....</b>	<b>15</b>
<b>6. Materijali i metode.....</b>	<b>16</b>
6.1. Protokol izazivanja kolitisa i primjena luteolina .....	16
6.2. Klinička prezentacija ulceroznog kolitisa.....	17
6.3. Žrtvovanje životinja i uzimanje uzoraka .....	17
6.4. Izolacija proteina i priprema tkiva za analizu izražaja specifičnih proteina.....	17
6.5. Priprema parafinskih preparata tkiva debelog crijeva i bojanje hematoksilin/eozinom .....	18
6.6. Imunohistokemijsko bojanje preparata.....	20
<b>7. Rezultati .....</b>	<b>22</b>
7.1. Utjecaj luteolina na kliničke simptome i aktivnost bolesti tijekom razvoja kolitisa .....	22
7.2. Primjena luteolina smanjuje intenzitet histopatoloških promjena tkiva debelog crijeva miševa tijekom razvoja kolitisa .....	24
7.3. Luteolin smanjuje izražaj transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B, u tkivu debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa .....	26
7.4. Luteolin inhibira apoptozu u tkivu debelog crijeva miševa tijekom razvoja kolitisa.....	28
<b>8. Rasprava .....</b>	<b>31</b>
<b>9. Zaključak .....</b>	<b>33</b>

<b>10. Literatura.....</b>	<b>34</b>
----------------------------	-----------

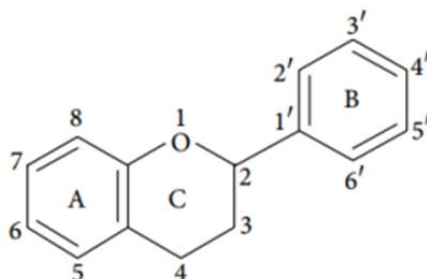
# 1. Uvod

## 1.1. Luteolin

Luteolin ( $C_{15}H_{10}O_6$ ) se može pronaći u brojnom voću i povrću, a tradicionalno se koristio u drevnoj kineskoj medicini. Izoliran je iz biljke *Reseda luteola*, koja se poglavito upotrebljavala kao izvor žutih bojila, a zastupljen je i u biljkama koje upotrebljavamo u svakodnevnoj prehrani kao što su celer, zelena salata, mrkva, čokolada, repa, kupus. Luteolin je prvi put izoliran u čistom obliku i imenovan 1829. godine, a za imenovanje i otkriće zaslužan je francuski kemičar Michel Eugène Chevreul. Austrijski kemičari Heinrich Hlasiwetz i Leopold Pfaundler 1864. godine došli su do empirijske formule luteolina, a 1896. godine engleski kemičar Arthur George Perkin predložio je kemijsku strukturu. Poljsko-švicarski kemičar Stanislaw Kostanecki i njegovi učenici A. Różycki i J. Tambor sintetizirali su luteolin 1900. godine i time potvrdili točnost prethodno predložene strukture (1, 2).

## 1.2. Struktura i metabolizam luteolina

Luteolin, ili 3',4',5,7- tetrahidroksiflavon je organski spoj čije se četiri hidroksi skupine nalaze na 3', 4', 5' i 7' položajima (3-5). Hidroksilne skupine imaju značajnu ulogu u određivanju farmakoloških djelovanja luteolina. Luteolin je pripadnik skupine flavonoida, a flavonoidi su polifenolni spojevi koji su pretežito zastupljeni u biljkama te se sastoje od petnaest ugljikovih atoma, dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem, (C6-C3-C6) Osim dva benzenska prstena u strukturi je primjetan i treći prsten koji sadrži kisik (slika 1.).



**Slika 1.** Struktura luteolina (3).



Dosad je otkriveno, odnosno izolirano otprilike 6000 flavonoida iz različitih biljaka koji su se pokazali izrazito korisnim, a ponajviše u inhibiciji štetnih reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (3-5).

Pokazano je da se apsorpcija luteolina odvija u svim dijelovima gastrointestinalnog sustava, ali je nešto veća u jejunumu i duodenumu nego u ostalim dijelovima probavnog sustava. Apsorpcija je brza, međutim metabolizam je spor. Nakon apsorpcije luteolin konjugira s glukuronskom kiselinom u jetri te se u cirkulaciju izlučuje u obliku luteolin-3'-O-β-D-glukuronida koji je s jedne strane najzastupljeniji oblik, a s druge je odgovoran za fiziološki učinak luteolina. Istraživanja na animalnim modelima pokazala su da osim u obliku glukuronida luteolin cirkulira i u slobodnom obliku, ali i u drugim oblicima npr. u obliku sulfata. Iz organizma se luteolin izlučuje stolicom u obliku aglikona, a žuči i urinom u obliku glukuro- ili sulfo-konjugata (4).

### 1.3. Biološko djelovanje luteolina

Dosadašnji podaci ukazuju da postoje brojne blagodati konzumiranja luteolina, ali i pozitivni terapijski učinci. Biološka aktivnost luteolina uključuje antioksidacijsko, protuupalno i antitumorsko djelovanje.

### 1.4. Antioksidativno djelovanje luteolina

Luteolin posjeduje snažna antioksidativna svojstva te inhibira ROS koji mogu značajno naštetiti organizmu te dovesti do razvoja malignih oboljenja. Luteolin štiti stanicu od ROS-a i inducira apoptozu tumorskih stanica te ima protuupalno i antikancerogeno djelovanje. Inhibira proliferaciju tumorskih stanica te koči razvoj metastaza (2). Primjerice, luteolin potiče nakupljanje molekularnog kisika ( $O_2$ ), smanjujući na taj način koncentraciju vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) u stanicama raka pluća. Takvo prevođenje  $O_2$  u  $H_2O_2$  omogućeno je, odnosno katalizirano enzimom mangan superoksid dismutazom (MnSOD). Naime, uočeno je da luteolin koči aktivnost MnSOD, no upitno je i potrebno je istražiti postoje li neki drugi mehanizmi ukomponirani u peroksidaciju izazvanu luteolinom (6). Nadalje, interferencija ROS-a u staničnoj signalizaciji može poduprijeti apoptozu stanica raka potaknutu luteolinom. Zanimljivo je da su *in vivo* pokusi na miševima s tumorima pokazali luteolinom potisnut rast tumora nastalih od mišjeg Lewisovog karcinoma pluća, ali potisnut rast tumora ovisio je o dozi.

Luteolin potiče apoptotičku smrt stanica aktiviranjem puteva apoptoze i inhibicijom puteva preživljavanja stanica, najčešće neispravnih, što pozitivno utječe na fiziološko stanje organizma. Također, luteolin aktivira intrinzični put apoptoze aktivacijom p53 i izazivanjem oštećenja DNK, što je omogućeno inhibicijom enzima DNA topoizomeraze (6).

### 1.5. Protuupalno djelovanje luteolina

Pokazano je protuupalno djelovanje luteolina, kao i većine flavonoida. U istraživanju analiziran je protuvirusni upalni kapacitet luteolina i njegovi molekularni mehanizmi djelovanja. Rezultati istraživanja pokazali su da luteolin nije imao toksične učinke te su čak uočena nastojanja prema većem preživljavanju stanica. U zaraženim stanicama luteolin je intenzivno kočio proizvodnju NO, inducibilne dušik oksid sintaze (iNOS), ciklooksigenaze-2 (engl. *cyclooxygenase-2*, COX-2 i opću proizvodnju upalnih citokina. Također, luteolin je uzrokovao indukciju hem oksigenaze 1 (engl. *heme oxygenase 1*, HO-1) putem regulacije Nrf2 (nuklearni eritroidni čimbenik 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), a oba su uključena u lučenje prouupalnih medijatora. Naime, blokada ekspresije HO-1 sa SnPP (inhibitorom HO-1), oslabila je indukciju HO-1 luteolinom i na taj način ublažila njegove protuupalne učinke tijekom infekcije stanica. Krajnji rezultati pokazali su da luteolin smanjuje prouupalne medijatore NO, upalne citokine i ekspresiju njihovih regulatornih gena, iNOS i COX-2 u inficiranim stanicama (7). Luteolin, osim što je važan u obrani ljudskog organizma od upale i tumora, od enormne je važnosti za obranu biljaka od UV zračenja. Naime, luteolin djelomično apsorbira UV zračenje. Osim kod fotobioloških i blagotvornih djelovanja koje ima na biljkama, može svoje šaroliko korisno djelovanje primijeniti i na ljudskoj koži. Dokazano je antioksidativno i protuupalno djelovanje luteolina na keratinocite i fibroblaste, ali i na nekoliko podvrsta imunoloških stanica (makrofagi, mastociti, neutrofili, dendritske i T stanice). Luteolin može potisnuti i zakočiti prouupalne medijatore (npr. interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17, IL-22, TNF- $\alpha$  i COX-2) te na taj način regulirati različite signalne puteve, npr. nuklearni čimbenik-kapaB podjedinica p65 (NF- $\kappa$ B), JAK - pretvarač signala i aktivator transkripcije (STAT) 3 kao i TLR (engl. *Toll-like receptor*) signalni put. Pokazano je da luteolin modulira mnoge procese poput starenja kože, zacjeljivanje rana, psorijazu, kontakti i atopijski dermatitis. Pokazano je također, kako luteolin ima obećavajuća i ljekovita svojstva za liječenje mnogih upalnih procesa (8). Međutim, tu ne prestaju blagodati flavonoida, odnosno, luteolina. Formulacija liposomskog luteolina u ekstraktu ploda masline značajno je popravila poremećaj pažnje kod djece s ASD-

om i moždanom „maglom“ (gubitak kratkoročnog i dugoročnog pamćenja) kod bolesnika s mastocitozom. Metilirani analozi luteolina s povećanom biološkom aktivnošću, odnosno većom dostupnošću za biokemijske reakcije imaju veliki potencijal razvitka u visoko učinkovite tretmane neuropsihijatrijskih poremećaja i tretiranja „moždane magle“ (9).

## 1.6. Antitumorsko djelovanje luteolina

Sve su zanimljivija istraživanja novih metoda terapije karcinoma, a osobito onih zloćudnih. Autofagija je zaživjela kao jedna od potencijalnih metoda terapije raka. Mnogi poznati lijekovi čiji je glavni mehanizam usmjeren na autofagiju su pokazali veliki potencijal u inhibiciji proliferacije stanica raka. Autofagija je katabolički proces koji je zadužen za uklanjanje nepotrebnih, odnosno disfunkcionalnih komponenta te omogućuje „recikliranje“ staničnih komponenti. Također, autofagija snabdijeva organizam hranom u stanju gladovanja. Nadalje, autofagijom se razgrađuju toksične komponente i organeli. Kako luteolin igra značajnu ulogu u procesu autofagije, može se reći da ima direktno antitumorsko djelovanje (11). Utvrđeno je da je ekspresija proapoptotičkih proteina značajno povećana ako u terapiju pacijenta oboljelog od karcinoma uključimo luteolin. Također, luteolin inducira preokret epitelno-mezenhimalnog prijelaza (12).

## 2. Ulcerozni kolitis i podvrste

Ulcerozni kolitis (*UK*) jedan je od dva patohistološka oblika upalne bolesti crijeva, a manifestira se iritacijom, čirevima i upalom sluznice debelog crijeva. Bolest ima kronični tijek, a ljudi koji boluju od *UK* većinom imaju simptome koji su jače ili slabije izraženi u određenom vremenskom periodu života. U terapiji još uvijek ne postoji jedinstveni lijek, no pojedini tretmani i redoviti nadzor mogu značajno umanjiti simptome i uspostaviti kontrolu nad bolesti.



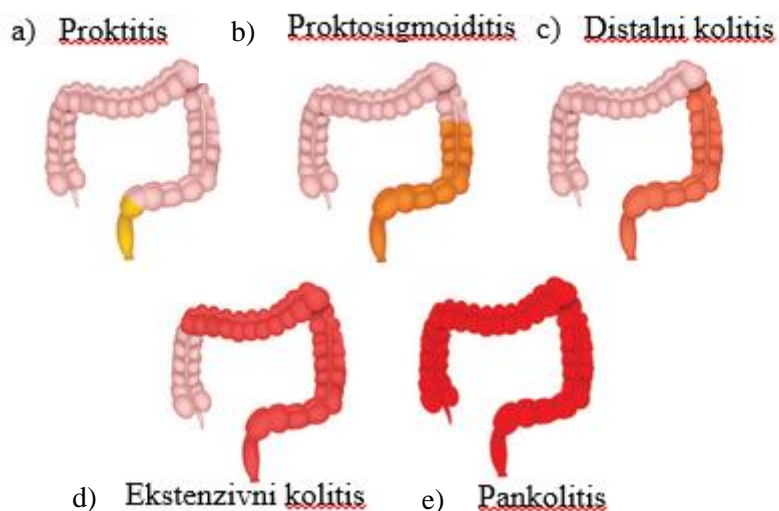
**Slika 2.** Usporedba zdrave sluznice debelog crijeva (desno) i sluznice debelog crijeva pacijenta s ulceroznim kolitisom (lijevo) (16-18)

Kod pacijenata koji boluju od *UK* uočljivo je oštećenje epitelne barijere debelog crijeva prvenstveno zbog poremećene regulacije epitelnih čvrstih spojišta koja, kod zdravih ljudi predstavljaju fizičku barijeru luminalnim bakterijama i imunološkim stanicama, što znači povećanu propusnost. Takav značajan poremećaj homeostaze te nemogućnost postizanja ravnoteže normalnih bakterija koje čine mikrobiotu debelog crijeva i mukoznog imuniteta, završava s konačnim, ali pogrešnim, imunološkim odgovorom u obliku napada na komenzalne bakterije u debelom crijevu. Uostalom, takva narušena homeostatska ravnoteža utječe i na lučenje efektorskih i regulatornih T stanica. Proizvode se T stanice koje otpuštaju IL-5 i IL-13 koji imaju citotoksičan učinak na epitelne stanice te aktiviraju proces apoptoze. Privlačenje proupalnih stanica poput leukocita je posredovano proupalnim citokinima, kemoatraktantima poput, CXCL8 te adhezijskim molekulama (23). Imunološki sustav, ako ispravno funkcionira, napada strana tijela, mikroorganizme i nepoznate potencijalno opasne patogene. No, kod

pacijenata s UK imunološki sustav napada prehranom unesene nutritivne tvari, normalnu mikrobiotu sluznice debelog crijeva te stanice koje oblažu sluznicu debelog crijeva.

Unatoč istraživanjima još nije u potpunosti razjašnjeno na koji način određena populacija obolijeva od UK. Pretpostavlja se da je bitan genetski faktor budući da se bolest ponekad opetovano pojavljuje u istoj obitelji. Epidemiološka istraživanja pokazuju da je rizik za obolijevanje 30% veći, ako u obitelji postoji blisko krvno srodstvo s dotičnim stanjem. Nadalje, dodatni čimbenik rizika za razvijanje bolesti je dob, a najvjerojatnije je da će osoba oboljeti u dobi od 15 do 30 godina te osobe starije od 60 godina. Također, UK je još jedna od mnogobrojnih pa i rijetkih, bolesti povećano ispoljena kod Aškenazi Židova. Suprotno premisama, stres i hrana ne mogu uzrokovati UK, no mogu biti značajni okidači mnogobrojnih simptoma karakterističnih za bolest.

UK podijeljen je na podvrste ovisno o lokalizaciji oštećenja u probavnom sustavu (slika 3). Najblaži je oblik ulcerozni proktitis koji zahvaća samo rektum, odnosno, dio debelog crijeva koji je najbliži analnom otvoru. Ponekad je rektalno krvarenje jedina manifestacija ulceroznog proktitisa. Nadalje, proktosigmoiditis je lokaliziran u donjem dijelu kolona i rektumu, a naziva se još i sigmoidni kolon. Proktosigmoiditis je popraćen krvavim proljevima, boli i grčevima u trbuhu, pacijent ima redovite porive na defekaciju, no bezuspješna pražnjenja. Takvo stanje naziva se tenezam. Sljedeća podvrsta UK naziva se lijevostrani kolitis koji uzrokuje grčevitu bol i grčenje lijeve strane abdomena, krvave proljeve te nagli gubitak kilograma. Upala se kod ovakvog stanja širi od rektuma nagore, ali po lijevoj strani kolona. Potom, pankolitis koji najčešće pogađa cijelo debelo crijevo, a uzrokuje teške akutne krvave proljeve, grčeve u trbuhu, malaksalost, značajan i pretjeran gubitak kilograma i intenzivnu bol, dok je posljednja vrsta ulceroznog kolitisa rijetka, ali postojeća te se naziva akutni teški ulcerozni kolitis. Pogađa cijelo debelo crijevo i uzrok je jakih proljeva, bolova, krvarenja i povišene tjelesne temperature.



**Slika 3.** Tipovi ulceroznog kolitisa ovisno o mjestu zahvaćenosti upalnim procesom

## 2.1. Simptomi i komplikacije ulceroznog kolitisa

Najizraženiji i jedan od najčešćih simptoma UK je krvavi proljev. Osim krvavih proljeva prisutni su i grčeviti bolovi u trbuhu, gubitak apetita i iznenadni gubitci tjelesne mase. Uz navedeno prisutan je umor, bol u zglobovima, vrućica, nagli porivi za defekacijom, afte, dehidracija, gubitak crvenih krvnih stanica, što posljedično može dovesti i do anemije. Još neki od simptoma su bol u očima nakon gledanja u intenzivno žarko svjetlo, upala uvee, upala vanjske ovojnice bjeloočnice (episkleritis), upala bjeloočnice (skleritis) te abnormalnosti rožnice. Česte su i rane na koži, nesanica i prekinuti san zbog poriva na defekaciju i vječitog popratnog osjećaja punoće crijeva i nemogućnosti apsolutnog pražnjenja. Uostalom, pacijenti povremeno ne mogu zadržati stolicu što uzrokuje niz neugodnosti, a bol i krvarenje uz glasno i osjetno gibanje crijeva doprinose osjećaju nelagode i pojačavaju osjet boli. Zanimljivo je da se simptomi mogu individualno razlikovati, povremeno nestati, smanjiti se ili se čak naglo pogoršati. Posljedično zbog kontinuiranih krvarenja, odnosno značajnog gubitka krvi može doći i do anemije. Osim gubitka krvi, organizam kontinuirano gubi i veliku količinu tekućine i nutrijenata što može rezultirati dehidracijom i lošim nutritivnim statusom. Kako je upala po život čovjeka opasno stanje, potrebno je reagirati na prve znakove upale i prevenirati ih kako ne bi utjecali na druge organske sustave, primjerice vid, kožu ili zglobove. Ukoliko je napad UK intenzivan, postoji opasnost od puknuća debelog crijeva, a povremeno i do širenja infekcije

po svim dijelovima tijela. Fulminantni kolitis može uzrokovati puknuće i oticanje debelog crijeva što je uzrok megakolona, izrazito opasnog stanja, koji se liječi operativnim zahvatom. Upalni proces se može proširiti i na jetru ili žuč, a može dovesti i do stvaranja ožiljkastog tkiva na jetri i ozbiljnog oštećenja jetre i žučovoda. Osim fulminantnog kolitisa, još jedna u nizu opasnih komplikacija je i razvoj raka debelog crijeva, a posebice u pacijenata koji od UK boluju duži vremenski period (19- 21).

## 2.2. Dijagnosticiranje ulceroznog kolitisa i distinkcija sličnih stanja

Mnoge bolesti gastrointestinalnog trakta dijele sličnost simptoma UK, a najprepoznatljivije su Chronova bolest i iritabilni kolon. Dok UK pogađa samo debelo crijevo, Chronova bolest zahvaća i druge dijelove probavnog sustava. Iritabilni kolon, odnosno sindrom iritabilnog kolona ima mnogo dodirnih točaka s UK, no niti uzrokuje čireve, niti upalu. Zapravo, iritabilni kolon je poremećaj koji zahvaća mišiće probavnog trakta, a ne sluznicu debelog crijeva. Laboratorijski nalazi krvi upućuju na upalu i/ili anemiju. Za dokazivanje okultnog krvarenja primjenjuju se testovi, a jedan od tih testova koristi se za otkrivanje karcinoma debelog crijeva i naziva se FOBT (test na okultno fekalno krvarenje) te se u posljednjih nekoliko godina rutinski koristi za *skrining* u programima za rano otkrivanje raka debelog crijeva u Republici Hrvatskoj. Također, u dijagnostici se koristi i kolonoskopija kojom se pregledava cijelo debelo crijeva te fleksibilna sigmoidoskopija koja omogućava pregled samo donjeg dijela debelog crijeva (22-24).

## 2.3. Epidemiologija ulceroznog kolitisa

Veća incidencija (9-20/100,000\* dobná starost) i prevalencija (156-291/100,000\*populacija) primijećena je u populacijama sjevernoeuropskog i sjevernoameričkog podrijetla, a značajno se povećala u zemljama razvijene industrije te u urbanim područjima. Kako je uočljiv porast incidencije i prevalencije u urbanim dijelovima zemlje, u usporedbi s ruralnim zemljopisnim područjima, nameće se premisa da je važno obratiti pažnju na okolišne okidače. Važniji čimbenici su također izloženost crijevnim bolestima, pretežno gastroenteritisima u djetinjstvu, a posebice prije temeljitog i pravilnog sazrijevanja imunskog sustava sluznica. Najupečatljiviji su pikovi bimodalne dobne raspodjele kod osoba dobne starosti 15-30 te od 50 do 70 godina život te oni najčešće

obolijevaju. Anamneza u obitelji, prvenstveno prvog reda krvnog srodstva (5,7-15,5%) te aškenaskog židovskog podrijetla (3-5x) apeliraju povećan rizik za razvitak ulceroznog kolitisa. Zanimljivo je da kod osoba koje su u prošlosti oboljele od različitih bakterijskih gastroenteritisa, najčešće alimentarnom infekcijom, imaju dvostruko veći rizik od razvoja UK kao postinfekcije. Od bakterija koje su najčešće odgovorne za takve infekcije pronađeni su dokazi infekcija *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. i ostalih bakterija najčešćih uzročnika gastroenteritisa u razvijem zemljama. Osim toga, osobe koje su u prošlosti prakticirale aktivno pušenje cigareta, značajno prednjače u riziku obolijevanja od UK (20).

#### 2.4. Terapija ulceroznog kolitisa

Iako ne postoji konkretna terapija, postoje lijekovi uz pomoć kojih se bolest stavlja pod nadzor i kontrolu. Jedan od njih je 5-aminosalicilat koji se upotrebljava za blagu do umjerenu bolest, dok se kortikosteroidi primjenjuju kod bolesnika sa srednje, umjerenim do teškim UK. Osim toga, pacijentima koji boluju od težeg oblika, ponekad je potrebna i biološka terapija. Pacijenti koji boluju od proktitisa liječe se isključivo lokalnim lijekovima. Redoviti nadzor i odaziv na terapije preporuča se osobama s kolorektalnim karcinomom od 8 do 10 godina nakon pojave prvih simptoma te nadzor svake druge godine. Nažalost, kod pacijenata s teškom formom bolesti, operativna terapija je neizbježna. Ukoliko se simptomi ponavljaju i nisu blagi do umjereni, već teški, a pacijent je postao otporan na liječenje alternativnim terapeutima, operacija je neizostavna i potrebna postotku od 20-30% pacijenata. Operativni zahvat nužan je u slučajevima displazije ili kolorektalnog karcinoma. Osim kod megakolona, karcinoma i ostalih prijetućih stanja, kirurška intervencija je poželjna kod totalne kolektomije s ilealnom vrećicom, odnosno analne anastomoze (21).



### 3. Apoptoza

Riječ apoptoza grčkog je korijena, a nosi značenje otpadanja lišća (grč. *apo*-od, *ptosis*-opadanje, „otpadanje lišća“), što se u prenesenom značenju odnosi na odumiranje dotrajalih, odnosno isušenih dijelova organizma. U svim razvojnim procesima stanice, tkiva i organa apoptoza je jedan od glavnih regulatornih mehanizama (13).

Kroz povijest čovjek je kao višestanični organizam bio primoran razviti protektivne mehanizme od toksičnih djelovanja iz okoline. Programirana stanična smrt, tzv. apoptoza upravo je jedan od mehanizama prevencije te eliminiranja štete za organizam. Apoptozom stanica, uz utrošak energije i sintezu pojedinih proteina, pokreće vlastitu smrt kao odgovor na potencijalno patološko ili po život opasno stanje. Ukoliko je mehanizam apoptoze poremećen, lakše dolazi do razvoja mnogobrojnih bolesti. Naime, ako je neka stanica, oštećena ili producira toksične spojeve, u normalnim okolnostima, doći će do aktivacije apoptoze. Pravilan tijek apoptotskih procesa značajan je za pravilan embrionalni razvoj te za regulaciju homeostaze svih stanica, tkiva i organa.

Ključnu ulogu u pokretanju apoptoze čini enzimska skupina cisteinskih proteaza u citoplazmi stanica. Nadalje, kaskadna aktivacija cisteinskih proteaza ključni je dio u genezi biokemijskih apoptotskih i morfoloških promjena. Danas je poznat veliki broj unutarnjih i vanjskih faktora koji dovode do apoptoze. Na mnogobrojnim pokusnim modelima pokazano je i potvrđeno da je apoptoza temeljni proces u održavanju funkcionalne sposobnosti pojedinih organa.

Dva su glavna uzroka pokretanja apoptoze. Apoptoza se može aktivirati zbog izostanka pozitivnih signala potrebnih za preživljavanje stanica ili zbog primanja negativnih signala. Pozitivni signali su potrebni stanicama za diobu, za sintezu biokemijskih spojeva, faktora rasta neurona, IL-2, citokina, spolnih hormoni, itd. Jednom kad stanica počne primati negativne signale, ako je sve ispravno, kreće u apoptozu. Negativne signale nazivamo apogenim. DNA stanice se može oštetiti na različite načine, npr. ionizirajuće zračenje, lijekovi, mikotoksini, kemoterapeutici, a neki od njih mogu i direktno pokrenuti apoptozu. Također, osim svih nabrojanih mogućih uzroka apoptoze, neizostavni su i ROS koji mogu aktivirati apoptozu djelujući na promjenu permeabiliteta membrane mitohondrija i otpuštanje citokroma c. Osim svih nabrojanih negativnih signala, neizostavni su i tzv. proteini smrti kao što su ligandi TNF $\alpha$  i Fas. Ligandi su molekule od velikog značaja za apoptozu. Vežu se na komplementarne receptore stanica te ih smatramo pokretačima stanične smrti. Neki od najpoznatijih liganada su limfotoksin, TRAIL (engl. *TNF-related apoptosis inducing ligand*). Također, CD95 ligand na površini citotoksičnih T-limfocita ima dvije važne funkcije. Naime, CD95, ili FasL se veže za

površinske stanične receptore Fas na mnogobrojnim stanicama u organizmu, a ponajviše kada su inficirane ili se nalaze u neposrednoj blizini inficiranih stanica. Vezanjem na stanične receptore, pokreće se vanjski put aktivacije apoptoze te na taj način igra bitnu ulogu u zaštiti organizma. Također, osim što pokreću vanjski put apoptoze, sudjeluju u uklanjanju aktiviranih T limfocita potkraj imunološkog odgovora. Nadalje, čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) proizvode limfociti T i aktivirani makrofazi te je njihova prisutnost i aktivacija odgovor na upalu. Oni se vežu na proteinske stanične receptore imena TNFR1 (engl. *Tumor Necrosis Factor Receptor 1*). Nakon prepoznavanja inficiranih stanica, makrofazi otpuštaju TNF- $\alpha$  i tako pokreću apoptozu inficiranih stanica, ali i susjednih, neinficiranih. Sve je popularnije liječenje različitih bolesti manipulacijom nad mehanizmima i staničnim aparatima apoptoze. Razlikuju se vanjski i unutarnji put apoptoze. Vanjski put uključuje receptore smrti, odnosno ciljani učinak enzima citotoksičnih limfocita T, poput primjerice perforina, granzima B. S druge strane, postoji i unutarnji put apoptoze koji se još naziva i mitohondrijskim putem.

Neovisno o načinu pokretanja, najbitniji enzimi u cijelom ciklusu zbivanja su kaspaze koje cijepaju određene supstrate te na taj način biokemijski mijenjaju supstrat. Kaspaze se nalaze u citoplazmi stanice te su inače prisutne kao proenzimi i aktiviraju se kaskadnim proteolitičkim cijepanjem, dok redosljed aktivacije kaspaza isključivo ovisi o putu pokretanja stanične smrti.

### 3.1. Vanjski put apoptoze

Porodica TNF-receptora je obitelj transmembranskih proteina. U citoplazmatskom dijelu receptora nalaze se domene smrti. Nadalje, vezanje FasL na Fas receptor rezultira unutarstaničnim grozdolikim nakupljanjem domena smrti receptora. Dakako, u cijelom procesu potrebne su i adapterske molekule, tzv. FADD (engl. *Fas Associated Death Domain*) koje u krajnosti uz svoje receptorske dijelove aktiviraju putove koji aktiviraju prokaspazu 8. Prokaspaza 8 se tada cijepa i prelazi u aktivni oblik koji može pokrenuti kaskadu kaspaza i u konačnici smrt stanice apoptozom. Nadalje, TRAIL, osim što je ligand, on je i jedan od pokretača smrti. TRAIL se veže se na DR4 i DR5-receptore koji imaju domene smrti. Citotoksični limfociti T i NK-stanice, nakon detekcije inficiranih stanica, vežu se za njih te uz perforin razgrade staničnu membranu. Razgradnja stanične membrane omogućuje ulaz enzimu granzimu B koji je serin esteraza koja pak direktno aktivira kaspaze 3, 7, 8 i 10 i tako pokreće staničnu smrt.

### 3.2. Unutarnji put pokretanja apoptoze

Ponekad je nepovratno oštećenje DNA jedini uzrok pokretanja smrti stanice, a tada je najvažniji protein p53, prisutan i u neoštećenim stanicama, ali u neaktivnom obliku. Krajnja sposobnost p53 da zaustavi proliferaciju stanica i daljnji rast stanice bitno je tumor supresijsko svojstvo istog proteina. Veliki broj karcinoma posjeduju p53, ali je njegov gen u tumorskim stanicama mutiran i nefunkcionalan, dakle ne dolazi do ispravne sinteze p53 proteina. Značajno oštećena DNA potiče transkripciju p53, ali i nakupljanje p53 u stanici. Uz to, dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa u fazi G1. Kada se jednom zaustavi daljnji stanični razvoj, određeni proteini zaduženi za popravak oštećene DNA, ispravljaju pogreške kodiranja, odnosno oštećenja uzrokovana zračenjem, kemikalijama, ili lijekovima. Ukoliko su neka oštećenja nepopravljiva, proteini ih ne mogu popraviti i tada signaliziraju stanici da pokrene apoptozu. Različita vrsta oštećenja uzrokuju signalizaciju za ulazak u apoptozu različitog intenziteta. Tako su primjerice, ROS snažni aktivatori oštećenja mitohondrija, a tim putem i apoptoze. Kada su stanice u organizmu izložene povećanom stresu, kemoterapiji, bez dovoljnog vremena za popravak svih oštećenja, p53 postaje pokretač apoptoze zdravih i normalnih stanica, a posebice osjetljivijih tkiva (najviše stanice gastrointestinalnog trakta, imunosnog i hematopoetskog sustava te stanice kože). Sva ta dodatna i nepoželjna oštećenja dolaze kao nuspojava protutumorskih terapija (13). Nefunkcionalnost fizioloških puteva apoptoze može inducirati proliferaciju zloćudnih stanica, a korigiranje takvih nepoželjnih efekata može proizvoljno potaknuti apoptozu u stanicama karcinoma (14).

## 4. Identifikacija proteina - Western Blot

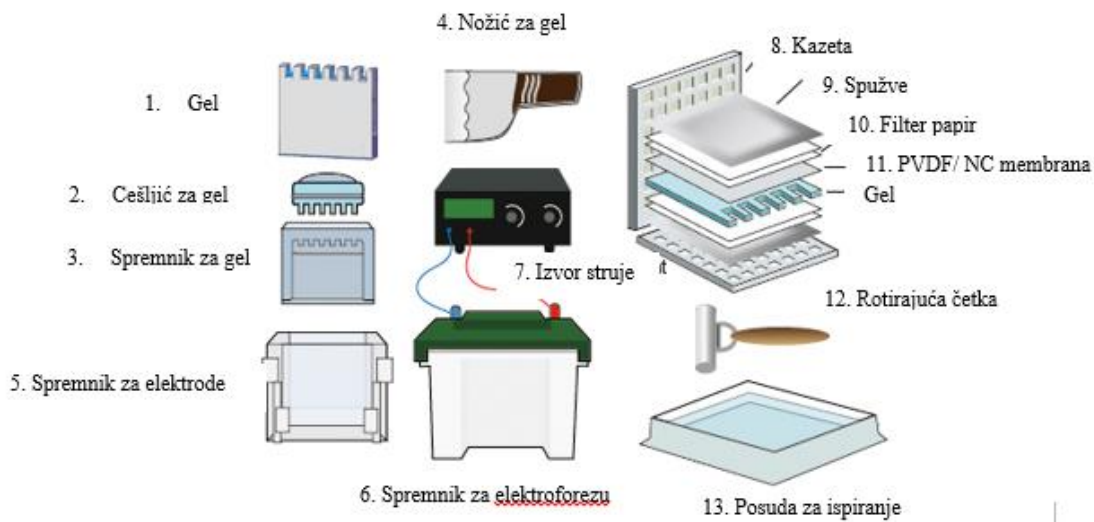
Za precizno dijagnosticiranje i praćenje patoloških procesa, neophodno je proučavati proteine, a osobito njihove aktivne, često fosforilirane ili ponekad i neaktivne oblike. Proteini u stanicama imaju mnogobrojne funkcije, stoga su u stanicama prisutni kao gradivni element, mogu imati enzimatsku aktivnost, grade protutijela, receptore, ali i mnoge druge stanične komponente.

Blotovi su metode koje se prvenstveno koriste u molekularnim metodama analize uzoraka te se razlikuju Southern blot koja služi za analizu DNA, Northern blot kojom analiziramo RNA molekule te Western blot koja služi za proučavanje proteina. Western blot metodom određuje se prvenstveno vrsta, ali i količina proteina. Metoda počiva na razdvajanju proteina na poliakrilamidnom gelu, zatim prijenosu proteina s gela na membranu i detekciji proteina pomoću protutijela specifičnog za pojedini protein.

Prvo je potrebno izolirati proteine iz stanice, za što su nužni detergentski agensi. Detergentski agensi razaraju staničnu membranu, ali i membrane staničnih organela. Osim detergenata, neophodni su i inhibitori proteaza i fosfataza koji preveniraju razgradnju proteina i uklanjanje fosfatnih skupina. Od velike je važnosti uvidjeti fosforilirani oblik proteina jer upravo fosfatne skupine određuju aktivno, odnosno inaktivno stanje proteina. Različiti protein, ili pak isti protein na različitom mjestu u organizmu može se fosforilacijom aktivirati ili inaktivirati. Nakon izolacije proteina mjeri se njihova koncentracija. Konačno, slijedi elektroforeza proteina, najčešće SDS-PAGE, koja je jednodimenzionalna elektroforeza proteina u denaturirajućim uvjetima. Smjesa proteina se izlaže električnom polju u jednom smjeru uz detergent. Proteini migriraju kroz pore matriksa gela te tako putujući od katode prema anodi razdvajaju se prema veličini u prisutnosti negativno nabijenog detergentskog agensa. Razdvajanje proteina u denaturirajućim uvjetima ovisi će prvenstveno o gustoći poliakrilamidnog gela, a pritom je veličina pora recipročna gustoći gela, masi proteina i prisutnosti disulfidnih veza. Naime, disulfidne veze su kovalentne veze i one ostaju očuvane u denaturirajućim uvjetima, ali mogu se ukloniti merkaptometanolom. Gel za jednodimenzionalnu elektroforezu proteina sačinjen je od gela za koncentriranje (gornji gel) i gela za razdvajanje (donji gel). Uzorak proteina prvo ulazi u gel za koncentriranje na čijoj se kraćoj dužini proteini koncentriraju u usku putujuću frontu. U gelu za razdvajanje, koji je zapravo većinski gel za SDS-PAGE elektroforezu proteina, proteini se razdvajaju prema svojoj veličini. Nakon završene elektroforeze, proteini se prenose na pozitivno nabijenu membranu pod utjecajem električnog polja. Prijenos proteina na membranu je neizbježan za sljedeće

spajanje proteina sa odgovarajućom smjesom protutijela, što ne bi bilo moguće s poliakrilamidnim gelom.

Razdvojene i obilježene proteine, potrebno je detektirati i na kraju analizirati. Proteini razdvojeni na poliakrilamidnom gelu i preneseni na membranu detektiraju se pomoću protutijela specifičnih za pojedini protein. Membrana se prvo inkubira s primarnim protutijelom koje prepoznaje ciljani protein. Potom slijedi ispiranje membrane te inkubacija sa sekundarnim protutijelom na koje je vezan enzim HRP (engl. *Horse Radish Peroxidase*). Enzim HRP oksidira supstrat pri čemu je oslobođeno svjetlo (kemiluminiscencija) koje se uočava na filmu prislonjenom uz membranu.



**Slika 4.** Oprema potrebna za provedbu Western blot metode

## 5. Cilj istraživanja

Dosadašnja istraživanja su pokazala značajan učinak luteolina u liječenju različitih akutnih, a posebno kroničnih bolesti te malignih procesa. Molekularni mehanizam djelovanja ovog fenolnog spoja u upalnom procesu nije u potpunosti istražen. Obzirom na dosadašnja saznanja postavili smo hipotezu da primjena luteolina ublažava ili zaustavlja napredovanje upalnog procesa te utječe na stanične procese kao što su apoptoza i autofagija.

Stoga je cilj istraživanja bio na pokusnom modelu DSS kolitisa ispitati utjecaj luteolina na razvoj i intenzitet kolitisa te proces apoptoze.

Kako bismo testirali postavljenu hipotezu postavili smo sljedeće specifične ciljeve:

1. na lokalnoj i sistemske razini pratiti i usporediti razvoj i intenzitet kolitisa u miševa kod kojih je primjenom otopine DSS-a izazvan kolitis te u skupini miševa kod kojih je uz DSS primijenjen i luteolin.
2. odrediti utjecaj luteolina na histološke promjene tkiva debelog crijeva eksperimentalnih životinja s ulceroznim kolitisom
3. odrediti utjecaj luteolina na aktivaciju NF- $\kappa$ B te na izražaj biljega apoptoze i autofagije u tkivu debelog crijeva životinja s kolitisom.

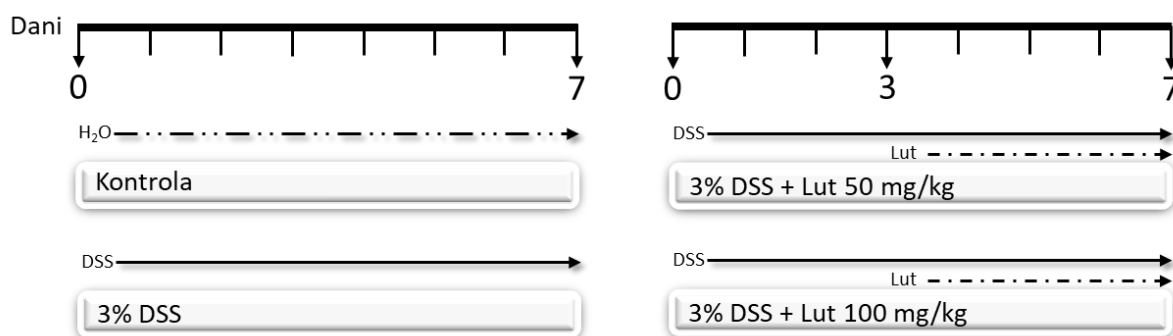
## 6. Materijali i metode

### 6.1. Protokol izazivanja kolitisa i primjena luteolina

U sklopu istraživanja mehanizma djelovanja luteolina tijekom razvoja kolitisa korišteni su mužjaci miševa soja C57BL/6 uzgojeni u uzgojnom centru za uzgoj i inženjering laboratorijskih miševa (LAMRI) Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Životinje su bile smještene u prostoriji s kontroliranim uvjetima temperature ( $20 \pm 1$  °C) i vlage ( $50 \pm 5\%$ ) te izmjenom ciklusa svjetla i mraka svakih 12 sati, a tijekom uzgoja su imale slobodan pristup standardnoj hrani za glodavce (MK, Complete Diet for Laboratory Rats and Mice, Slovenija) i vodi *ad libitum*.

Primjenom 3% vodene otopine natrijevog dekstran sulfata (DSS, Dextrane sulfate sodium salt colitis grade, MW 36000 – 50000 Da; Cat. No. 160110, MP Biomedicals, Solon, OH, SAD) *per os* tijekom sedam dana izazvan je pokusni model ulceroznog kolitisa.

Luteolin (sc-203119C, ChemCruz Biochemicals, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, SAD) je otopljen u dimetil sulfoksidu (DMSO, engl. *dimethyl sulfoxide*) (41640, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka), pri čemu koncentracija DMSO nije bila veća od 5%. Za sva daljnja razrjeđenja luteolina koristio se fosfatni pufer (0,01 M, pH 7,4). Luteolin je primijenjen u dvije doze, 50 mg/kg i 100 mg/kg. Kako bi se ispitalo terapijsko djelovanje luteolin se primijenio u navedenim dozama od trećeg do sedmog dana pokusnog perioda, *per os*, jednom dnevno (Slika 5.).



**Slika 5.** Plan pokusa

Eksperimentalne životinje su podijeljene u četiri skupine: a) DSS skupina: primjena DSS kroz sedam dana b) DSS + 50 mg/kg LUT: životinje tretirane s luteolinom c) DSS + 100 mg/kg LUT: životinje tretirane s luteolinom u dozi od 100 mg/kg d) kontrolna skupina. Tijekom pokusnog perioda kontrolna skupina životinja konzumirale su tekuću vodu *ad libitum*.

## 6.2. Klinička prezentacija ulceroznog kolitisa

Klinička prezentacija bolesti pratila se uz pomoć indeksa aktivnosti bolesti (engl. *disease activity index*, DAI). U cilju određivanja DAI pratio se gubitak tjelesne mase, pojava rektalnog krvarenja, promjena konzistencije stolice. Prema prethodno definiranim kriterijima svaki od parametara je pojedinačno bodovan te je na kraju ukupni zbroj bodova podijeljen s tri.

## 6.3. Žrtvovanje životinja i uzimanje uzoraka

Nakon anesteziranja (i.p. injekcijom ketamina, 2,5 mg/miš) životinje su usmrćene cervikalnom dislokacijom. Nakon otvaranja trbušne šupljine, za analizu, izolirano je debelo crijevo od cekuma do antruma te mu je izmjerena dužina. Debelo crijevo svake životinje je zatim narezano na manje dijelove (~2 mm) pri čemu je dio tkiva izdvojen za uklapanje u parafin, a koji će se koristiti za histopatološku analizu. Ostatak tkiva debelog crijeva je izvagan na analitičkoj vagi (Mettler Toledo, Švicarska), zamrznut u tekućem dušiku i pohranjen na -80 °C, kako bi se provela izolacija proteina i analiza izražaja proteina Western blot metodom.

## 6.4. Izolacija proteina i priprema tkiva za analizu izražaja specifičnih proteina

Tkivo debelog crijeva je homogenizirano (IKA T25 basic, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Njemačka) u odgovarajućem volumenu radioimunoprecipitacijskom puferu za liziranje (engl. *radioimmunoprecipitation assay*, RIPA) uz dodatak inhibitora fosfataza (PhosphoSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Cat. No. 04906845001, Roche, Mannheim, Njemačka) i proteaza (RIPA Lysis buffer System, sc-24948, ChemCruz Biochemicals, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, SAD). Nakon homogeniziranja i inkubacije u RIPA puferu uzorci su centrifugirani (Rotina 420R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen,



Njemačka) 45 minuta na 14000 okretaja, a nakon centrifugiranja, odvojen je supernatant. U dobivenom supernatantu je određena koncentracija proteina metodom bicinkoninične kiseline (engl. *bicinchoninic acid*, BCA). Kvantifikacija je provedena kolorimetrijski mjerenjem apsorbancije na 562 nm valne duljine prema standardu koristeći upute proizvođača (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Prod # 23227, Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD). Vrijednost apsorbancije izravno je proporcionalna koncentraciji ukupnih proteina u uzorku tkiva koja je izračunata korištenjem jednadžbe kalibracijske krivulje standarda.

### 6.5. Priprema parafinskih preparata tkiva debelog crijeva i bojanje hematoksilin/eozinom

Nasumično su odabrana 2 do 3 unaprijed narezana manja dijela tkiva za dobivanje parafinskih rezova. Zatim su postavljena u plastične kazete za uklapanje tkiva (M490, Simport, Quebec, Kanada) te su potom fiksirana u 4%-tnoj otopini paraformaldehida (4% NB Formaldehyde, FNB4-5L, BioGnost d.o.o., Zagreb, Hrvatska) preko noći na temperaturi od 4°C. Tako fiksirana, isprana su vodom i premještena u histokinet (TP1020, Leica Biosystems) u kojem su dehidrirana nizom otopina etanola, ali rastućih koncentracija od 70% do 100% te su konačno pročišćena kiselinom. Tkivo je potom uronjeno u parafin, prethodno zagrijan na 50-60 °C. Obradeni parafinski blokovi korišteni su za rezanje pomoću mikrotoma (HM340 E, Leica Biosystems) na preparate debljine 4 mikrometra koji su zatim adherirani na predmetna stakla (Adhezivna predmetna stakla za mikroskopiju, Vitrognost® plus ultra, Ref: 103001A72, BioGnost d.o.o., Zagreb, Hrvatska). Parafinski preparati tkiva kolona upotrijebljeni su za histopatološku analizu tkiva debelog crijeva hematoksilin/eozin bojanjem i analizu ekspresije te lokalizacije pojedinih proteina u stanici metodom imunohistokemijskog bojanja. Naime, parafinski preparati tkiva najprije su deparafinizirani uranjanjem u ksilen (Bioclear Xylene for histology, BC-1L, BioGnost d.o.o., Zagreb, Hrvatska) u vremenskim periodima od tri puta po osam minuta te su potom rehidrirani uranjanjem u niz otopina etanola (Histanol 100 (100% denaturated ethyl alcohol solution for use in histology, H-100-10L, BioGnost d.o.o., Zagreb, Hrvatska) padajućih koncentracija (100%-tni etanol (2 puta po 4 minute, 90%-tni etanol i to jedanput kroz 4 minute, zatim 70%-tni etanol također 1 puta po 4 minute te 50%-tni alkohol 1 puta kroz 4 minute)). Zatim su preparati isprani destiliranom vodom kroz 4 minute, obojeni hematoksilinom uranjanjem u otopinu hematoksilina te jednom minutnom inkubacijom. Isprani preparati, pod mlazom tekuće vode u trajanju od 15 minuta, na 2 sekunde uronjeni su u otopinu za diferencijaciju koja sadrži smjesu 70%-tnog etanola u količini od 100 mL i klorovodične

kiseline u količini od pola mililitra. Nadalje, preparati su ispirani pod mlazom tekuće vode u vremenu od 10 minuta, a potom su isprani uranjanjem u destiliranu vodu u trajanju od 3 minute. Uranjanjem u otopinu eozina i jednominutnom inkubacijom, preparati su obojeni eozinom, a zatim su isprani uranjanjem u destiliranu vodu u trajanju od 5 minuta kroz 3 izmjene destilirane vode. Uslijedilo je dehidriranje obojanih preparata uranjanjem u niz otopina etanola rastućih koncentracija, a nakon sušenja na sobnoj temperaturi, preparati su uklopljeni korištenjem BioMount medija koji služi za uklapanje (BioMount DPX, BM- 100, Biognost, Zagreb, Hrvatska) s ciljem dobivanja trajnih histoloških preparata. Konačno, obojeni preparati su analizirani i snimljeni pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus BX51 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) koji je opremljen kamerom Olympus DP70 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) te uz korištenje računalog programa Olympus DPController (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Mikroskopskom analizom oštećenja tkiva debelog crijeva i određivanjem mikroskopskog indeksa oštećenja, koje je provedeno nakon bojanja tkiva hematoksilinom i eozinom, vrednovano je pet parametara; težina upale (bez upale- 0 bodova, blaga upala- 1 bod, umjerena upala- 2 boda, jaka upala- 3 boda), na sličan način vrednovali su se i stupanj infiltracije upalnih stanica (bez infiltracije upalnih stanica- 0 bodova, infiltracija upalnih stanica u mukozu- 1 bod, infiltracije upalnih stanica u mukozu i submukozu- 2 boda, transmuralna infiltracija- 3 boda), oštećenje epitela (bez oštećenja -0 bodova, distorzija kripti- 1 bod, erozija- 2 boda, ulceracija- 3 boda), opseg lezije (bez lezije- 0 bodova, točkaste lezije- 1 bod, multifokalne lezije- 2 boda, difuzne lezije- 3 boda) te edem (bez edema- 0 bodova, blagi edem u mukozu- 1 bod, edem u mukozu i submukozu- 2 boda, edem u cijelom zidu crijeva- 3 boda). Ukupni zbroj bodova dodijeljen svakom parametru dao je ukupni rezultat mikroskopskog indeksa oštećenja tkiva i to po svakom uzorku:

**MIKROSKOPSKI INDEKS OŠTEĆENJA = težina upale + infiltracija upalnih stanica + oštećenje epitela + opseg lezije + edem**

Mikroskopski indeks oštećenja određen je za svaku životinju ocjenjivanjem od 2 do 3 uzorka tkiva, a potom je izračunata srednja vrijednost. Nadalje, zbroj vrijednosti mikroskopskog indeksa oštećenja svih životinja iz iste eksperimentalne skupine podijeljen je s ukupnim brojem životinja iz te skupine s ciljem određivanja srednje vrijednosti mikroskopskog indeksa oštećenja, a kojim je ocjenjeno mikroskopsko oštećenje tkiva debelog crijeva za svaku pokusnu grupu miševa.

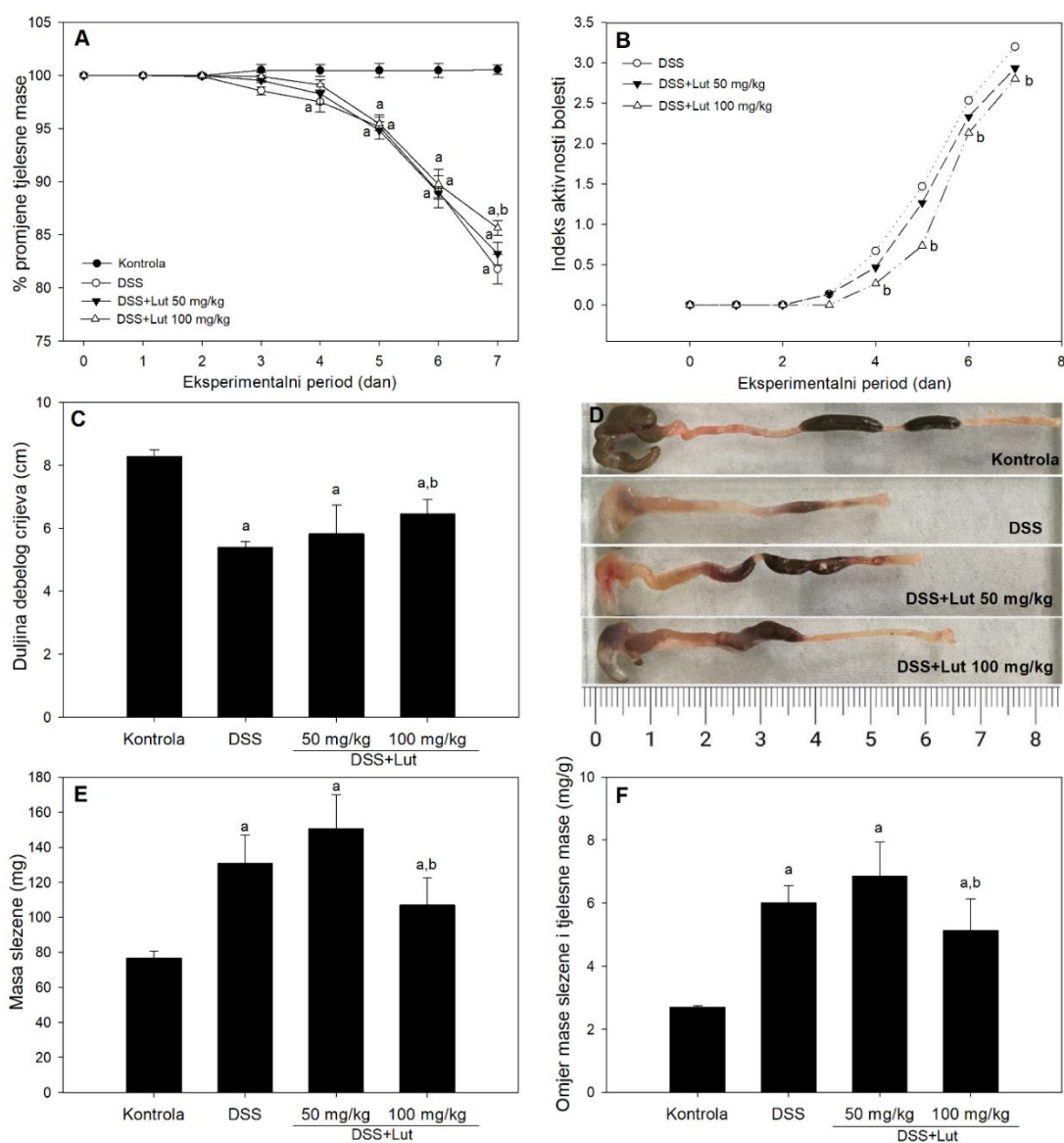
## 6.6. Imunohistokemijsko bojanje preparata

Za analizu ekspresije transkripcijskog faktora, NF- $\kappa$ B upotrijebljena je imunohistokemijska analiza. Parafinski preparati tkiva debelog crijeva su deparafinizirani u ksilenu tri puta po osam minuta i rehidrirani kroz niz otopina padajućih koncentracija. Nakon ispiranja u destiliranoj vodi kroz jednu minutu, preparati su uronjeni u 10 mM citratni pufer, pH 6,0 i zagrijani u vremenu od 20 minuta u mikrovalnoj pećnici (Electrolux, Krakow, Poljska) na 700 W. Upotrijebljeni je citratni pufer s ciljem razotkrivanja antigena koji su skriveni tijekom fiksacije tkiva i uklapanja u parafin. Nakon obrade kuhanjem preparati su ohlađeni kroz 20 do 30 minuta na sobnoj temperaturi te su isprani tekućom vodom kroz 10 minuta i destiliranom vodom kroz 5 minuta. U daljnjem postupku preparati su inkubirani u 0,5%-tnoj otopini vodikovog peroksida (Vodikov peroksid, 30%-tna otopina, P154917, Gram- Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska) u metanolu (histanol M, HM, BioGnost, d.o.o., Zgareb, Hrvatska) (v/v) u trajanju od pola sata kako bi se što efikasnije uklonila aktivnost tkivnih endogenih peroksidaza. Nadalje, preparati su isprani u PBS-u (pH 7,4) kroz pet minuta, tri puta na tresilici (Heidolph Unimax 1010, Heidolph Instrumensts, Schwabach, Njemačka) te su zatim inkubirani kroz 1 sat pri sobnoj temperaturi 5%-tnom otopinom albumina iz goveđeg seruma (BSA, engl. *bovine serum albumin*) (Albumin, bovine fraction V (Approx. 99%), A-30059, Sigma- Aldrich, Steinheim, Njemačka) otopljenog u PBS-u (BSA/PBS), kako bi se uklonilo nespecifično vezanje protutijela. Zatim su preparati inkubirani primarnim protutijelom specifičnim za NF- $\kappa$ B p65 podjedinicu (ab7970, Abcam, Cambridge, UK) razrijeđeni 1:1000 u vlažnoj komori kroz noć na temperaturi od 4°C. Preparati su isprani PBS-om u tri navrata kroz pet minuta, nakon inkubacije primarnim protutijelima, a zatim su inkubirani sekundarnim protutijelom koje je dostupno u komercijalnom kitu (Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse kit, Dako Denmark A7S, Glostrup, Danska) 45 minuta na sobnoj temperaturi. Nadalje, uslijedilo je ispiranje u PBS-u kroz 5 minuta po tri puta te inkubacija sa svježe spremljenim 3,3'- diaminobenzidin tetraklorid (DAB, engl. *3,3'-diaminobenzine tetrahydrochloridae*), a taj supstrat je pripremljen miješanjem DAB kromogena i otopine pufera u kojoj je sadržan vodikov peroksid u omjeru 1:50 (Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse kit, Dako Denmark A7S, Glostrup, Danska). Uz peroksidazu, DAB stvara smeđi talog na mjestu na kojem je ciljani antigen prepoznat od strane primarnog protutijela. Inkubacija DAB supstrata i preparata trajala je jednu minutu, a preparati su potom isprani destiliranom vodom kroz 5 minuta po 3 puta te su zatim uronjeni u otopinu hematoksilina kroz pola minute na sobnoj temperaturi kako bi se

postiglo obojenje stanične jezgre. Nakon bojanja, kroz niz otopina etanola rastućih koncentracija (50%-tni etanol (1 puta po 3 minute), 75%-tni etanol (1 puta po tri minute), 96%-tni etanol (1 puta po 3 minute), 100%-tni etanol (1 puta po tri minute) ), preparati su uspješno dehidrirani te potom pročišćeni ksilenom uranjanjem u otopinu ksilena u trajanju od 3 minute po dva puta te su konačno uklopljeni pomoću BioMount medija za uklapanje. Svakako, analizirani obojeni preparati, snimljeni su svjetlosnim mikroskopom Olympus BX51 opremljenim kamerom Olympus DP70 i računalnim programom Olympus DPController. Nakon imunohistokemijskog bojanja, učinjeno je kvantificiranje pozitivnih jezgri i to po svakom uzorku tkiva kolona, odnosno, pobrojane su i uzete u obzir stanice u kojima je NF- $\kappa$ B lokaliziran u jezgri u deset vidnih polja po svakoj pokusnoj životinji (od 2 do 3 uzorka) te je detektiran broj stranica s NF- $\kappa$ B lokaliziranim u jezgri po vidnom polju i to za svaku životinju iz iste skupine te se odredila srednja vrijednost.

## 7. Rezultati

### 7.1. Utjecaj luteolina na kliničke simptome i aktivnost bolesti tijekom razvoja kolitisa



**Slika 6.** Utjecaj luteolina na kliničke simptome i aktivnost bolesti kod miševa s DSS-om izazvanim kolitisom. Promjene u tjelesnoj masi miševa (A). Indeks aktivnosti bolesti prikazan je kao srednja vrijednost indeksa aktivnosti bolesti u sve tri skupine miševa tijekom pokusnog perioda (B). Duljina debelog crijeva miševa po eksperimentalnim skupinama sedmog dana pokusa (C). Reprerzentativne makroskopske slike debelog crijeva svake eksperimentalne skupine miševa (D). Promjene u masi slezene (E). Omjer mase slezene i tjelesne mase određen

sedmog dana pokusa (F). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. a:  $P < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu; b:  $P < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na DSS skupinu.

Promjena tjelesne mase u eksperimentalnom periodu prikazana je na slici 6A. Vidljivo je kako miševi iz kontrolne skupine imaju konstantnu masu budući da su tijekom eksperimentalnog perioda primali samo običnu vodu. S druge strane, miševi koji su primali isključivo DSS najviše su izgubili na tjelesnoj masi. Nadalje, kod miševa koji su primali DSS i luteolin u koncentraciji od 50 mg/kg ili 100 mg/kg vidljiv je gubitak u tjelesnoj masi, ali je značajno manji u odnosu na skupinu miševa koji su primali isključivo DSS otopinu. Pad mase je najznačajniji sedmog dana jer je tada bolest i najjačeg intenziteta.

Nadalje, slika 6B prikazuje povećanje indeksa aktivnosti bolesti kroz eksperimentalni period. Vidljiv je najznačajniji porast indeksa aktiviteta bolesti kod miševa koji su isključivo primali DSS, a on je najveći u akutnoj fazi bolesti, odnosno sedmog dana eksperimentalnog perioda. Miševi koji su primali DSS u kombinaciji s luteolinom od 50 mg/kg također bilježe porast indeksa aktiviteta bolesti, no on je manji, nego u miševa koji su primali isključivo DSS. Također, u skupini miševa koji su primali DSS i luteolin u dozi od 100 mg/kg statistički je značajan pad indeksa aktiviteta bolesti u usporedbi s miševima koji su primali samo DSS i onih koji su uz DSS primali i luteolin u dozi od 50 mg/kg.

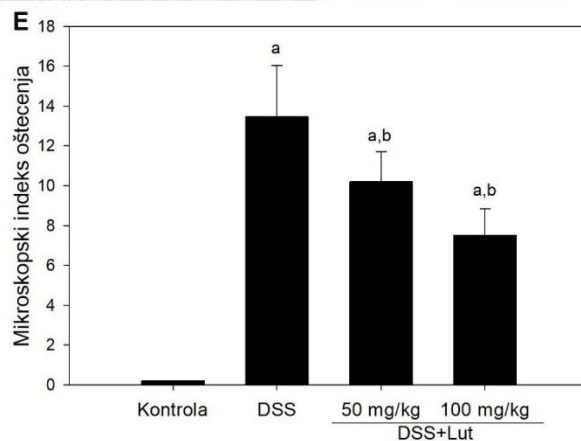
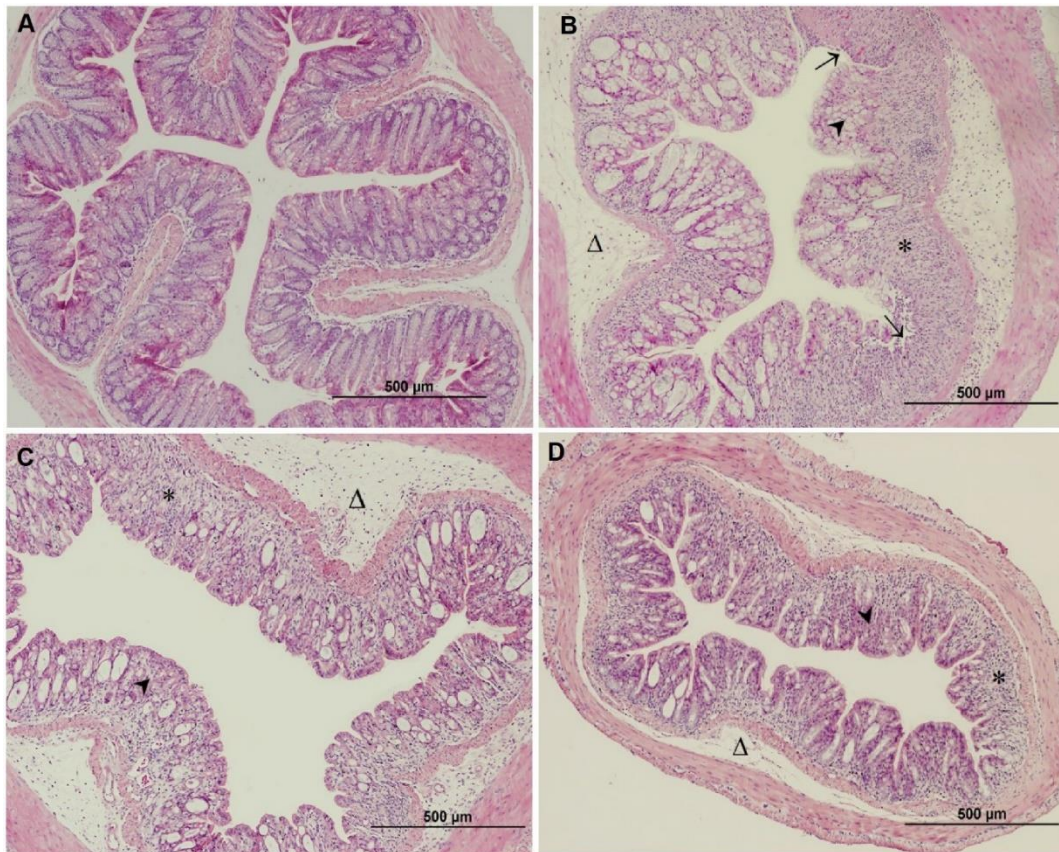
Promjena duljine debelog crijeva za sve eksperimentalne skupine prikazana je na slici 6C. Vidljivo je kako je tijekom razvoja kolitisa došlo do statistički značajnog skraćivanja debelog crijeva. Skraćivanje debelog crijeva zabilježeno je i u skupinama koje su osim DSS-a primale i luteolin u dozi od 50, odnosno 100 mg/kg. Međutim, u usporedbi sa skupinom miševa koji su primali samo DSS otopinu skraćivanje crijeva je manje izraženo posebno u skupini miševa koji su primali luteolin u dozi od 100 mg/kg. Makroskopski prikaz debelog crijeva potvrđuje rezultate te je prikazan na slici 6C komparativno za svaku skupinu.

Obzirom da je veličina slezene indirektni marker upalnog procesa, zabilježen je porast mase s razvojem bolesti (slika 6E). Ipak, kod skupine koja je primala veću koncentraciju luteolina (100 mg/kg) vidljivo je statistički značajno uvećanje u odnosu na kontrolnu skupinu, ali i statistički značajno smanjenje u usporedbi sa skupinama koje su primale DSS i skupinom koja je primala DSS sa luteolinom u koncentraciji od 50 mg/kg.

Slijedom navedenog, na slici 6F prikazan je omjer mase slezene i tjelesne mase miševa (mg/g). Omjer tjelesne mase i mase slezene je statistički značajno povećan kod skupine koja je primala samo DSS i u skupini koja je primala DSS u kombinaciji sa 50 mg/kg luteolina. Kod skupine koja je primala 100 mg/kg, taj je omjer statistički značajno veći, nego u kontrolnoj skupini, ali je i statistički značajno manji u odnosu na skupinu koja je primala DSS, odnosno skupinu miševa koji su primali DSS sa 50 mg/kg luteolina.

## 7.2. Primjena luteolina smanjuje intenzitet histopatoloških promjena tkiva debelog crijeva miševa tijekom razvoja kolitisa

Na slici 7A prikazana je zdrava sluznica debelog crijeva. Nadalje, slika 7B prikazuje promjene sluznice debelog crijeva miševa koji su primali samo DSS otopinu. Vidljivo je da je došlo do narušavanja arhitekture sluznice, razvoja edema te nakupljanja upalnih stanica uz zadebljanje *lamine propriae*. Slične promjene zabilježene su i u skupini miševa kod koji su primali luteolin u dozi od 50, odnosno 100 mg/kg. Intenzitet promjena na razini sluznice najintenzivniji je u skupini miševa koji su primali isključivo DSS. Intenzitet promjena potvrđen je izračunom mikroskopskog indeksa oštećenja (slika 7E), a temeljem grafičkog prikaza vidljivo je da je intenzitet promjena smanjen s primjenom luteolina u odnosu na skupinu miševa koji su primali samo DSS otopinu, a kako je prethodno navedeno.

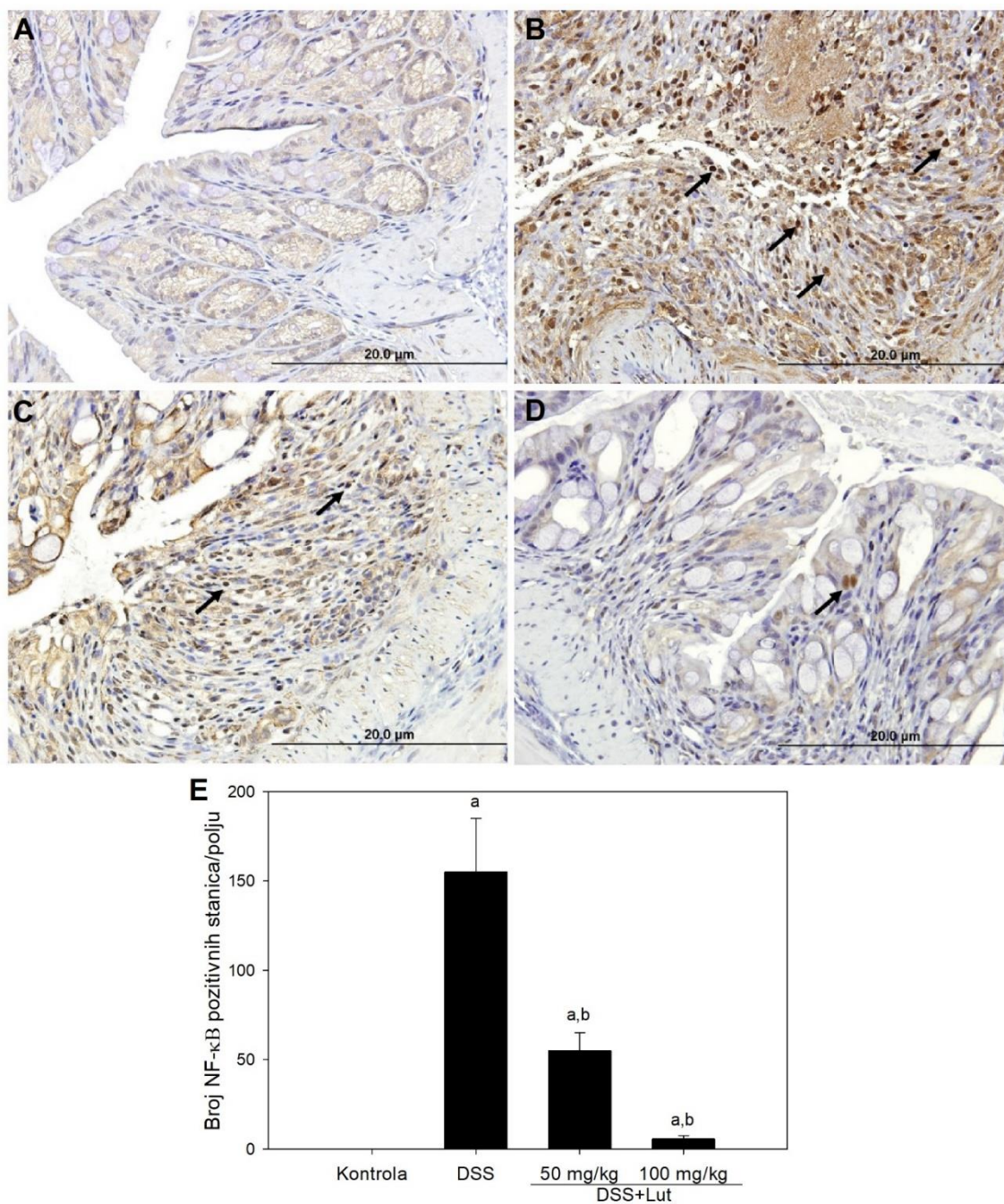


**Slika 7.** Utjecaj luteolina na intenzitet histopatoloških promjena tkiva debelog crijeva miševa s DSS-om izazvanim kolitisom. Reprezentativne slike tkiva debelog crijeva miševa kontrolne (A), DSS (B), DSS+Lut 50 mg/kg (C) i DSS+Lut 100 mg/kg (D) skupine. Povećanje 100x. ► označava područje deplecije vrčastih stanica, distorzije arhitekture kripti i oštećenja mukoze; \*označava područje infiltracije upalnih stanica; → označava područje krvarenja; Δ označava područje submukoznog edema. Mikroskopski indeks oštećenja tkiva debelog crijeva po eksperimentalnim skupinama (E). Rezultati mikroskopskog indeksa oštećenja su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. a:  $P < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu; b:  $P < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na DSS skupinu.



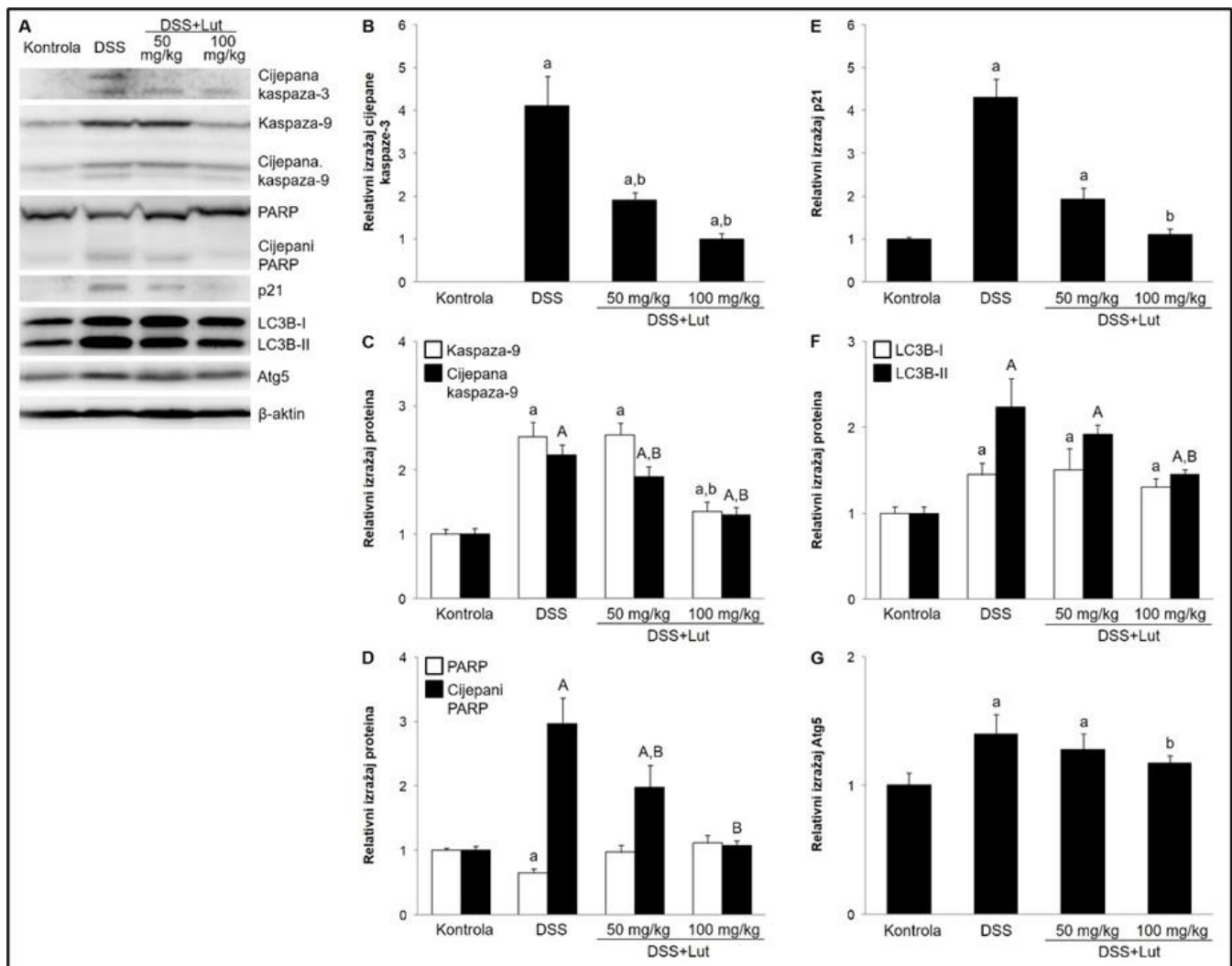
### 7.3. Luteolin smanjuje izražaj transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B, u tkivu debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa

Promjena broja NF- $\kappa$ B p65 pozitivnih stanica u odnosu na kontrolnu skupinu miševa najizraženija je u sluznici debelog crijeva miševa koji su primali isključivo DSS otopinu (slika 8B). Naime, utvrđeno povećanje u broju NF- $\kappa$ B p65 pozitivnih stanica statistički je značajno uvećano u odnosu na kontrolnu skupinu. Uz to, uočljivo je i statistički značajno povećanje broja stanica s NF- $\kappa$ B p65 proteinom lokaliziranim u jezgri, tj. DSS je uzrokovao translokaciju NF- $\kappa$ B iz citoplazme u jezgri, a što je preduvjet aktivacije NF- $\kappa$ B i poticanja upalnog procesa. Nadalje, broj NF- $\kappa$ B p65 pozitivnih stanica uvećan je kod skupine miševa koja je uz DSS primala i luteolin u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu, ali je statistički značajno smanjen u usporedbi sa skupinom koja je primala isključivo DSS. U skupini miševa koja je primala 100 mg/kg luteolina i DSS zabilježen je statistički značajan pad broja NF- $\kappa$ B p65 pozitivnih stanica u usporedbi sa skupinama koje su primale samo DSS, odnosno DSS i luteolin u dozi od 50 mg/kg (slika 8D i 8E).



**Slika 8.** Utjecaj luteolina na izražaj i lokalizaciju NF-κB p65 proteina u debelom crijevu miševa s DSS-om izazvanim kolitisom. Reprezentativne slike imunohistokemijskog bojenja tkiva debelog crijeva miševa kontrolne (A), DSS (B), DSS+Lut 50 mg/kg (C) i DSS+Lut 100 mg/kg (D) skupine. Povećanje 400x. → označava imunopozitivne jezgre. Broj NF-κB p65 pozitivnih jezgri po vidnom polju (E). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. a:  $P < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu; b:  $P < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na DSS skupinu.

## 7.4. Luteolin inhibira apoptozu u tkivu debelog crijeva miševa tijekom razvoja kolitisa



**Slika 9.** Utjecaj luteolina na izražaj proteina koji reguliraju proces apoptoze i autofagije u debelom crijevu miševa s DSS-om izazvanim kolitismom. Reprezentativni imunoblottovi izražaja proteina u kontrolnoj, DSS, DSS+Lut 50 mg/kg i DSS+Lut 100 mg/kg skupini (A). Relativni izražaj proteina cijepana kaspaza-3 (B), kaspaza-9 i cijepana kaspaza-9 (C), PARP i cijepani PARP (D), p21 (E), LC2B-I/II (F) i Atg5 (G) u tkivu debelog crijeva. Gustoća proteinskih vrpca je normalizirana prema β-aktinu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. a, A:  $P < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu; b, B:  $P < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na DSS skupinu.

Slika 9B prikazuje relativni izražaj markera apoptoze. Relativna ekspresija cijepane kaspaze-3 je povećana u skupinama miševa kod kojih je došlo do razvoja bolesti, a u navedenim skupinama porast je statistički značajan. Nadalje, iako je u miševa koji su primali uz DSS i 50 odnosno 100 mg/kg luteolina uočen pojačan izražaj u odnosu na kontrolnu skupinu, njihove vrijednosti su statistički značajno niže u odnosu na skupinu koja je primala samo DSS otopinu.

Skupina koja je primala samo DSS ima povećan relativni izražaj obiju kaspaza-9, cijepane i necijepane, u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, sličan obrazac ponašanja je zabilježen i kod miševa koji su uz DSS primali i luteolin. Uočljivo je da skupina miševa koja je primala DSS u kombinaciji s 50 mg/kg luteolina ima smanjen relativni izražaj cijepane kaspaze-9 u odnosu na skupinu koja nije primala luteolin. Nadalje, skupina koja je primala DSS i luteolin u dozi od 100 mg/kg ima smanjen relativni izražaj obiju kaspaza u usporedbi s grupom koja je primala nižu koncentraciju luteolina, i samo DSS.

Relativni izražaj proteina PARP-a i cijepanog PARP-a prikazan je na slici 9D. Skupina miševa koja je primala isključivo DSS ima statistički značajno povišen izražaj cijepanog PARP proteina, dok skupina koja je primala DSS i 50 mg/kg luteolina također ima statistički značajno povišeni cijepani PARP, ali je on statistički značajno niži, nego kod skupine miševa koji su primali samo DSS otopinu. S druge strane, PARP i cijepani PARP kod skupine koja je primala 100 mg/kg luteolina i DSS je statistički značajno manji, nego kod skupine koja je primala samo DSS i kod skupine miševa koja je primala DSS s 50 mg/kg luteolina. Zanimljivo, izražaj PARP proteina u skupini miševa koja je primala luteolin u dozi od 100 mg/kg gotovo je dosegao vrijednosti koje su zabilježene u kontrolnoj skupini.

Relativni izražaj p21 povećan je kod miševa koji su primali DSS bez luteolina, ali također i u skupinama koje su uz DSS primale luteolin (slika 9E). Primjena luteolina smanjuje izražaj p21, a smanjenje je najizraženije, odnosno statistički značajno u skupini koja je primala luteolin u dozi od 100 mg/kg.

LC3B-I i LC3B-II povećani su statistički značajno u svim ispitivanim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu (slika 9F). Osobito je istaknut porast LC3B-II kod miševa koji su primali samo DSS. Važno je napomenuti da je statistički značajan pad izražaja LC3B-I i LC3B-II u odnosu na skupinu u kojoj su miševi primali samo DSS, zabilježen u skupini kod koje je DSS kombiniran sa 100 mg/kg luteolina.

Nadalje, na slici 9G zabilježena je promjena relativnog izražaja Atg5, koji je statistički značajno povećan u skupini koja je primala DSS bez luteolina, a također je povećan u skupinama koje su

uz DSS primale 50 i 100 mg/kg luteolina. Statistički značajan pad izražaja uočljiv je u skupini koja je uz DSS primala i luteolin u dozi od 100 mg/kg, u usporedbi s DSS skupinom, a također i u odnosu na kontrolnu skupinu.

## 8. Rasprava

U istraživanju je prikazana učinkovitost luteolina u tretmanu akutnog kolitisa u kemijskom modelu DSS kolitisa. Kolitis izazvan primjenom otopine DSS-a je kod miševa uključenih u istraživanje razvio kliničku sliku kolitisa obilježenu gubitkom tjelesne mase, rektalnim krvarenjem i dijarejom. U skladu s navedenim, debelo crijevo miševa s DSS-om izazvanim kolitisom bilo je skraćeno, a na histopatološkoj razini pokazano je značajno oštećenje sluznice debelog crijeva obilježeno narušavanjem arhitekture tkiva te žarišnim oštećenjem sluznice. Slične promjene uočene su i kod miševa kod kojih je osim DSS-a primijenjen i luteolin u dozi od 50 odnosno 100 mg/kg, ali intenzitet tih promjena je bio značajno manji te je time dokazana djelotvornost luteolina. U prilog navedenom govori i promjena indeksa aktivnosti bolesti koji je primjenom luteolina znatno manji nego u miševa koji su primali samo DSS otopinu. Dakle, može se pretpostaviti da je navedenim rezultatima pokazan protuupalni učinak luteolina. Također, potrebno je zaključiti da je povećanje učinkovitosti proporcionalno s primijenjenom dozom. Dobiveni rezultati su u skladu s dosad objavljenim istraživanjima u kojima je pokazano smanjenje kliničkih simptoma kolitisa te makroskopskih i mikroskopskih promjena tkiva debelog crijeva u tretmanu eksperimentalnoga kolitisa različitim prirodnim spojevima, a osobito spojevima biljnog porijekla (22).

Prethodno je pokazano i dokazano da je etiopatogeneza UK obilježena razvojem snažne i nekontrolirane upalne reakcije u čijem razvoju i napredovanju sudjeluje velik broj molekula, kemokina, citokina, transkripcijskih čimbenika, uključujući NF- $\kappa$ B. Pokazano je da farmakološka inhibicija NF- $\kappa$ B smanjuje crijevnu upalu u mišjem modelu kolitisa. Rezultati provedenog istraživanja su u skladu s navedenim budući da je pokazano smanjenje izražaja NF- $\kappa$ B i translokacije ovog transkripcijskog čimbenika u jezgru kao ključnog koraka u aktivaciji ostalih procesa. Time je potvrđen prethodno spomenuti protuupalni učinak luteolina. Također, naši rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima jer je u njima pokazano da je smanjenje izražaja NF- $\kappa$ B popraćeno sa smanjenjem izražaja glavnog upalnog medijatora odnosno TNF- $\alpha$  (23). Temeljem naših rezultata i drugih istraživanja možemo zaključiti da je protuupalno djelovanje luteolina posredovano inaktivacijom NF- $\kappa$ B signalnog puta i smanjenjem izražaja TNF- $\alpha$  i COX2 proteina. Ovim istraživanjem nismo utvrdili točan mehanizam inhibicije NF- $\kappa$ B, ali obzirom na prethodna istraživanja možemo pretpostaviti da je uključen PI3K/Akt, odnosno signalni put koji podržava preživljavanje stanica kroz inhibiciju apoptoze (24). Osim navedenog, Akt sudjeluje u regulaciji migracije, preživljavanja i diferencijacije imunoloških stanica, uključujući neutrofile, makrofage i T stanice (25). Uloga navedenog signalnog puta

prethodno je pokazana u razvoju UK, a povezuje se s NF- $\kappa$ B i izlučivanjem citokina koji pridonose upali tijekom UK. Obzirom na prethodna istraživanja možemo pretpostaviti da je pokazana inaktivacija NF- $\kappa$ B posljedica inaktivacije PI3K/Akt signalnog puta, no ovu pretpostavku je potrebno dalje istražiti, a posebno treba uzeti u obzir o kojim stanicama se radi jer PI3K/Akt neće imati isti obrazac ponašanja odnosno aktivacije.

Proliferacijska sposobnost stanica određuje se temeljem izražaja Ki-67, proliferacijskog markera. Naši rezultati su pokazali povećanje proliferacije stanica u kriptama debelog crijeva miševa tretiranih DSS-om koji su dobivali luteolin u dozi od 50 odnosno 100 mg/kg. Dobiveni rezultat je u skladu s istraživanjem Hao i sur. koji su pokazali da je povećanje izražaja Ki-67 u epitelnim stanicama kolona pridonijelo obnavljanju mukoze crijeva (26). Temeljem navedenog može se zaključiti da luteolin pridonosi obnavljanju mukoze smanjenjem apoptoze epitelnih stanica i poticanjem njihove proliferacije. Budući da obnavljanje mukoze vodi remisiji bolesti, ovi rezultati ukazuju da je luteolin obećavajući kandidat u terapiji ulceroznog kolitisa.

Nadalje, još jedan od ciljeva bio je ispitati utjecaj luteolina na proces programirane stanične smrti, odnosno apoptoze. Tretman luteolinom smanjio je izražaj proapoptotskih proteina, cijepane kaspaze-9, cijepane kaspaze-3 i PARP-a. Temeljem navedenog, možemo zaključiti da je tretman luteolinom uzrokovao smanjenje apoptoze, a što je ukazalo na antiapoptotsko djelovanje luteolina. Poznato je da je u upalnoj bolesti crijeva apoptoza uglavnom povezana s intestinalnim epitelnim stanicama koje su značajno oštećene u kolitisu. Obzirom na pokazano, može se pretpostaviti da luteolin štiti intestinalne epitelne stanice od apoptoze i potiče njihovu proliferaciju, što je ključni korak u obnovi epitelne barijere i oporavku od upalnog procesa koji je prisutan u kolitisu. Dosadašnjim istraživanjima u literaturi je pokazano da DSS zaustavlja stanični ciklus i potiče apoptozu epitelnih stanica kolona, ali također i da smanjuje njihovu proliferaciju. Poremećaj regulacije homeostaze epitelnih stanica je povezan s gubitkom kontrole staničnog ciklusa te povećanjem izražaja p21 i nakupljanja p53, proteina karakterističnih za aktivnu fazu i fazu remisije kod UK. Inhibicija p21 u potpunosti normalizira stanični ciklus i smanjuje apoptozu te tako održava homeostazu intestinalnih epitelnih stanica čime se štiti homeostaza epitelne barijere i njezina funkcija.

## **9. Zaključak**

1. Primjena luteolina ublažava simptome kolitisa te se time smanjuje aktivnost bolesti kod miševa s eksperimentalnim kolitisom.
2. Luteolin u tretmanu kolitisa smanjuje izražaj NF- $\kappa$ B i proapoptotskih proteina.
3. Luteolin ima protuupalno i antiapoptotsko djelovanje.



## 10. Literatura

1. Farooqui T, Farooqui AA. Effects of Mediterranean Diet Components on Neurodegenerative Diseases. Role of the Mediterranean Diet in the Brain and Neurodegenerative Diseases; Academic Press; poglavlje: Role of the Mediterranean Diet in the Brain and Neurodegenerative Diseases, 2018.
2. Swaminathan A, Basu M, Bekri A, Drapeau P, Kundu TK. The Dietary Flavonoid, Luteolin, Negatively Affects Neuronal Differentiation. *Front Mol Neurosci*. 2019;12:41.
3. Lin Y, Shi R, Wang X, Shen HM. Luteolin, a Flavonoid with Potential for Cancer Prevention and Therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008;8(7):634–46.
4. Hayasaka N, Shimizu N, Komoda T, Mohri S, Tsushida T, Eitsuka T, i ostali. Absorption and Metabolism of Luteolin in Rats and Humans in Relation to *in Vitro* Anti-inflammatory Effects. *J Agric Food Chem*. 2018.;66(43):11320–9.
5. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. 2013.;2013:1–16.
6. Suvarna V, Chaubey P, Sangave PC, Singh AK. An Insight of Polyphenols in Lung Cancer Chemoprevention. Poglavlje: Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease., Elsevier; 2018;125–36.
7. Liu CW, Lin HW, Yang DJ, Chen SY, Tseng JK, Chang TJ, i ostali. Luteolin inhibits viral-induced inflammatory response in RAW264.7 cells via suppression of STAT1/3 dependent NF- $\kappa$ B and activation of HO-1. *Free Radic Biol Med*. 2016;95:180–9.
8. Gendrisch F, Esser PR, Schempp CM, Wölfle U. Luteolin as a modulator of skin aging and inflammation. *Biofactors*. 2021;47(2):170–80.
9. Theoharides TC. Brain “fog,” inflammation and obesity: key aspects of neuropsychiatric disorders improved by luteolin. *Front Neurosci*. 2015;9:225.
10. Li B, Du P, Du Y, Zhao D, Cai Y, Yang Q, i ostali. Luteolin alleviates inflammation and modulates gut microbiota in ulcerative colitis rats. *Life Sciences*. 2021;269:119008.
11. Ashrafizadeh M, Ahmadi Z, Farkhondeh T, Samarghandian S. Autophagy regulation using luteolin: new insight into its anti-tumor activity. *Cancer Cell Int*. 2020;20(1):537.
12. Potočnjak I, Šimić L, Gobin I, Vukelić I, Domitrović R. Antitumor activity of luteolin in human colon cancer SW620 cells is mediated by the ERK/FOXO3a signaling pathway. *Toxicology in Vitro*. 2020;66:104852.

13. Žlender V. Apoptoza - programirana smrt stanice. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2003;54(4):267-74.
14. Selzner M, Bielawska A, Morse MA, Rüdiger HA, Sindram D, Hannun YA, i ostali. Induction of apoptotic cell death and prevention of tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer. *Cancer Res.* 2001;61(3):1233–40.
15. Buttino I, Hwang JS, Sun CK, Hsieh CT, Liu TM, Pellegrini D, i ostali. Apoptosis to predict copepod mortality: state of the art and future perspectives. *Hydrobiologia.* 2011;666(1):257–64.
16. Rubin DT, Ananthakrishnan AN, Siegel CA, Sauer BG, Long MD. ACG Clinical Guideline: Ulcerative Colitis in Adults. *Am J Gastroenterol.* 2019;114(3):384–413.
17. Adams SM, Bornemann PH. Ulcerative colitis. *Am Fam Physician.* 2013;87(10):699–705.
18. Porter, RS, & Kaplan, JL, (Eds.), *Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, 19th ed., Merck Sharp & Dohme Corp. 2011.
19. Hussein IH, Toushan M, Amin M, Marie Blenc A. Integrative approach for teaching histology and histopathology of the gastrointestinal tract using an IBD case. *Histol Cytol Embryol.* 2017;1:1-5.
20. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *The Lancet.* 2012;380:1606–19.
21. Horton R, Hagen CE. Ulcerative colitis. *PathologyOutlines.com* website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/colonuc.html>.
22. Chen Q, Duan X, Fan H, Xu M, Tang Q, Zhang L, Shou Z, Liu X, Zuo D, Yang J, Deng S, Dong Y, Wu H, Liu Y, Nan Z. Oxymatrine protects against DSS-induced colitis via inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 2017;53:149–157.
23. Vukelić I, Detel D, Batičić L, Potočnjak I, Domitrović R. Luteolin ameliorates experimental colitis in mice through ERK-mediated suppression of inflammation, apoptosis and autophagy. *Food Chem Toxicol.* 2020;145:111680.
24. Dai C, Zheng CQ, Meng FJ, Zhou Z, Sang LX, Jiang M. VSL#3 probiotics exerts the anti-inflammatory activity via PI3k/Akt and NF-κB pathway in rat model of DSS induced colitis. *Mol Cell Biochem* 2013;374:1–11.
25. Wei J, Feng J. Signaling pathways associated with inflammatory bowel disease. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2010;4:105–17.
26. Hao Y, Nagase K, Hori K, Wang S, Kogure Y, Fukunaga K, i ostali. Xilei San Ameliorates Experimental Colitis in Rats by Selectively Degrading Proinflammatory

Mediators and Promoting Mucosal Repair. Evid Based Complement and Alternat Med.  
2014.;2014:1–10.

## Popis slika

- **Slika 1.** Struktura luteolina.
- **Slika 2.** Usporedba zdrave sluznice debelog crijeva (desno) i sluznice debelog crijeva pacijenta s ulceroznim kolitisom (lijevo).
- **Slika 3.** Tipovi ulceroznog kolitisa ovisno o mjestu zahvaćenosti upalnim procesom.
- **Slika 4.** Oprema potrebna za provedbu Western blot metode.
- **Slika 5.** Plan pokusa.
- **Slika 6.** Utjecaj luteolina na kliničke simptome i aktivnost bolesti kod miševa s DSS-om izazvanim kolitisom.
- **Slika 7.** Utjecaj luteolina na intenzitet histopatoloških promjena tkiva debelog crijeva miševa s DSS-om izazvanim kolitisom.
- **Slika 8.** Utjecaj luteolina na izražaj i lokalizaciju NF- $\kappa$ B p65 proteina u debelom crijevu miševa s DSS-om izazvanim kolitisom.
- **Slika 9.** Utjecaj luteolina na izražaj proteina koji reguliraju proces apoptoze i autofagije u debelom crijevu miševa s DSS-om izazvanim kolitisom.

# Životopis



## **Europass Životopis**

### **Osobni podaci**

Prezime/ Ime

**Repić Ivana**

Adresa(e)

Struga 28, 42233 Sveti Đurđ, Varaždin, Hrvatska

Telefonski broj(evi)

Broj telefona: 042/ 837- 084

Broj mobilnog 0994330338  
telefona:

Broj(evi) faksa

E-mail

[ivana.repic9@gmail.com](mailto:ivana.repic9@gmail.com)

Državljanstvo

Hrvatica

Datum rođenja

22.12.2000.

Spol

Žensko

### **Obrazovanje i osposobljavanje**

Datumi

2015.-2019.

Naziv dodijeljene kvalifikacije

Glavni predmeti / stečene  
profesionalne vještine

Ime i vrsta organizacije pružatelja  
obrazovanja i osposobljavanja

Prva gimnazija Varaždin, srednja škola

Razina prema nacionalnoj ili međunarodnoj klasifikaciji	Srednja stručna sprema																											
Datumi	2007.- 2015.																											
Naziv dodijeljene kvalifikacije Glavni predmeti / stečene profesionalne vještine																												
Ime i vrsta organizacije pružatelja obrazovanja i osposobljavanja	Osnovna škola Sveti Đurđ, osnovna škola																											
Razina prema nacionalnoj ili međunarodnoj klasifikaciji	Niža stručna sprema																											
<b>Osobne vještine i kompetencije</b>																												
Materinski jezik(ci)	<b>Hrvatski</b>																											
Drugi jezik(ci)																												
Samoprocjena <i>Europska razina (*)</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="2">Razumijevanje</th> <th colspan="2">Govor</th> <th colspan="2">Pisanje</th> </tr> <tr> <th>Slušanje</th> <th>Čitanje</th> <th>Govorna interakcija</th> <th>Govorna produkcija</th> <th></th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>Jezik</b> Engleski</td> <td>DA</td> <td>DA</td> <td>DA</td> <td>DA</td> <td></td> <td>DA</td> </tr> <tr> <td><b>Jezik</b> njemački</td> <td>DA</td> <td>DA</td> <td>DA</td> <td>DA</td> <td></td> <td>DA</td> </tr> </tbody> </table>		Razumijevanje		Govor		Pisanje		Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija			<b>Jezik</b> Engleski	DA	DA	DA	DA		DA	<b>Jezik</b> njemački	DA	DA	DA	DA		DA
	Razumijevanje		Govor		Pisanje																							
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija																								
<b>Jezik</b> Engleski	DA	DA	DA	DA		DA																						
<b>Jezik</b> njemački	DA	DA	DA	DA		DA																						
	(*) <a href="#"><u>Zajednički europski referentni okvir za jezike</u></a>																											
Društvene vještine i kompetencije	Pristupačna																											
Organizacijske vještine i kompetencije	Organizacija okupljanja i različitih društvenih događaja																											
Tehničke vještine i kompetencije	Manipulacija bijelom tehnikom, lakši popravci, bušilica te različiti pomoćni alati																											
Računalne vještine i kompetencije	Osnovna informatička znanja, MS sustav, služenje računalom																											
Umjetničke vještine i kompetencije	Sviranje flaute i klavira																											

Druge vještine i kompetencije	Kuhanje, pečenje klipića, kolača, torti
Vozačka dozvola	B kategorija