

# UTJECAJ KLOGROGENIČNE KISELINE NA IZRAŽAJ NF-kB U AKUTNOM KOLITISU

---

**Franović, Barbara**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*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:184:876401>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-23**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Barbara Franović

UTJECAJ KLOROGENIČNE KISELINE NA IZRAŽAJ NF- $\kappa$ B U AKUTNOM KOLITISU  
ZAVRŠNI RAD

Rijeka, 2018

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Barbara Franović

UTJECAJ KLOROGENIČNE KISELINE NA IZRAŽAJ NF- $\kappa$ B U AKUTNOM KOLITISU  
ZAVRŠNI RAD

Rijeka, 2018

Mentor rada: doc. dr .sc Dijana Detel, dr.med.

Završni rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_ Medicinskom fakultetu \_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima \_\_\_\_\_ stranica, \_\_\_\_\_ slika, \_\_\_\_\_ tablica, \_\_\_\_\_ literaturnih navoda.

## SAŽETAK

UVOD: Klorogenična kiselina (KGK) je polifenol zastupljen u prehrani budući da je prisutan u velikom broju namirnica te u pićima. Ulcerozni kolitis (UK) je jedan od dva patohistološka oblika upalne bolesti crijeva, kronični je, recidivirajući, nespecifični upalni poremećaj koji zahvaća gastrointestinalni trakt. Dosadašnja saznanja govore u prilog antioksidativnog i protuupalnog djelovanja KGK.

CILJ: Cilj je istraživanja ispitati protektivnu i terapijsku ulogu KGK na eksperimentalnom modelu upalne bolesti crijeva izazvane primjenom natrijevog dekstran sulfata (DSS).

MATERIJAL I METODE: Eksperimentalni akutni kolitis je izazvan primjenom 2,5 % otopine DSS tijekom sedam dana u vodi za piće. Istovremeno, miševi su od trećeg dana pokusnog perioda *per os* primali KGK u dozi od 100 mg/kg ili 200 mg/kg. Tijekom pokusnog perioda pratio se intenzitet kolitisa temeljem kliničke slike, indeksa aktivnosti bolesti, dužina debelog crijeva i mase slezene. Također, pratila se i promjena izražaja p-I $\kappa$ B $\alpha$  te izražaj i lokalizacija NF- $\kappa$ B na proteinskoj razini u tkivu debeloga crijeva.

REZULTATI: Primjena KGK u dozi od 100 mg/kg i 200 mg/kg značajno je smanjila indeks aktivnosti bolesti, dužinu crijeva i stupanj oštećenja sluznice. Nadalje, primjenom KGK u došlo je do značajnog sniženja izražaja p-I $\kappa$ B $\alpha$  te NF- $\kappa$ B proteina, a stupanj smanjenja izražaja je proporcionalan s dozom primijenjene KGK.

ZAKLJUČAK: Rezultati potvrđuju zaštitnu ulogu KGK modulacijom aktivnosti transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B kao proupalnog medijatora.

**Ključne riječi:** Klorogenična kiselina, ulcerozni kolitis, animalni model, DSS kolitis

## **SUMMARY**

### **INFLUENCE OF CHLOROGENIC ACID ON THE EXPRESSION OF NF- $\kappa$ B IN ACUTE COLITIS**

**INTRODUCTION:** Chlorogenic acid (CHA) is a common polyphenol prevalent in human diet since is contained in various foods and beverages. Ulcerative colitis (UC) a subtype of inflammatory bowel disease is a long-lasting, relapsing and non-specific inflammatory disorder of a gastrointestinal tract. There is substantial indication to show that CHA exhibit many biological properties, including antioxidant and anti-inflammatory effects. However, its impact on experimental colitis is still unidentified.

**AIM:** Therefore, we investigated the potential protective and therapeutic effect of CHA administration in dextran sulfate sodium (DSS)-induced mouse model of experimental colitis.

**MATERIALS AND METHODS:** Experimental acute colitis was induced by administration of 2.5% dextran sulfate sodium (DSS) in the drinking water of C57BL/6 mice for seven days. Mice received CHA at dose of 100 and 200 mg/kg, per os once a day from day three to seven when they had been sacrificed. The disease activity index, colon length, histological assessment, expression of nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) and p-I $\kappa$ B $\alpha$  were examined.

**RESULTS:** Oral administration of CHA at a dose of 100 mg/kg and 200 mg/kg significantly attenuated the disease activity index, colon shortening and histological damage. In addition, oral administration of CHA at a dose 200 mg/kg/day decreased the expression of nuclear transcription factor p-I $\kappa$ B $\alpha$ . Furthermore, immunohistochemical analysis showed a dose-dependent decrease in expression of NF- $\kappa$ B p65 subunit.

**CONCLUSION:** These observations designate that CHA may suppress experimental colitis through the NF- $\kappa$ B signalling pathway.



# SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA RADA .....	1
1.1. Klorogenična kiselina.....	1
1.1.1 Farmakokinetika klorogenične kiseline.....	3
1.1.2 Mehanizam djelovanja.....	4
1.1.3 Uloga klorogenične kiseline u modulaciji upalnog odgovora .....	5
1.2. Upalne bolesti crijeva.....	6
1.2.1. Ulcerozni kolitis .....	7
1.2.1.1 Povijest .....	8
1.2.1.2. Epidemiologija .....	8
1.2.1.3. Patohistološke promjene.....	9
1.2.1.4. Klinička slika.....	10
1.2.1.5. Dijagnostički postupci .....	11
1.2.1.6. Terapija.....	11
1.2.2 Mehanizmi mukoznog cijeljenja .....	12
1.3. Animalni modeli.....	13
1.4. Nuklearni čimbenik (NF)- $\kappa$ B .....	14
1.5. Imunohistokemija.....	17
1.5.1. Protutijela .....	18
1.5.2. Princip rada.....	18
1.5.3 Priprema tkiva za imunohistokemiju.....	19
1.5.3.1 Fiksiranje, uklapanje i rezanje tkiva.....	19
1.5.3.2 Razotkrivanje antigena .....	20
1.5.3.3 Imunodetekcija antigena.....	20
1.6. Elektroforeza i imunodetekcija.....	22
1.6.1. Jednodimenzijske tehnike elektroforeze.....	23
1.6.2. Izoelektrično fokusiranje.....	23
1.6.3. Dvodimenzionalne tehnike .....	24
1.6.4. Metode vizualizacije.....	24
1.6.5. Prijenos proteina i imunodetekcija .....	25
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	27
3. MATERIJALI I METODE .....	28
3.1 Protokol izazivanja kolitisa i primjene klorogenične kiseline .....	28



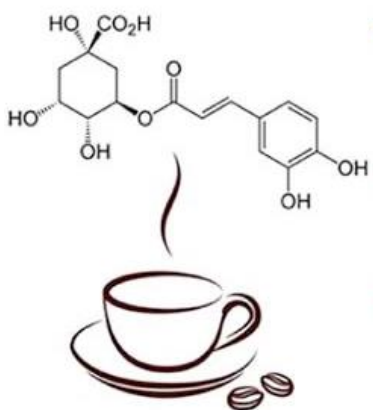
3.2. Procjena uspostave kolistisa i uzimanje uzoraka.....	28
3.3. Hematoksilin-eozin bojanje tkivnih preparata.....	29
3.4. Priprema tkivnih preparata i imunohistokemijsko bojanje.....	29
3.5. Homogenizacija tkiva i određivanje koncentracije proteina .....	31
3.6. Razdvajanje proteina i imunodetekcija NF- $\kappa$ B .....	31
3.7. Etički aspekt istraživanja na eksperimentalnim životinjama.....	32
3.8. Statistička obrada podataka .....	33
4. REZULTATI.....	34
4.1. Klinička manifestacija i procjena aktivnosti kolitisa izazvanog primjenom DSS otopine.....	34
4.2. Patohistološke promjene sluznice crijeva tijekom kolitisa izazvanog primjenom DSS otopine	38
4.3. Promjene izražaja NF- $\kappa$ B i p-I $\kappa$ B $\alpha$ u tkivu debelog crijeva tijekom kolitisa izazvanim primjenom DSS otopine .....	40
5. RASPRAVA.....	43
6. ZAKLJUČAK .....	47
7. LITERATURA.....	48
8. PRILOZI.....	52
8.1. Popis slika.....	52

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA RADA

## 1.1. Klorogenična kiselina

Klorogene kiseline pripadaju skupini polifenolnih spojeva. One su esteri kiničnih i hidroksicimetnih kiselina najčešće, kafeinske, ferulinske i *p*-kumarinske kiseline. Klorogenična kiselina (KGK) je ester kafeinske i kinične kiseline. Klorogene kiseline se mogu podijeliti prema: i) vrsti esterskog supstituenta, ii) broju esterskog supstituenta te iii) položaju acilnog ostatka. Mogu se pronaći u različitim biljnim materijalima odnosno hrani i piću biljnog podrijetla primjerice: zelenoj kavi, čajevima, jabuke, artičoke, mrkva, rajčica.

Klorogena kiselina (KGK) je ester kafeinske i kinične kiseline, koji djeluje kao intermedijar u biosintezi lignina (1). Polifenolna skupina estera odnosi se na „klorogenu kiselinu“ kao i na hidroksicinaminsku kiselinu (kafeinsku, ferulinsku i *p*-kumarinsku kiselinu) s kininskom kiselinom.



**Slika 1. Strukturna formula klorogenične kiseline**

U epidemiološkim, biološkim te farmakokinetičkim istraživanjima dokazano je da hrana bogata klorogenim kiselinama ima izrazito pogodan učinak na ljudsko zdravlje. Utvrđeno je da klorogene kiseline imaju jaki antioksidativni učinak te različite pozitivne učinke na bolesti

kao što su: dijabetes tipa 2, neurodegenerativne bolesti (Parkinsonova i Alzheimerova bolesti), karcinomi (prostate, mokraćnog mjehura, gušterače, dojke, debelog crijeva) te kardiovaskularne bolesti.

Kava je glavni izvor hranjivih klorogenih kiselina, uključujući klorogeničnu kiselinu (KGK) u ljudi (1). Pokazano je da umjereno konzumiranje kave ima blagotvorni učinak na ljudsko zdravlje, te da ima najveću koncentraciju polifenola među analiziranim napicima (1). No, s druge strane pokazano je i da je konzumacija čaja, vina, različitih biljnih infuzija te nekih voćnih sokova povezana sa smanjenjem razvoja kroničnih bolesti. Prethodna navedena pića također sadrže klorogene kiseline u različitim koncentracijama. KGK ublažava oksidativni stres kao i nepoželjne učinke koji su povezani s neuravnoteženim unutarstaničnim redoksom. Također, KGK aktivacijom različitih metaboličkih i signalnih putova pokazuje protuupalno djelovanje (2). KGK je vrlo važan sekundarni metabolit s različitim ulogama u biljkama. Poboljšava zaštitu od UV zračenja te povećava otpornost na mikroorganizme. Dokazano je da klorogenična kiselina djeluje kao faktor otpornosti na štetočine u ukrasnim biljkama. Svi polifenoli pa tako i KGK ostvaruje svoj antioksidativni učinak putem nekoliko mehanizama: prijenos vodikovog atoma, sekvencijski proton gubitak elektrona, jedan elektronski prijenos-proton prijenos, protonski povezni prijenos elektrona, stvaranje radikalnih produkata, pojedinačni prijenos elektrona i sekvencijalni proton gubitak vodikovog atoma. (3).

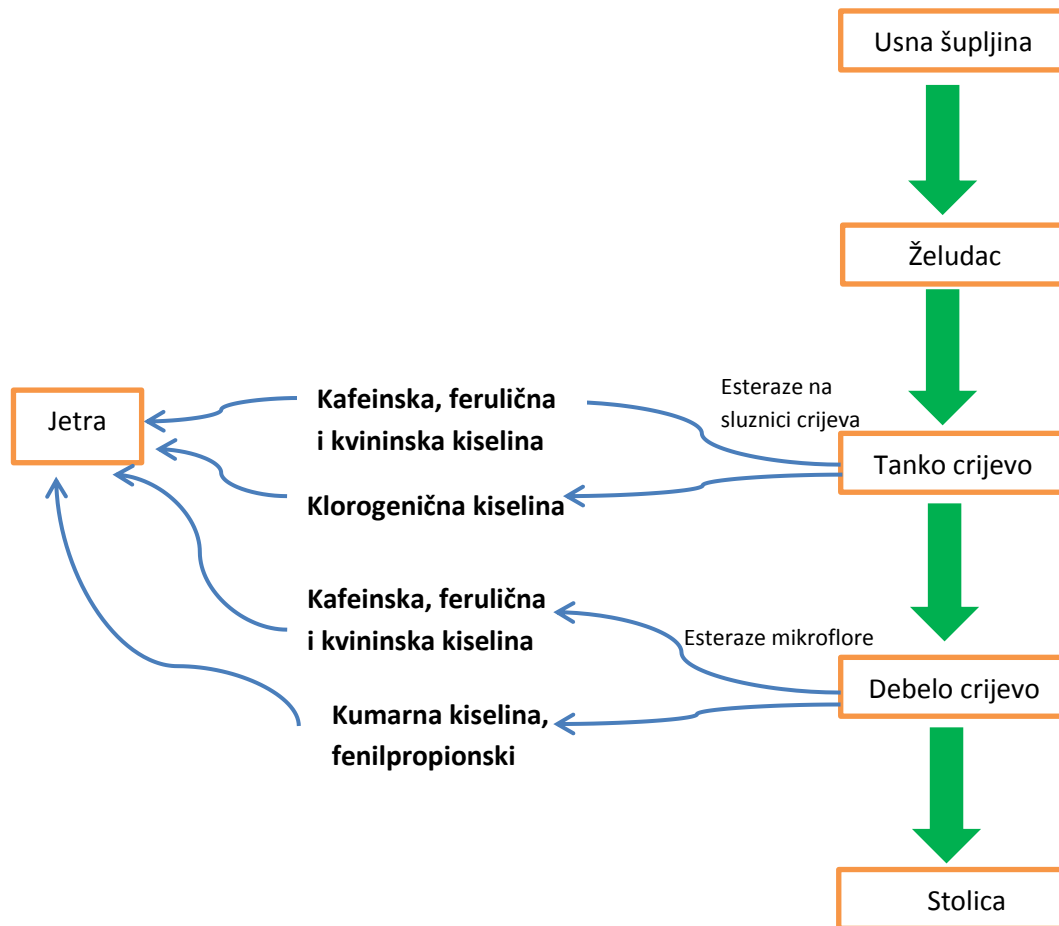
Postoji nekoliko izomernih oblika KGK, a svaki izomer ima svoje podgrupe. Različiti ekstrakti kave sadrže niz izomera KGK. Drugi izomer KGK je kriptoklorogeninska kiselina (3 - CQA) te neoklormenska kiselina (5 - CQA). 1976. IUPAC preinačuje redoslijed numeriranja na kiselom kininskom prstenu te je predloženo da klorogen mijenja 3 - CQA u 5 - CQA. No, danas većina kemijskih dobavljača koristi prijašnji naziv IUPAC nomenklature KGK kao 3 - CQA. Postoje različiti znanstveni dokazi da KGK djeluje protuupalno i antioksidacijski, te da ima vrlo važnu ulogu pri utjecaju na lipide i metabolizma glukoze.

Prilikom jednog istraživanja dokazano je da primjena KGK dovodi do smanjenja koncentracije lipoproteina visoke gustoće u plazmi te povećanja ukupnog kolesterola i koncentracije lipoproteina male gustoće u plazmi. KGK izolirana iz ekstrakta zelene kave najučinkovitiji je agens u snižavanju krvnog tlaka kod pacijenata s blagom hipertenzijom. Također, KGK ima bakteriocidni učinak posebno prema: *Stenotrophomonas maltophilije* , *Helicobacter* , *Escherichia coli* te *Staphylococcus aureus* (4).

### **1.1.1 Farmakokinetika klorogenične kiseline**

Prilikom istraživanja provedenih na ljudima i životinjama u krvi je pokazano prisustvo KGK zajedno sa svojim metabolitima (ferulna, izoferulska i kafeinska kiselina). Nakon svakodnevne konzumacije kave ili ekstrakta zelene kave kafeinsku kiselinu (KK) možemo pronaći u cirkulaciji. Tijekom konzumacije određenih pića i hrane unosi se i KGK koja se ne hidrolizira u želudcu već se u intaktnoj formi apsorbira, jednom trećinom u tankom crijevu. Odnosno 30 % unosa klorogenih kiselina se apsorbira u tankom crijevu, a 70 % uzete količine klorogenih kiselina prolazi kroz tanko crijevo do debelog crijeva gdje podliježu djelovanju mikrobiote debelog crijeva. Količina koja se apsorbira u tankome crijevu brzo ulazi u krvotok i dalje se metabolizira u jetri. Pokazano je da već 30 minuta nakon konzumacije kave u krvotoku možemo naći klorogene kiseline. Brzim ulaskom u krvotok i razgradnjom u jetri smanjena je biorasploživost klorogenične kiseline odnosno može se zaključiti da je biorasploživost, pri fiziološkim koncentracijama, oko 1 % što je, naravno ograničavajući faktor u kliničkoj primjeni. Preostale dvije trećine odlaze u debelo crijevo gdje se fenolna kiselina metabolizira uz pomoć gastrointestinalne mikroflore te se onda apsorbira. Cjepanje klorogenične kiseline iz FQA (feruloilna kininska kiselina) i CQA vrši se u tankom

crijevu, dok se biokemijskim putem oslobađa ferulna kiselina. Pretvorbu KK i ferulinske kiseline u dihidroferulinske kiseline te mehanizam apsorpcije odvija se u debelom crijevu (4).



**Slika 2. Prikaz apsorpcije klorogenih kiselina u gastrointestinalnom traktu (4)**

### 1.1.2 Mehanizam djelovanja

Točan mehanizam djelovanja još uvijek nije razjašnjen. Pretpostavlja se da KGK svoje pozitivne učinke na organizam ostvaruje kroz nekoliko različitih mehanizama. Prema dosadašnjim saznanjima dobro su proučeni antioksidativni i protuupalni učinak.

Ma i suradnici su pokazali da u pretilih miševa primjena KGK značajno smanjuje izražaj biljega makrofaga (F4/80, CD68, Cd11b, i Cd11c) u masnom tkivu i proupalnih medijatora uključujući TNF- $\alpha$  i monocitni kemotaktički protein 1 (engl. *Monocyte chemotactic protein-1*, MCP-1). Nadalje, pokazano je da KGK inhibira aktivaciju PPAR $\gamma$  koji potiče ulazak masnih kiselina u jetru. Time se došlo do zaključka da svoj antioksidativni učinak ostvaruje kroz supresiju upalnog procesa i sprječavanjem akumulacije masti u masnom tkivu (5).

### **1.1.3 Uloga klorogenične kiseline u modulaciji upalnog odgovora**

Upala je fiziološki, strogo kontrolirani odgovor na ozljedu tkiva kao rezultat egzogenih, najčešće, ili endogenih čimbenika. Egzogeni čimbenici mogu biti bakterije, virusi, alergeni, strano tijelo ili toksična tvar. Endogeni čimbenici se razvijaju te uzrokuju upalni proces kao rezultat poremećaja u funkciji određenog tkiva ili organskog sustava.

Kao što je na početku rečeno upalni proces je strogo kontrolirani proces koji omogućuje brzo uspostavljanje homeostaze tkiva. Međutim u određenim uvjetima, stanjima, upala predstavlja nekontrolirani proces koji vodi ka razvoju akutnih i kroničnih bolesti. Protuupalni lijekovi moduliraju ili inaktiviraju signalne molekule ili upalne medijatore koji posreduju u aktivaciji nekontroliranog upalnog procesa te na taj način imaju za cilj sprečavanje ili kontroliranje nekontroliranog upalnog procesa (6).

Ključna molekula u aktivaciji proupalnih citokina, kemokina, i adhezijskih molekula je nuklearni transkripcijski čimbenik-kappa B (NF- $\kappa$ B). Također, vrlo važnu ulogu ima i ciklooksigenazni put kojim se proizvode velika skupina proupalnih molekula, eikozanoida (7).

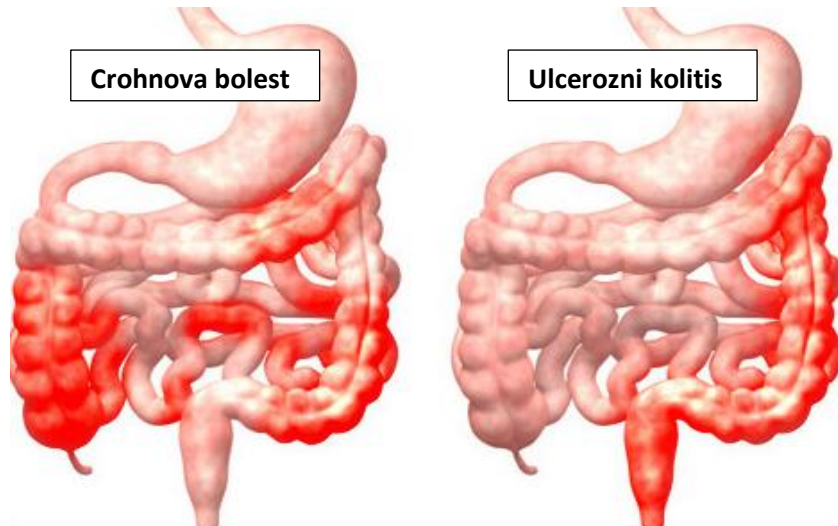
Istraživanja provedena na stanicama i životinjskim modelima nedvojbeno su pokazala da KGK ima protuupalni učinak. Na Caco-2 stanicama pokazano je da svoje protuupalno

djelovanje KGK ostvaruje smanjenjem sekrecije proupalnih citokina, uključujući interleukin (IL)-8, IL-6 nakon stimulacije s TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ . Također, KGK je smanjila lučenje IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-6 u lipoproteinom stimuliranih RAW264.7 makrofaga i BV2 mikroglia stanica i to kroz regulaciju aktivacije NF- $\kappa$ B i JNK/AP1 signalnog puta (8). U životinjskim modelima upalne bolesti crijeva pokazana je inhibicija infiltracije upalnih stanica (neutrofila) i aktivacija NF- $\kappa$ B na lokalnoj razini odnosno na mjestu oštećenja (9, 10).

## **1.2. Upalne bolesti crijeva**

Idiopatsku kroničnu upalu gastrointestinalnog sustava (upalna crijevna bolest) možemo podijeliti na Chronovu bolest i ulcerozni kolitis (UK). Ova dva patomorfološka oblika imaju mnogo dodirnih, zajedničkih karakteristika, ali i mnogo različitih. Dodirne točke pronalaze se u kliničkoj slici i epidemiologiji što upućuje na sličnu etiopatogenezu koja, unatoč mnogim istraživanjima, još uvijek nije razjašnjena. U današnje vrijeme ta se podjela upalnih bolesti crijeva proširila još na nedeterminirani kolitis i pouchitis (upala zdjeličnog ilealnog rezervoara napravljenog nakon proktokolektomije).

Chronova bolest je kronična upalna bolest crijeva kod koje se transmuralni diskontinuirani upalni proces može širiti kroz probavnu cijev, od usne šupljine do anusa. Razlikujemo tri osnovna fenotipa Crohnove bolesti: upalni (luminalni), stenozirajući i penetrirajući (fistulirajući) (7).

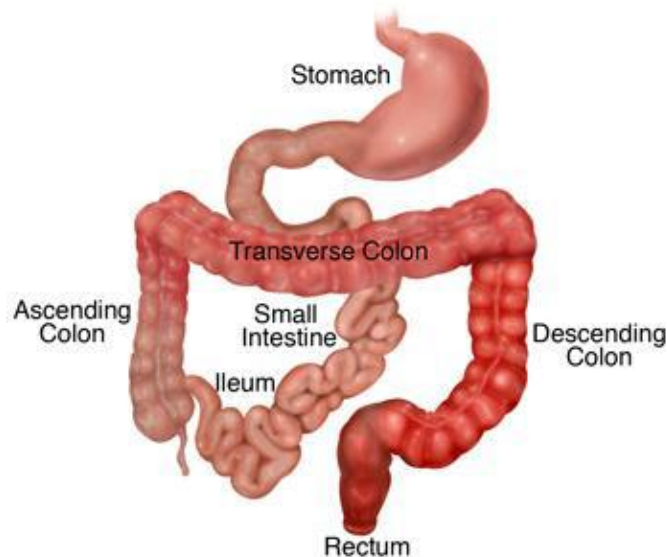


**Slika 3. Prikaz zahvaćenosti tankog i debelog crijeva u Crohnovoj bolesti i ulceroznom kolitisu (7)**

### **1.2.1. Ulcerozni kolitis**

Ulcerozni kolitis (UK), kronični recidivirajući upalni poremećaj zahvaća sluznicu debeloga crijeva i to najčešće sam završni dio debeloga crijeva, rektum. S obzirom na sam stupanj zahvaćenosti debelog crijeva odnosno prema Montrealskoj klasifikaciji razlikujemo: ulcerozni proktitis ili proktosigmoiditis, lijevostrani UK poznat i kao distalni kolitis te i ekstenzivni kolitis (12). Ulcerozni proktitis je bolest koja zahvaća sam rektum. Distalni kolitis ili proktosigmoiditis obilježava proširenost do sredine stigme. Ljevostrani UK zahvaća dio koji je najbliži slezeni na debelome crijevu. Pankolitis ima mogućnost širenja iza slezenskoga zavoja. Prema kliničkim kriterijima i procjeni endoskopske aktivnosti intenzitet odnosno aktivnost bolesti se može klasificirati kao remisija, blaga bolest, umjerena bolest i teška bolest (13). Truelove Witts indeks se koriste kao nam klinički kriteriji za procjenu intenziteta bolesti (14), a za ukupnu procjenu aktivnosti i proširenosti bolesti koristi se Mayo kliničko-endoskopski indeks (15).





**Slika 4. Prikaz lokalizacije upalnih promjena sluznice gastrointestinalnog trakta u ulceroznom kolitisu (14)**

#### **1.2.1.1 Povijest**

Napredak u prepoznavanju upalne bolesti crijeva zabilježen je u 19. stoljeću kada je otkriven električni sigmoidoskop pomoću kojeg se moglo pomno proučiti samu unutrašnjost crijeva. U 20. stoljeću otkrivaju se dvije najveće upalne bolesti crijeva Chronova bolest i UK. Samuel Wilks 1859. godine po prvi puta prepoznaje UK. Smatralo se da je bacilarna dizenterija uzrok UK, no 1939. godine endoskopskim pregledom gastrointestinalnog trakta odbačena je ta tvrdnja. Hawkins 1909. godine opisuje detaljan tijek bolesti i pojavu mogućih simptoma (17).

#### **1.2.1.2. Epidemiologija**

Između 20. i 40. godine života najčešće se pojavljuje UK i to s većom učestalošću kod muškaraca. Na 100 000 stanovnika incidencija UK kreće se od 0,6 – 24,5 te je znatno veća u

razvijenim zemljama. Djelovanjem genetskih i okolišnih čimbenika dolazi do poremećaja imunološkog odgovora što dovodi do razvoja UK. UK je poligenetska bolest što znači da je značajnost genetski faktori u nastanku bolesti za oko 40 % veća nego značajnost faktora okoliša.

### **1.2.1.3. Patohistološke promjene**

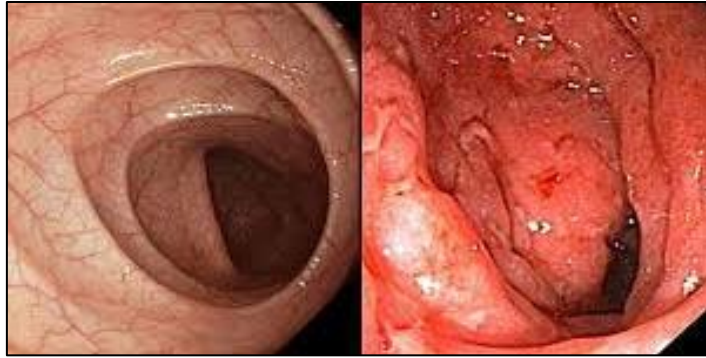
Kao što je prethodno navedeno, upalni proces prisutan u UK započinje u rektumu te se širi u proksimalnom smjeru u kontinuitetu. Upala zahvaća sluznicu i podsluznicu debelog crijeva. Za vrijeme blagog stupnja upale sluznice je granulirana, eritematozna i sklona spontanom krvarenju. Kod težih oblika bolesti sluznica je hemoragična, edematozna, a vrlo često je i prožeta ulceracijama. U područjima gdje se dodiruju upalom promijenjena i zdrava sluznica, granica je jasna. Polipi se mogu javljati kod aktivnog oblika, dok u fazama remisije sluznica može izgledati potpuno normalno, no blijeda i atrofična je tijekom dugotrajne bolesti. Kod UK upalne promjene pružaju se od rektuma prema proksimalnim dijelovima debelog crijeva. Stoga, prema vrsti proširenosti upalnih promjena na sluznici crijeva možemo razlikovati proktitis, od rektuma do lijenalne fleksure – lijevostrani kolitis, zatim od proksimalno do lijenalne fleksure – prošireni kolitis, te može zahvatiti sluznicu cijelog debelog crijeva – pakotitis.



**Slika 5. Prikaz promijenjene sluznice u ulceroznim kolitisu**

#### **1.2.1.4. Klinička slika**

UK se razvija postupno, kod većine bolesnika kroz razdoblje od više tjedana ili mjeseci, no kod vrlo malog broja bolesnika simptomi se mogu javiti naglo. Proljev, rektalno krvarenje, tenezmi ili urgencija i bolovi u trbuhu glavni su simptomi UK. Jedan od najčešćih simptoma bolesti je rektalno krvarenje koje prepoznamo po krvavim stolicama. Mogu se pronaći sluz i gnoj u primjesi sa stolicom. Proljev je drugi najučestaliji simptom. Proljev je učestaliji što je veći dio debelog crijeva zahvaćen. Tenezmi ili urgencije su grčeviti i vrlo bolni nagoni na defekaciju koji su karakteristični za prazan distalni dio debelog crijeva. Bol u trbuhu (kolike) ili grčevi su također česti simptomi koji zahvaćaju proksimalne dijelove debelog crijeva. Oni upućuju na agresivniju oblik bolest, a vrlo često se javljaju u kombinaciji s mučninom, povraćanjem, febrilitetom te gubitkom tjelesne mase (16). Upalne bolesti crijeva su često popraćene ekstraintestinalnim manifestacijama koje se javljanju čak u 35-40 % bolesnika.



**Slika 6. Endoskopski prikaz zdrave i upalom zahvaće sluznice debelog crijeva**

#### **1.2.1.5. Dijagnostički postupci**

Dijagnoza UK se temelji na kliničkih simptomima i nalazu upaljene sluznice proktosigmoidoskopijom te pozitivnih laboratorijskih vrijednosti upalnih parametara. Također, vrlo je važno obaviti i kolonoskopiju ili irigografiju cijelog crijeva te mikrobiološki pregled stolice. Za vrijeme endoksopije poželjno je uzeti uzorak s više mjesta sluznice za patohistološku dijagnostiku. Rengentskom snimkom abdomena može se uočiti stupanj bolesti debelog crijeva te rano otkrivanje na hematobilijarnom i uropoetskom traktu. Krvnom slikom također možemo dokazati prisutnost anemije ili poremećaj elektrolita (17).

#### **1.2.1.6. Terapija**

Osnovni ciljevi terapije upalnih bolesti crijeva pa tako i UK su brza kontrola simptoma, brzo postizanje remisije te održavanje stabilne remisije. Ovim pristupom se nastoji spriječiti progresivna destrukcija tkiva i razvoj komplikacija, što onda rezultira smanjenim brojem hospitalizacija i operacija. Svakako, ovaj pristup pridonosi poboljšanju kvalitete života bolesnika i prevenciji invaliditeta.

#### *a) Farmakološko intervencije*

Kod blagih oblika bolesti koriste se toplički aminosalicilati u obliku klizme. Klizma mesalazina (4 gr/60ml) i čepići (500mg) u dnevnoj dozi od 4 g daje se inicijalno. Također, postoje i toplički kortikosteroidi i oralni aminosalicilati koji su znatno manje učinkovitiji od topličkih. Uobičajna terapija traje od 4-12 tjedana. Klizme ili čepići mesalazina daju se svaku večer, no doza se smanjuje svaku drugu ili treću večer. Kod kronične bolesti sluznice debelog crijeva liječi se oralnim aminosalicilatima te adekvatnom dijetom s dovoljnom količinom proteina i kalorija (18).

#### *b) Kirurška terapija*

Kiruršku terapiju možemo podijeliti na hitne, urgentne i elektivne. Pri masivnom nekontroliranom krvarenju te toksičnom megakolonu potrebna je hitna operacija, dok za vrijeme teškog kolitisa potrebna je urgentna operacija. Bolest koja ne reagira na terapiju iziskuje elektivnu operaciju (18).

### **1.2.2 Mehanizmi mukoznog cijeljenja**

Glavne karakteristike upalne bolesti crijeva, a time i UK su morfološko i funkcionalno oštećenje intestinalnog epitela, a time i posljedična disfunkcija intestinalne barijere (19). Kao rezultat oštećenja integriteta intestinalne barijere dolazi do prodora komenzalnih bakterija u dublje slojeve crijevne stjenke. Komenzalne bakterije nosiocu su antigena koji imaju mogućnost, kod genetski podložnih osoba, izazvati ili potaknuti nekontroliranu imunološku reakciju, aktivaciju T-stanica te razvoj upalnog procesa, akutnog ili kroničnog (20).

S druge strane, mukozno cijeljenje izrazito je kompleksan proces koji uključuje niz mehanizama i kontrolnih točaka. Vrlo važnu ulogu u tom procesu imaju epitelne stanice te

procesi proliferacije, migracije i funkcionalne diferencijacije kako u održavanju intestinalne homeostaze tako i tijekom supresije upalnog procesa i cijeljenja upalom oštećene sluznice. U početnim fazama razvoja upalnog procesa intestinalne epitelne stanice s zdravog područja migriraju u oštećeno područje s ciljem da se uspostavi integritet barijere. Nakon toga slijedi prethodno spomenuta proliferacija, a konačni korak je diferencijacija intestinalnih epitelnih stanica i uspostavljanje funkcije epitela. U regulaciji navedenih procesa su uključeni faktori rasta (TGF-  $\alpha$ ,  $\beta$ , epidermalni faktor rasta, faktor rasta fibroblasta, itd) citokini (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6) kemokini (CXCR4, CXCL12), signalni putevi i molekule. Navedeni faktori aktiviraju signalnu kaskadu koja vodi ka aktivaciji ključnih transkripcijskih faktora kao što su NF- $\kappa$ B i STAT-3 (20).

### **1.3. Animalni modeli**

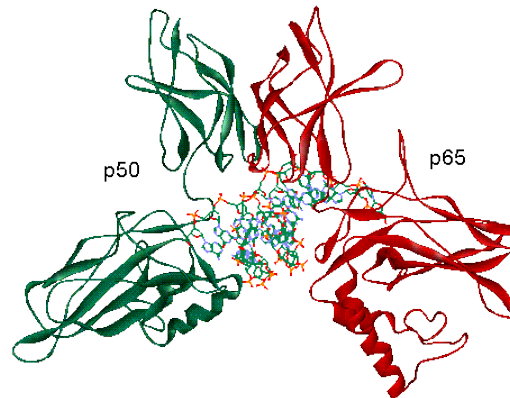
Animalni modeli nisu pokazatelji kompleksnosti upalnih bolesti crijeva u ljudi, no istraživanja na životinjama učinilo je veliki pomak u shvaćanju patofizioloških mehanizama u ranim stadijima kolitisa. Induciranje upale gastrointestinalnog trakta moguće je pomoću iritanata kao što su: octena kiselina, jodoacetamid, indometacin, trinitrobenzensulfonska kiselina (TNBS), oksazon, natrij dekstran sulfat (DDS) i peptoglikan polisaharid (PG-PS). Indukciju nekroze sluznice crijeva i samu upalu crijeva uspostavlja se primjenom odgovarajuće doze octene kiseline. Najčešće se koristi 4-5 % octena kiselina, jer u većim koncentracijama može doći do perforacije crijeva. Endogeni sulfhidridi spojevi primjerice glutation služi kao zaštita crijevne sluznice na modelu jodoacetamida. Indometacin se otopi u 100 % alkoholu te se razrijedi sodbikarbonom ili metilcelulozom i stavi u hranu za životinje i na taj nači uzrokuje manja oštećenja tankog ili debelog crijeva kod

glodavaca. Također, oštećenja sluzničke barijere TNBS-om otopljenog u etanolu moguće je inducirati akutni i kronični kolitis u miševa. Karakteristična je pojava granuloma u crijevu. Hematohezija, gubitak tjelesne težine, skraćivanje crijeva, čirevi na crijevima i infiltraciju neutrofila DDS uzrokuje na miševima i štakorima. Transmuralni enterokolitis nastaje ubacivanjem sastavnih komponenti bakterijske stijenke u distalni dio kolona štakora. Zadebljanje stijenke debelog crijeva pojačava: propusnost sluznice, infiltraciju limfocita makrofaga i neutrofila, povećanje aktivnosti mijeloperoksidaze, proizvodnju dušikovog oksida i sintezu kolagena koji uzrokuje PG-PS (21).

#### **1.4. Nuklearni čimbenik (NF)-κB**

U skupinu transkripcijskih čimbenika homodimernih i heterodimernih spada i NF-κB koji ima mogućnost aktivacije ciljnih gena za preživljavanje, proliferaciju i imunološki odgovor. Takvu skupinu čine sveukupno pet članova: RelA (p65), cRel, RelB, NF-κB2 (p52;p100), NF-κB1 (p50; p105) koje možemo pronaći u homodimernim i heterodimernim oblicima. Transaktivacijsku domenu C-terminalnog dijela imaju RelA, c-Rel i RelB dok su inaktivni prekursori p50 i p52 proteina i smješteni su u citoplazmi i nose naziv NFκB1/p105 i NF-κB2/p100. Pomicanje proteina u jezgru događa se zahvaljujući proteolitičkim procesom kada se pomiče C- terminalna inhibitorska domena. U obliku homodimera ili heterodimera nalazimo p50 ili p52 koji imaju mogućnost vezanja za jedan od ta tri proteina koji imaju transkripcijsku domenu. RelA i p50 nailazimo u divljem staničnom tip, a za razliku od njih c-Rel ima ekspresiju na hematopoetske stanice i limfocite. Timus, limfni čvorovi i Peyerove pločice imaju dominantnu ekspresiju u RelB. NF-κB inhibitori imaju kontrolu u svim stanicama koje su smještene u citoplazmi. NF-κB ističe se sa svojom ulogom kao

regulatora normalnih i malignih B stanica. Također njegova je uloga da poboljša preživljavanje stanica (12, 25).



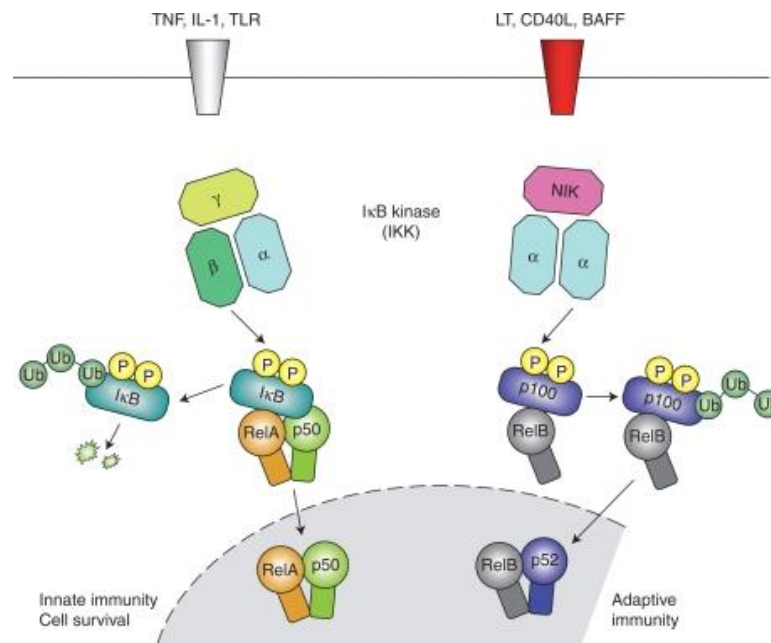
**Slika 7. Struktura NF- $\kappa$ B/DNA kompleksa. Transkripcijski čimbenik NF- $\kappa$ B sastoji se od dvije podjedinice p50 i p65.**

Trankripcijski čimbenici NF- $\kappa$ B svrstavaju se u skupinu konzerviranih proteina koji imaju vrlo važnu ulogu u imunološkom odgovoru domaćina. Aktivacija se vrši putem odgovora na različite stimulanse čimbenike rasta, bakterijske infekcije, virusne infekcije te na proinflamatornim citokinima. Prilikom vezanja virusne čestice na svoj odgovarajući receptor potiče se aktivacija NF- $\kappa$ B. Takav način djelovanja imaju dsRNK te virusni proteini. U više od 150 gena dokazana su mjesta vezanja NF- $\kappa$ B, kao i za gene citokina i kemokina, receptora koji su potrebni kod adhezije i transmigacije neutrofila, imunološki receptori te u antigenskoj prezentaciji odgovarajući proteini. Uz pomoć NF- $\kappa$ B induciraju se citokini TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  koji mogu aktivirati i pojačati imunološki odgovor i pridonijeti razvoju kroničkoj upali. Cilj NF- $\kappa$ B je djelovanje protuupalnih lijekova. Ovakav transkripcijski put ima važnu ulogu tijekom kontrole stanične proliferacije i apoptoze. NF- $\kappa$ B također regulira stanični ciklus te gene koji imaju mogućnost poticanja gena na antiapoptotičke učinke. Direktno djelovanje NF- $\kappa$ B na preživljavanje stanice ima zahvaljujući djelovanja na Bcl-2, celularne inhibitore apoptoze te receptore TNF- $\alpha$  (27). Uz pomoć različitih stimulansa primjerice citokina (TNF- $\alpha$  i IL-1),



T i B mitogena , virusnih proteina te induktora stresa može se aktivirati NF- $\kappa$ B . Inhibicija s I $\kappa$ B vrši se u citoplazmi. Signalni aktivirajući uzorak npr. vezanje TNF- $\alpha$  na njegov receptor ima mogućnost da izvede fosforilaciju I $\kappa$ B uz pomoć IKK (I $\kappa$ B kinaze). Na taj način se vrši degradacija I $\kappa$ B kroz ubikvitin sustav. Maskira se lanac te ubikvitina zajedno s ciljnom molekulom za degradaciju 26S proteosoma. Slobodni NF- $\kappa$ B prelaze u jezgru i aktiviraju na taj način transkripciju. Uz pomoć negativne i pozitivne sprege regulira se takva kaskadna reakcija (28).

Jedna od glavnih uloga NF- $\kappa$ B je sprječavanje apoptoze, no u nekim slučajevima je moguća smrt stanice. Među glavnim značajkama NF- $\kappa$ B prilikom aktivacije ističe: djelovanje u samo nekoliko minuta pri početku stimulansa, nije potrebna sinteza proteina te velika sposobnost djelovanja na imunoreakciju. Mnogi virusi kao što su HIV, virus hepatitisa B, virus influence te herpes virusi imaju sposobnost moduliranja NF- $\kappa$ B. Domaćinu kojem prijete neka virusna infekcija uz pomoć aktivacije NF- $\kappa$ B omogućuje se protekcija. To su dokazali brojni pokusi na miševima kojima nedostaju neki od segmenata NF- $\kappa$ B te imaju znatno veću mogućnost prihvaćanja infekcije. Stoga mnogo virusa je izgradilo način zaustavljanja NF- $\kappa$ B aktivacije. Nemogućnost oslobađanja aktivnog oblika NF- $\kappa$ B ima HIV zbog degradacije I $\kappa$ B proteina. No, neki virusi mogu koristiti aktivaciju NF- $\kappa$ B puta. Tim načinom se blokira apoptoza i produžuje se život domaćina virusa , kvalitetnija replikacija i diseminacija. Za stanice kojima je dokazano da imaju nisku aktivnost NF- $\kappa$ B rezistentne su na virus influence, no nakon njegove aktivacije postaju vezane za infekciju što ukazuje na negativan transkripcijski put prilikom takve aktivacije (27).



**Slika 8. Kanonski i alternativni aktivacijski putevi transkripcijskog čimbenika NF-κB**

## 1.5. Imunohistokemija

Imunohistokemija kao metoda služi za lokalizaciju specifičnih antigena uz pomoć točno usmjerenih protutijela na način da se određeno protutijelo veže isključivo samo za ciljani antigen. Do 1940. godine imunohistokemija korištena je radi analize prisutnosti antigena u tkivu, a od 1974. godine, kada su Taylor i Burnos objavili standardizirali protokol, upotrebljava se i na formalinom fiksiranim tkivima. Danas se imunohistokemija koristi kao snažno dijagnostičko sredstvo pomoću kojeg dobivamo informacije o morfološkoj analizi tkiva. Također se upotrebljava za procjenu staničnih markera koji određuju specifični fenotip te prilikom karakterizacije neoplastičnih bolesti kod ljudi. Tehnika je za identifikaciju antigena na principu antigen-antitijelo. Mjesto vezanja protutijela je identificirano izravnim obilježavanjem antitijela. Imunohistokemija kao metoda se vrlo često primjenjuje u znanstveno–istraživačkom radu posebice u područjima s ciljem boljeg razumijevanja ekspresije određenih proteina u tkivima (22).

### **1.5.1. Protutijela**

Za imunohistokemiju, najvažnija polazna točka je odabir protutijela. Protutijela svrstavamo u skupinu bjelančevina koje nazivamo imunoglobulinima, a od kojih u krvi razlikujemo: IgG, IgA , IgM ,IgD , IgE. Poliklonska protutijela predstavljaju heterogenu skupinu protutijela budući da ih proizvode različite stanice. Na taj način one su imunokemijski različita i imaju sposobnost vezivanja na različite epitope antigena. Proces proizvodnje protutijela uključuje fazu imunizacije životinje, najčešće zec, određenim antigenom, a nakon sekundarnog imunog odgovora protutijela slijedi izolacija protutijela iz seruma. Monoklonska protutijela su produkti individualnog klona stanica prisutnih u plazmi. Dobivaju se izolacijom limfocita B iz mišje slezene. Nakon toga slijedi fuzija tih limfocita s mijelomskim stanicama, a rezultat je kultura stanica koja omogućuje proizvodnju ovih protutijela u velikim količinama (23).

### **1.5.2. Princip rada**

Odabir protutijela u imunohistokemiji temelji se na specifičnosti antigena i njegovoj vjerojatnosti da će reagirati s njime. Nakon što se tkivo inkubira s potencijalnim protutijelima izazovu se pozitivne reakcije (vezanje antigena-antitijela protiv tumora) koje se identificiraju pomoću nekih detekcijskih sustava. Oni koji imaju najveću osjetljivost koriste sekundarna antitijela , koja su reaktivna protiv primarnog antitijela. Takav sustav je vrlo osjetljiv jer ima mogućnost privrženosti velikog broja enzima, kao npr. peroksidaza, na mjesto antigena (22, 23).



**Slika 9. Indirektna imunohistokemija – osnovni princip**

### 1.5.3 Priprema tkiva za imunohistokemiju

#### 1.5.3.1 Fiksiranje, uklapanje i rezanje tkiva

Nakon samog odabira protutijela važno je fiksirati tkivo kako bi ga u potpunosti sačuvali odnosno kako bi bilo otporno na daljnje promjene. Stoga, fiksiranje tkiva je neophodno za: očuvanje staničnih komponenti, za sprječavanje autolize i raspršivanja staničnih sastojaka, da bi se olakšalo konvencionalno i imunološko bojanje. Za prikaz svih antigena ne postoji univerzalni fiksativ, no većina antigena se može prikazati u tkivu fiksiranom u formalinu i zatim u parafinu. Stoga, karakteristike idealnog fiksativa su: i) očuvanje stanice bez bubrenja, smanjenja ili ikakve deformacije bilo kakve vrste, ii) spriječiti raspadanje stanica koje uzrokuju bakterije ili katepsinom autolize te iii) očuvanje stanica tijekom daljnje obrade bojanja tkiva. Neutralni puferirani formalin ili otopina 10 % formalina u vodi su najčešće korišteni fiksativi bazirani na formalinu.

Nakon fiksacije slijedi uklapanje i rezanja tkiva. Za imunohistokemijsko bojanje najveći dio uzorka tkiva uklapa se u parafin zbog vrlo velike rezolucije i očuvanosti. Parafin je kombinacija parafinskog voska i smola. Kako bi se izbjeglo uklapanje tkivo se

može smrznuti, a tim postupkom tkivo dobije adekvatnu tvrdoću za rezanje. Navedenim postupkom će se mnogo bolje očuvati izražaj antigena i imunoreaktivnost tkiva, no negativna strana smrzavanja je što je slabije očuvana morfologija tkiva. Ako se usporede parafin i smrzavanje može se istaknuti da korištenje smole ima veliku prednost, a to je da manji rezovi ističu bolju morfologiju tkiva i mnogo manje skupljanje tkiva. Fiksativi koji su bazirani na aldehidu, kao npr. formalin stvaraju inter- i intra- veze među proteinima što dovodi da prekrivanja pojedinih antigena te su nedostupni i protutijelo ih ne može prepoznati.

### **1.5.3.2 Razotkrivanje antigena**

Razotkrivanje antigena tijekom pripreme tkiva za imunohistokemiju koristimo kako bi se omogućila reakcija protutijela sa skrivenim antigenima. Među različitim postupcima razotkrivanja antigena najčešće se upotrebljava enzimatska digestija ili razotkrivanje epitopa pomoću topline. Uklanjanje parafina, rehidracija tkiva i ispiranje tkiva u vodi postupci karakteristični za enzimatsku digestiju. Pri inkubaciji od 37° C ili sobnoj temperaturi u otopinu proteaznog pufera i enzima uzorak se uroni. Enzim može razgraditi veze koje su stvorene fiksacijom, time se razotkrije ciljani antigen, a da ga pritom ne razgradi, stoga su uvjeti pod kojim se razotkrivanje antigena izvodi vrlo važni (koncentracije enzima, temperatura i vrijeme trajanja digestije). Pomoću mikrovalne pećnice, autoklava i iskuhavanja stakalca pod visokim tlakom koristi se za razotkrivanje antigena pomoću topline. Veze koje su nastale tijekom fiksacije prilikom povećana temperature pucaju veze između peptida odnosno bjelančevina (23).

### **1.5.3.3 Imunodetekcija antigena**

Za detekcija razotkrivenih antigena mogu se koristiti različite metode uključujući: direktnu, indirektnu, PAP i ABC metoda (27).

#### *a) Direktna metoda*

U ovoj detekcijskoj metodi primarno protutijelo je označeno odnosno na sebi ima vezan enzim koji direktno reagira s ciljnim antigenom. U direktnoj metodi koristi se samo jedno protutijelo, a enzim koji je vezan na protutijelo je najčešće peroksidaza. Prednost ove metode je direktna reakcija s antigenom, postupak je jednostavan i brz zbog korištenja samo jednog protutijela, no nedostatak joj je slabija osjetljivost u usporedbi s ostalim metodama te se ona i iz tog razloga rjeđe koristi.

#### *b) Indirektna metoda*

Kao i kod direktne metode primarno protutijelo se veže na ciljno mjesto odnosno antigen, a zatim slijedi vezivanje sekundarnog protutijela na primarno. Prednosti indirektna metode u odnosu na direktnu metodu je veća osjetljivost jer se vezivanjem sekundarnog protutijela pojačava signal za detekciju. Prilikom odabira sekundarnog protutijela važno je obratiti pozornost da mora biti usmjereno na IgG životinjske vrste u kojoj je primarno protutijelo producirano

#### *c) PAP metoda*

Uvođenjem trećeg sloja protutijela nastaje PAP. Stvaranjem kompleksa peroksidaza-antiperoksid spaja se protutijelo na peroksidazu koje je stopljeno s peroksidazom. Ova metoda ima 100-1000 puta veću osjetljivost jer peroksidaza stvara imunološki kompleks peroksidaza-protutijelo.

#### *d) ABC-metoda*

Ova metoda je najraširenija tehnika u današnje vrijeme. Avid je glikoprotein koji ima četiri vezna mjesta koja na sebe vežu biotin, a može se obilježiti s peroksidazom ili fluorescentnim.

Biotin je vitamin koji na sebe veže male molekule kao i protutijela. U ABC metodi se na sekundarna protutijela veže biotin koji djeluje kao poveznica između sekundarnog i primarnog protutijela i avidin-biotin-peroksidaznog kompleksa. Nakon imunohistokemijskog bojanja obrađeni uzorci se analiziraju svjetlosnim ili fluorescentnim mikroskopom ovisno o tome na koji način je obilježeno sekundarno protutijelo

## **1.6. Elektroforeza i imunodetekcija**

Elektroforeza je gibanje čestica u električnome polju. Ovisno o jačini struje koja ulazi u sustav za elektroforezu, svojstvima čestice uključujući veličinu, naboj prema okolini i oblik te o uvjetima medija u kojem se čestice gibaju (viskoznost, temperatura i ionska jakost) čestice će se gibati određenom brzinom. Najčešće čestice koje se razdvajaju elektroforezom su amfoterne molekule-proteini. Naboj proteina pozitivan ili negativan ovisi stupnju ionizacije funkcionalnih skupina aminokiselina ( $-\text{COOH}$  i  $-\text{NH}_2$ ) pri čemu se pK vrijednosti razlikuju, stoga naboj molekule prema van značajno ovisi o pH sredine u kojoj se molekula nalazi. Elektroforeza je jednostavna, brza i vrlo osjetljiva tehnika koja se može kombinirati s drugim tehnikama molekularne biologije. Njome se razdvajaju proteini kojima je sačuvana nativna struktura te aktivnost proteina. Elektroforetske tehnike mogu se podijeliti na one koje se razdvajaju na temelju jednog fizičkog-kemijskog parametra (jednodimenzijske) te na one koje se razdvajaju proteina uzimajući u obzir dva fizikalno-kemijska parametra (dvodimenzijske) i na one koje za razdvajanje koriste tri parametara. Kod elektroforetskih tehnika nije potrebno pročitati proteine prije razdvajanja u gelu zbog toga što su otporne na kontaminaciju uzrokovane drugim tvarima. Jednodimenzijske tehnike imaju visoku rezoluciju dok dvodimenzijske imaju vrlo visoku rezoluciju razdvajanja.

Uz pomoć metoda bojenja vrlo lako se može odrediti količina proteina, te se oni mogu podvrgnuti daljnjim analizama, a najvažnije, mogu se i identificirati (26,27).

### **1.6.1. Jednodimenzijske tehnike elektroforeze**

Najčešće korištena elektroforetska metoda za analizu proteina je elektroforeza po Laemmli-u poznatija kao natrij dodecil sulfat–poliakrilamid gel (SDS-PAGE) elektroforeza. Uloga SDS je da uz dodatak otopine za razaranje disulfidnih veza, da se proteinu denaturiraju i disociraju te razdvoje u separatne polipeptidne lance. Elektroforetsko razdvajanje ovisi o efektivnom promjeru molekule, a rezultat o učinku sita u gelu (25). U puferu pomoću kojeg se nanose uzorci nalazi se  $\beta$ -merkaptotanol i SDS koji se dodatno zagrijava na termobloku i na taj način denaturira. U omjeru 1,4 SDS/g, SDS se veže na proteine kako bi se jednoliko rasporedio negativni naboj te se na kraju dobiva konstantan omjer mase/naboja. U sastavu gela također se nalazi i SDS. Za praćenje tijeka elektroforeze i njezin napredak služi bromfenol dok glicerol povećava viskoznost uzorka i omogućuje olakšani nanos u jažicu. SDS elektroforeza spada u diskontinuirani oblik elektroforeze zbog toga proteini prolaze kroz dva gela koja se razlikuju u gustoći i pH vrijednosti. Sabijajući gel sabire uzorak u jednu vrpču, koja potom prolazi kroz razdvajajući gel te slijedi razdvajanje na temelju molekularne mase (29).

### **1.6.2. Izoelektrično fokusiranje**

Izoelektrično fokusiranje (IEF) je metoda za razdvajanje proteina uz kontinuirani pH gradijent, a na temelju vlastitog naboja. Proteini putuju kroz nosač sve dok ne postignu zonu s vrijednošću pH pri kojoj izgube neto naboj i tada dostižu „nultu migraciju“. IEF metoda



omogućava razdvajanje smjese proteina čije se izoelektrične točke razlikuju za svega 0-0,2 pH jedinice. Za uspostavljanje gradijenta pH za IEF najpogodnija je ugradnja niskomolekularnih amfolita u gel. Amfoliti su zwitter ioni niske molekulske mase. Gelovi sadrže amfolite koji prilikom električnog polja stvaraju linearni pH gradijent. Sve dok se ne postigne odgovarajući pI, amfoliti migriraju u električnom polju (26,27).

### **1.6.3. Dvodimenzionalne tehnike**

Upotrebom jednodimenzijskih tehnika mogu se razdvojiti složeni uzorci na čak do sto diskretnih područja, no ukoliko je broj proteina u uzorku veći tada jednodimenzijska tehnika nije dovoljna. Zatim drugo ograničenje kod jednodimenzijskih tehnika, proteini se razdvajaju na osnovu samo jednog od svojih fizikalnih–kemijskih svojstva. Najpopularnija metoda, 2-DE elektroforeza koja se najčešće predstavlja kombinaciju izoelektričnog fokusiranja denaturiranih proteina i SDS–PAGE elektroforeza. Ovom metodom se proteini razdvajaju uz pomoć dvaju svojstva – naboja i veličine.

### **1.6.4. Metode vizualizacije**

Nakon razdvajanja proteina u gelu potrebno ih je vizualizirati . Najpoznatija tehnika koja se temelji na uporabi nepolarnih sulfatiniranih Coomassie boja. Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 se najčešće primjenjuje, ona se u kiseloj sredini uz pomoć elektrostatskih sila veže na amino-skupine proteina. Vrijeme koje je potrebno da se gel oboji ovisno je o debljini gela, u prosjeku oko 2 sata. Potrebno je odbojiti gel uz pomoć metanola i octene kiseline 24 sata kako bi se vizualizirale proteinske pruge. Nakon postupka odbojavanja proteini su vidljivi kao tamne pruge na bezbojnoj pozadini. Da bi se mogli vizualizirati proteini potrebno nanijeti

veliku količinu proteina što predstavlja nedostatak ove metode. Tehnika utemeljena na bojanju gelova srebrovim nitratom ( $\text{AgNO}_3$ ) je znatnije osjetljivija od CBB te može detektirati 0,1 g proteina po vrpici. Gel je potrebno isprati s otopinom etanola s ciljem da se uklone ostaci Tris, SDS i glicina iz gela. Metoda bojenja srebrom zahvaća redukciju ionskog u metalno srebro. Kao nedostatak ove metode je pozadinsko bojenje, slaba reproducibilnost te slabo bojenje nekih proteina. Treća metoda vizualizacije je uporaba fluorescentnih boja. Boja se razvija nakon izlaganja izvoru standardnog UV-transluminatora ili transluminatora s plavim svjetlom. Fluorescentne boje su vrlo kompatibilne s tehnikama spektrometrije masa, no imaju vrlo visoku cijenu boja i transluminatora. Daljnja analiza proteina iziskuje poseban uređaj za izrezivanje proteina iz gela.

#### **1.6.5. Prijenos proteina i imunodetekcija**

Razdvojeni proteini iz gela se prenose na površinu tankog nosača npr. (nitrocelulozna membrana) uz pomoć razvoja tehnike Western blotting. Proteini su fiksirani na površini membrane i tako su lako dostupni za analizu npr. (ligandima ili protutijelima). Uz pomoć okomitog električnog polja koji se primjenjuje na ravninu gela postiže se prijenos proteina s poliakrilamidnih gelova na površinu membrane. Takva vrsta prijenosa naziva se „elektroprijenos“. Među prednostima ističu se: visoka rezolucija složenih smjesa proteina, jednostavna i brza tehnika te omogućuje rad s malim količinama proteina (20). Western blot spada u analitičke metode koje se koriste za otkrivanje specifičnog proteina u određenom uzorku. Ova metoda još se naziva i imuno-analiza proteina. Iz uzorka proteini razdvoje natrij dodecilsulfat-elektroforezom u poliakrilamidom gelu uz pomoć svoje molekulske mase i prenesu na nitroceluloznu membranu, sintetsku, najlonsku ili polivinil difluoridne (PVDF) membranu nakon čega slijedi izlaganje specifičnom primarnom protutijelu. Sekundarno antitijelo veže se na primarno antitijelo, a uočava se kao tamna linija na mjestu specifičnog

vezanja (28). S obzirom na vrstu i veličinu proteina postoje dva tipa prijenosa proteina iz gela na membranu. Prvi je mokri transfer koji se izvodi u vertikalnoj kadici ispunjenoj puferom te se koristi za razdvajanje hidrofobnih ili velikih proteina te traje u razmaku od 1 do 16 h uz primjenu konstantnog napona. Drugi oblik transfera je polusuhi prijenos koji se izvodi u horizontalnim uređajima gdje nisu potrebne velike količine pufera. Polusuhi prijenos karakterističan je za hidofilne proteine ili proteine malih masa, u trajanju od 2 h pri konstantnoj jačini struje. Uporaba nitrocelulozne membrane se najčešće rabi zbog niske cijene te ima mogućnost vezanja visokog kapaciteta proteina, te druga vrsta PVDF membrane. Blokiranje membrane ima vrlo važnu ulogu nakon prijenosa proteina jer se blokiraju mjesta na membrani i na taj način se nespecifično vezanje protutijela na membranu ili na druge proteine reducira na najmanju moguću mjeru. Ukoliko blokiranje nije dostatno dolazi do pozadinskog bojenja, no ukoliko je blokiranje prejako dovodi do smanjenja signala. Uporabom različitih agensa primjerice bezmasno mlijeko u prahu, deterdžent Tween 20 i albumina govedeg seruma (BSA) provodi se blokiranje. Nakon provedenog postupka može se krenuti sa postupkom detektiranja proteina uz pomoć specifičnih protutijelom. U cilju detekcije pripremi se otopina primarnog protutijela u kojoj se membrana za koju se vezani proteini inkubira uz konstantno miješanje, a nakon toga slijedi inkubacija s sekundarnim protutijelom čija je uloga da prepozna molekulu IgG iz vrste u kojoj je proizvedeno primarno protutijelo. Među enzima ističu se alkalna fosfataza i peroksidaza iz hrena koja se koriste za kolometrijsku ili kemilumiscencijsku reakciju (26).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Obzirom na pokazanu protuupalnu i antioksidativnu ulogu KGK pretpostavka istraživanja je da KGK ima utjecaja na razvoj i intenzitet upalnog procesa te da bi se mogla koristiti u terapiji upalne bolesti crijeva.

Cilj i svrha predloženog istraživanja je ispitati utjecaj KGK na kliničku manifestaciju i intenzitet kolitisa izazvanog primjenom natrijevog dekstran sulfata (DSS).

Kako bismo testirali postavljenu hipotezu specifični ciljevi jesu:

1. temeljem lokalnih i sistemskih parametara pratiti i usporediti razvoj i intenzitet kolitisa u miševa kod kojih je primjenom otopine DSS izazvan kolitis te u skupini miševa kod kojih je uz DSS primijenjena i KGK.
2. odrediti i usporediti proteinski izražaj p-IkBa i NF-κB p65 podjedinice u debelome crijevu miševa kod kojih je primjenom otopine DSS izazvan kolitis te u skupini miševa kod kojih je uz DSS primijenjena i KGK.

### **3.MATERIJALI I METODE**

#### **3.1 Protokol izazivanja kolitisa i primjene klorogenične kiseline**

U istraživanju su korišteni C57BL/6 miševi uzgojeni u uzgojnom centru Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Pokusni model kolitisa izazvan je primjenom 2,5 % otopine DSS kroz sedam dana. KGK se primjenjivala per os u dozi od 100 mg/kg ili 200 mg/kg, jedanput dnevno od trećeg dana pokusnog perioda do žrtvovanja. Kontrolne skupine životinja su tijekom pokusnog perioda konzumirale tekuću vodu *ad libitum*.

#### **3.2. Procjena uspostave kolitisa i uzimanje uzoraka**

Procjena uspostave kolitisa pratila se na dnevnoj bazi temeljem pojavnosti i intenziteta markera upalnog procesa: konzistencija stolice, tjelesna težina, opće stanje životinje i pojave krvi u stolici odnosno vidljivog krvarenja u području rektuma. Prisustvo krvi u stolici dokazano je uz pomoć Hemocult II SENSE testa (Beckman Coulter, USA). Svaki od navedenih parametara je bodovan prema kriterijima navedenim u tablici 5. te je zbrajanjem pojedinih bodova određen ukupni zbroj bodova odnosno indeks aktivnosti bolesti.

Nakon žrtvovanja izolirano je tkivo debelog crijeva od cekuma do završnog dijela, rektuma. Tkivo je izvagano i određena mu je dužina, a nakon što je isprano u fiziološkoj otopini, podijeljeno je u nekoliko dijelova. U svrhu pripreme histoloških preparata, jedan do dva uzorka su, narezani na manje dijelove te uronjeni u 4 % paraformaldehid, a preostali uzorci debelog crijeva su, do daljnjih analiza, smrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni na -80 °C.

### **3.3. Hematoksilin-eozin bojanje tkivnih preparata**

Parafinski blokovi tkivni preparati crijeva odnosno kolona su obojeni hematoksilin-eozinom (HE). Hematoksilin kao boja služi za bojanje kiselih struktura u stanici odnosno kromatina i jezgre pri čemu ih boja u ljubičasto-plavo. Eozin kao druga komponenta ovog bojanja boji bazične strukture, citoplazmu u crveno. Prije samog bojanja tkivni preparati se moraju deparafinirati te se stoga tkivni preparati na predmetnim stakalcima uranjaju u otopinu ksilola 3 puta po 5 minuta. Nakon deparafinizacije tkiva se moraju rehidrirati, kako bi postigli rehidraciju tkiva preparati se moraju uranjati u otopinu etanola s opadajućim koncentracijama (dva puta po 100 %, 90 %, 70 % te 50 %) kroz 4 minute. Nakon rehidracije slijedi ispiranje preparata u destiliranoj vodi kroz 4 minute, a zatim bojanje s otopinom hematoksilina kroz 4 minute. Nakon prvog bojanja preparati se ispiru pod mlazom tekuće vode kroz 15 minuta te se diferenciraju u otopini HCl-etanola (100 ml 70 %-nog etanola i 0,5 ml HCl) kroz 2 sekunde i zatim opet slijedi ispiranje pod mlazom tekuće vode kroz 10 minuta te uranjanje u destiliranu vodu kroz 3 minute. Potom slijedi drugo bojanje s otopinom eozina u trajanju od 3 minute, a nakon toga uranjanje u destiliranu vodu 3 puta po 5 minuta. Nakon bojanja provodi se proces suprotan rehidraciji odnosno tkivni preparati se uranjaju u otopine etanola s rastućim koncentracijama (70 %, dva puta 96 % te dva puta 100 %) kroz 30 sekundi. Poslije dehidracije slijedi uranjanje u ksilol 3 puta po 5 minuta. Potom se predmetna stakalca s obojenim preparatima suše na sobnoj temperaturi. na kraju se obojani preparat prekrije pokrovnim stakalcem.

### **3.4. Priprema tkivnih preparata i imunohistokemijsko bojanje**

U fazi pripreme tkiva za imunohistokemijsko bojanje provode se postupci deparafinizacija i rehidracije koji su opisani u poglavlju 1.5. Nakon rehidracije slijedi ispiranje u destiliranoj

vodi 2 puta po 3 minute, te zatim se tkivni preparati uranjaju u PBS kroz 5 minuta. Nakon ispiranja slijedi faza razotkrivanja antigena koja se provodi u mikrovalnoj pećnici na 800 W u citratnom puferu (pH = 6,0). Tijekom kuhanja u mikrovalnoj pećnici potrebno je provjeravati nivo otopine kako bi se spriječilo isparavanje tekućine. Nakon zagrijavanja slijedi hlađenje kroz 20 minuta, a zatim ispiranje destiliranom vodom 2 puta po 3 minute. Potom se tkivni uzorci ispiru u TBS-u kroz 5 minuta. Sljedeći, vrlo važan korak je blokiranje endogene peroksidaze koji se odvija u otopini koja se sastoji od 35 ml metanola, 35 ml PBS-a i 1,2 ml 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kroz 35 minuta. Nakon blokiranja endogene peroksidaze slijedi ispiranje tkivnih preparata sa PBS-om 2 puta po 5 minuta. Nakon ispiranja dodaje se serum iz životinje u kojoj su proizvedena sekundarna protutijela (engl. *normal goat serum*) ili 5 % otopina BSA, 150 µl po uzorku kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela. Nakon dodatka seruma ili BSA, tkivni preparati se ne ispiru nego se na njih dodaje primarno protutijelo. U ovom je istraživanju korišteno primarno zečje poliklonsko NF-κB p65 (1:1000, ab7970) protutijelo u razrjeđenju 1:100. Tkivni preparati inkubirali su se s primarnim protutijelima tijekom noći na temperaturi +4 °C u vlažnoj komori. Sljedećeg dana, tkivni preparati se ispiru u PBS-u 3 puta po 5 minuta, a zatim se dodaje odgovarajuće sekundarno protutijelo u razrjeđenju 1:200, te inkubira kroz 30 do 45 minuta na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori. U ovom su istraživanju korištena sljedeća sekundarna protutijela: sekundarno kozje protu-mišje Ig protutijelo, proizvođača *BD Pharmigen* te sekundarno kozje protu-zečje IgG protutijelo proizvođača *Abcam Inc.* Zatim su preparati ispirani u PBS-u 3 puta po 5 minuta, te potom inkubirani s preparatom streptavidina na koji je vezan enzim peroksidaza kroz 45 minuta u vlažnoj komori. Nakon toga slijedi ispiranje s PBS-om 3 puta po 5 minuta. Kromogen DAB se koristi za vizualizaciju pozitivnih dijelova stanica. Inkubacija s kromogenom traje od 20 sekundi do jedan minute. Mikroskopom se provjerava je li razina vizualizacije zadovoljavajuća. Potom se tkivni preparati ispiru kroz 10 minuta u tekućoj vodi pa zatim u

destiliranoj vodi kroz 5 minuta. Slijedi bojanje s hematoksilinom kroz 15 sekundi zbog kontrastiranja boje, te ispiranje tekućom vodom kroz 10 minuta i destiliranom vodom kroz 5 minuta. Sljedeći korak je dehidracija u otopini etanola rastućih koncentracija kroz 3 minute. Nakon dehidracije preparati se uranjaju u ksilol 3 puta po 5 minuta, te na kraju pokrivaju pokrovnim stakalcima.

### **3.5. Homogenizacija tkiva i određivanje koncentracije proteina**

Tkivo debelog crijeva homogenizirano je u RIPA puferu nakon čega je uslijedilo centrifugiranje. Nastali supernatant je izdvojen i alikvotiran te pohranjen na  $-80^{\circ}\text{C}$  do daljnjih analiza. Ukupnu koncentraciju proteina u homogenatu tkiva odnosno izdvojenom supernatantu odredila se s bicinkoninskom kiselinom ili BCA (engl. *bicinchoninic acid assay*) metodom. Određivanje koncentracije proteina ovom metodom temelji se na stvaranju kompleksa između  $\text{Cu}^{2+}$  iona i proteina u alkalnim uvjetima, a zatim slijedi redukcija  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^{+}$  pri čemu nastaje ljubičasto obojenje. Koncentracija proteina je proporcionalna intenzitetu nastale boje koja se mjeri pomoću spektrofotometra određivanjem apsorbancije na 562 nm.

### **3.6. Razdvajanje proteina i imunodetekcija NF- $\kappa$ B**

Nakon određivanja koncentracije proteina pripremljeno je 50  $\mu\text{g}$  proteina za nanošenje na poliakrilamidni gel te razdvajanja proteina u 12 % poliakrilamidnom gelu debljine 0,75 mm. Elektroforeza proteina odvijala se pod utjecajem električnog polja jakosti 100 V u denaturirajućim uvjetima u prisutnosti detergenta. Nakon završene elektroforeze, prenijela sam proteine s gela na pozitivno nabijenu membranu pod utjecajem električnog polja. Prijenos proteina se provodio pri 17 V u vremenskom razdoblju od 45 minuta. Učinkovitost prijenosa provjerila se bojanjem membrane bojom Ponceau S. Nakon prijenosa proteina s gela na membranu, membranu se inkubirala blokirajućom otopinom, 5 % nemasnim mlijekom



otopljenom u Tris-puferu uz dodatak Tween-20 deterdženta, u periodu od 30 minuta. Nakon inkubacije membrane s blokirajućom otopinom, pripremila sam primarno protutijelo u odgovarajućem razrjeđenju i inkubirala membranu s primarnim protutijelom (fosforiliran-IkBa, razrjeđenje 1:500, Cell Signaling, 5A5) 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije s primarnim protutijelima membrana se ispirala tri puta po 5 min otopinom za ispiranje te je zatim uslijedila inkubacija s otopinom sekundarnog protutijela koje sam pripremila u razrjeđenju 1:2000. Membranu se inkubirala sa sekundarnim protutijelom u trajanju od 1 sat na tresilici na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije membrane sa sekundarnim protutijelom membranu se, ponovno, ispirala tri puta otopinom za ispiranje, svako pranje u trajanju od 5 minuta. Sdetekcija signala provela se uz pomoć SignalFire Elite ECL Reagent i skenera (Alliance 4.0, Cambridge, UK). U postupku je korišteno i kontrolno protutijelo  $\beta$ -actin (1:10000, ab8226).

### **3.7. Etički aspekt istraživanja na eksperimentalnim životinjama**

Istraživanja provedena na pokusnim životinjama provedena su uz poštivanje važećih Zakonskih propisa (NN19/99), te Pravilnika (NN176/04), uz poštivanje temeljnih etičkih i znanstvenih principa o provođenju pokusa na životinjama, a sve u skladu s načelima 3R (1. nadomještanje životinja – engl. Replacement, 2. smanjenje broja životinja – engl. Reduction i 3. oplemenjivanje postupaka prema životinjama – engl. Refinement). Predloženo istraživanje dio je istraživanja koje se provodi u sklopu znanstvenoistraživačkog projekta „Uloga dipeptidil-peptidaze IV (DPP IV/CD26) u kroničnim bolestima“ te je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

### **3.8. Statistička obrada podataka**

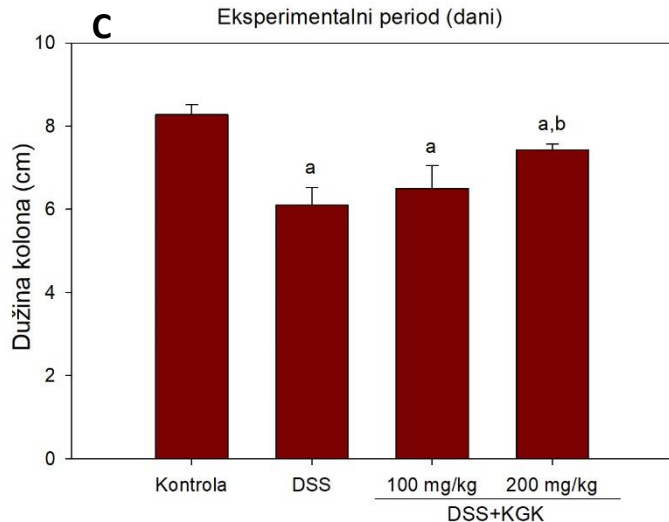
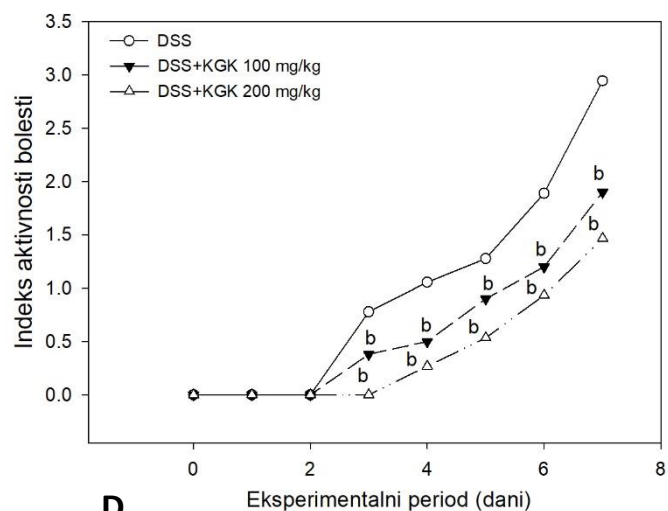
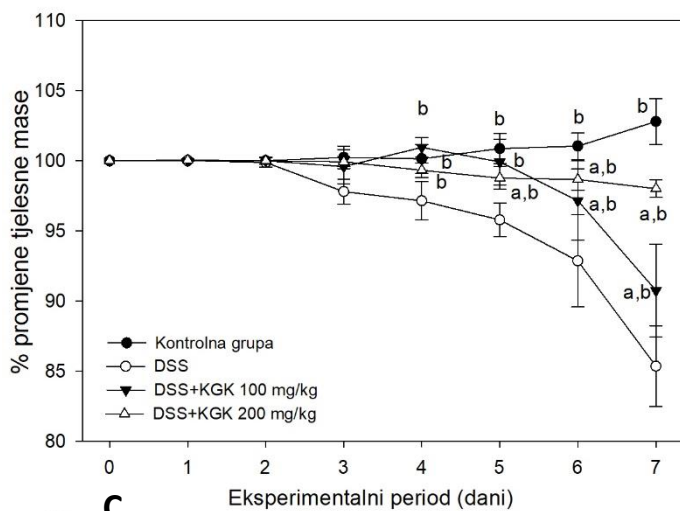
Koristeći program Microsoft Excell brožčani rezultati su pohranjeni su u bazu podataka. Statistička obrada podataka učinjena je korištenjem programskog paketa STATISTICA 10 (Stat Soft Inc.; Tulsa, OK 74104, SAD). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD) za pojedinu grupu. Postojanje statistički značajne razlike između ispitivanih grupa testirane su Student t testom ili neparametrijskim Mann-Whitney U testom. Razina od  $P < 0,05$  smatrala se statistički značajnom. Rezultati su prikazani grafički i tabelarno.

## **4. REZULTATI**

### **4.1. Klinička manifestacija i procjena aktivnosti kolitisa izazvanog primjenom DSS otopine**

Pregled i procjena općeg stanja svake pojedine pokusne životinje učinjen je svakog dana tijekom pokusnog razdoblja, od dana aplikacije do žrtvovanja. Oralna primjena 2,5 % DSS otopine tijekom 7 dana rezultirala je pojavom kliničkih simptoma, makroskopskih i mikroskopskih promjena kao rezultat razvoja i progresije upale odnosno bolesti. Napredovanjem upalnog procesa, zabilježen je postupni gubitak tjelesne mase u svih skupina ispitivanih miševa. U skupini kod koje je primijenjena samo otopina DSS uočen je značajan pad tjelesne mase u odnosu na sve ispitivane skupine miševa (slika 10A). U skupini miševa kod kojih se uz DSS primijenila KGK gubitak tjelesne mase bio je značajno manji nego u skupini kod kojih je primijenjen samo DSS, a posebno je to bilo izraženo u skupini životinja koja tijekom pokusnog perioda primala KGK u dozi od 200 mg/kg.

Tijekom razvoja upalnog procesa, kolitisa, osim gubitka tjelesne mase, i drugi klinički znakovi, uključujući rektalno krvarenje i promjena konzistencije stolice postaju sve izraženiji u svih ispitivanih skupina miševa. U skladu s navedenim i indeks aktivnosti bolesti se povećavao pogoršanjem kliničke slike odnosno jačanjem upale. Također, kao i u slučaju tjelesne mase indeks aktivnosti se smanjio primjenom KGK kako u dozi od 100 mg/kg tako i u dozi od 200 mg/kg (slika 10B).



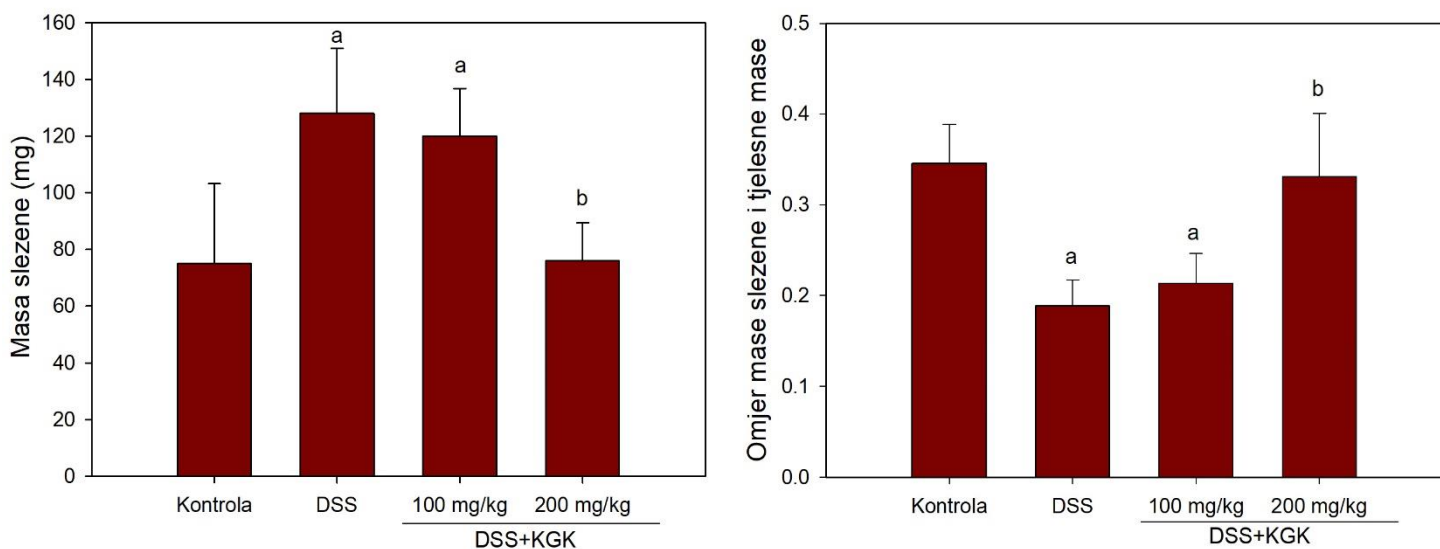
**Slika 10. Utjecaj klorogenične kiseline (KGK) na kliničku manifestaciju i aktivnost kolitisa izazvanog primjenom natrijevog dekstran sulfata (DSS)**

A) Promjena tjelesne mase izražena kao prosječni postotak početne tjelesne mase  $\pm$  SD. B) Indeks aktivnosti bolesti izračunat prema opisu navedenim u materijalima i metodama C) Prikaz promjene dužine debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa i primjena KGK D) Reprezentativne makroskopske slike kolona kontrolne skupine i tretiranih životinja u akutnoj fazi upale. a-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu b- statistički značajna razlika u odnosu na DSS skupinu miševa. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD izuzev promjene tjelesne mase. n = 6 miševa /skupina.

Prilikom žrtvovanja, svakoj se pokusnoj životinji izdvojio dio debeloga crijeva od cekuma do anusa te mu je pritom izmjerena i dužina. Dužina debelog crijeva predstavlja lokalni parametar koji nam indirektno govori o intenzitetu upalnog procesa. Promjene na razini debeloga crijeva prikazane su grafički i slikovno (Slika 10C i D). Kako je vidljivo na slici 10C u skupini miševa koji su primili samo otopinu DSS došlo je do najjačeg skraćanja debelog crijeva dok je u skupinama kod kojih je primijenjena KGK u kombinaciji s otopinom DSS skraćenje je prisutno ali je manje nego u DSS otopini i ovisno je o primijenjenoj dozi. Stoga je značajna promjena u skraćanju crijeva zabilježena u skupini koja je primila KGK u dozi od 200 mg/kg.

Nadalje, kao indirektni pokazatelj upale pratila se i promjena mase slezene te omjer mase slezene i tjelesne mase (Slika 11). Primjena DSS bez dodatka KGK rezultiralo je povećanjem mase slezene koje je bilo značajno u odnosu na kontrolnu skupinu. Zanimljivo, pad mase slezene je bio izraženiji prilikom primjene KGK u dozi od 200 mg/kg. U toj dozi zabilježena masa slezene gotovo je identična s masom kontrolne skupine životinja, a značajno niža od mase slezene zabilježene u životinja koji su primili dozu od 100 mg/kg KGK. Omjer mase i slezene u skladu je s promjenama mase slezene te je značajno snižen u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu miševa koji su tijekom pokusnog perioda primali 100 mg/kg KGK.

Kod kontrolnih skupina miševa oba soja, koje su tijekom pokusnog razdoblja konzumirale tekuću vodu, nije zabilježen niti jedan od prethodno navedenih simptoma.

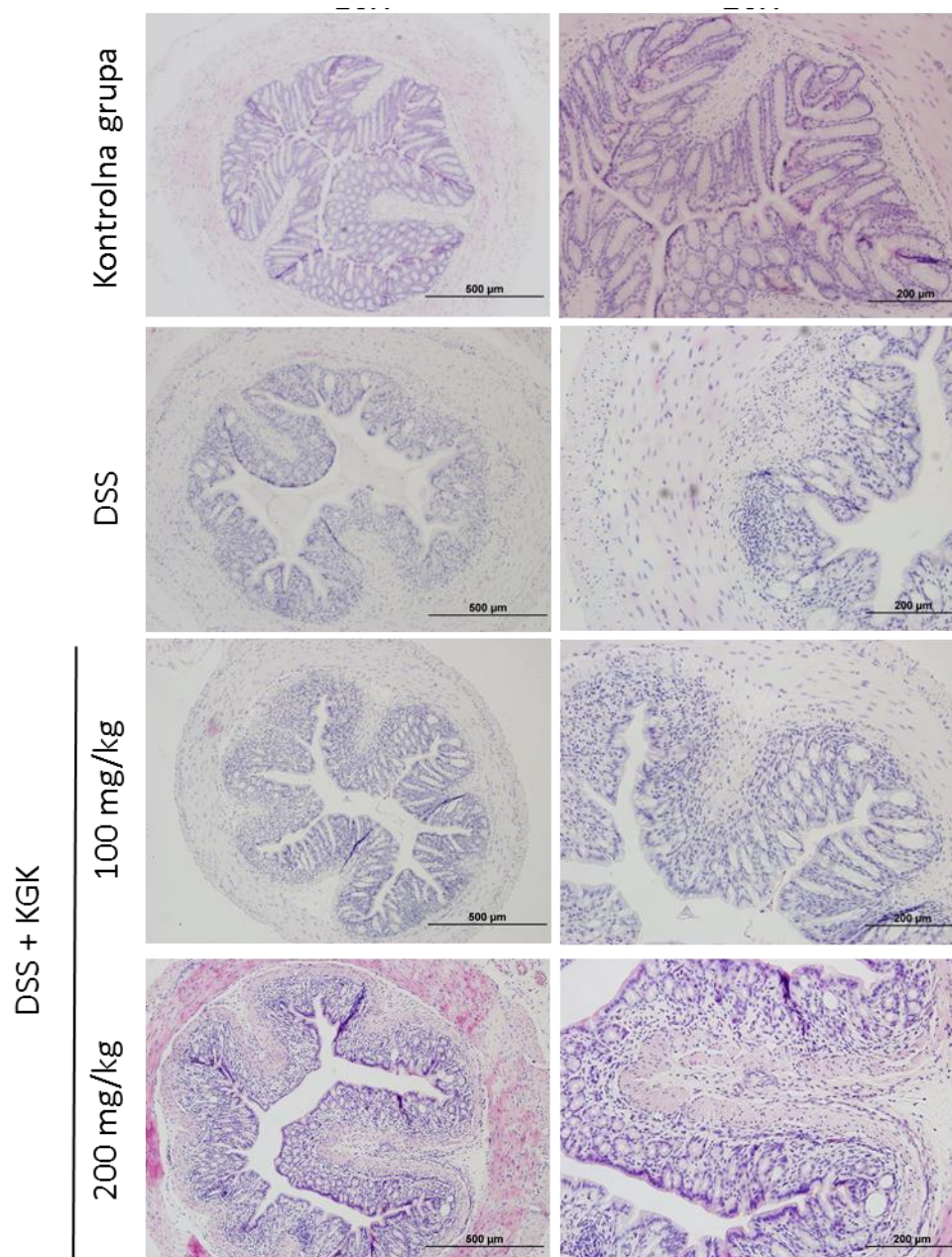


**Slika 11. Utjecaj klorogenične kiseline (K GK) na masu slezene tijekom kolitisa izazvanog primjenom natrijevog dekstran sulfata (DSS)**

DSS tretirani miševi žrtvovani su sedmog dana pokusnog perioda. K GK primjenjivala se jednom dnevno od trećeg dana pokusnog perioda do žrtvovanja, *per os* u dozi od 100 mg/kg i 200 mg/kg. Kontrolna skupina je pila tekuću vodu tijekom pokusnog perioda. a-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu b-statistički značajna razlika u odnosu na DSS skupinu miševa. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. n = 6 miševa /skupina.

## **4.2. Patohistološke promjene sluznice crijeva tijekom kolitisa izazvanog primjenom DSS otopine**

Na slici 12. izdvojene su reprezentativne fotomikrografije histoloških preparata kontrolnog, zdravog tkiva debelog crijeva, te DSS posredovanog patohistološke promjene uz primjenu ili bez primjene KGK. U skupinama kod kojih je primjenjena samo otopina DSS može se uočiti smanjenje širine kripta s fokalnim područjima u kojima je prisutan edema i infiltracija upalnih stanica, pretežito polimorfonuklearnih i mononuklearnih, u vezivnom tkivu *lamine propriae* i submukozi. Isto tako, proboj stanica u mukozi *lamine muscularis* uglavnom može vidjeti, također i žarišna područja transmuralne raspodjele stanica. Patohistološki gledano vrlo slične promjene prisutne su i skupini miševa kod kojih je uz DSS primjenjena i KGK u dozi od 100 i 200 mg/kg. Međutim, u skupinama kod kojih je primjenjena KGK intenzite prethodno navedenih promjena je smanjen.



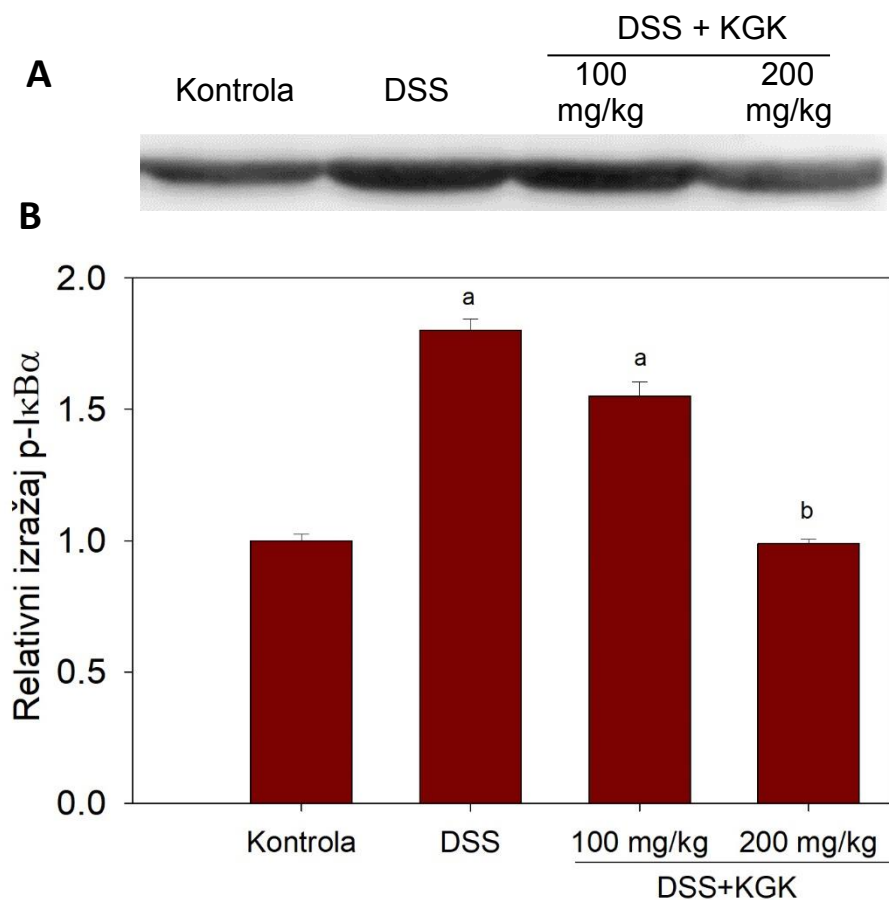
**Slika 12. Utjecaj klorogenične kisline (KGK) na patohistološke promjene sluznice debelog crijeva u kolitisu izazvanom primjenom natrijevog dekstran sulfata (DSS)**

Reprezentativne slike hematoksilinom i eozinom obojenih preparata koji prikazuju upalne promjena nastale kao rezultat primjene DSS otopine u C57BL/6 životinjama. Izvorno uvećanje,  $\times 10$  (lijevi niz) i  $\times 20$  (desni niz).  $n = 6$  miševa/ skupina.



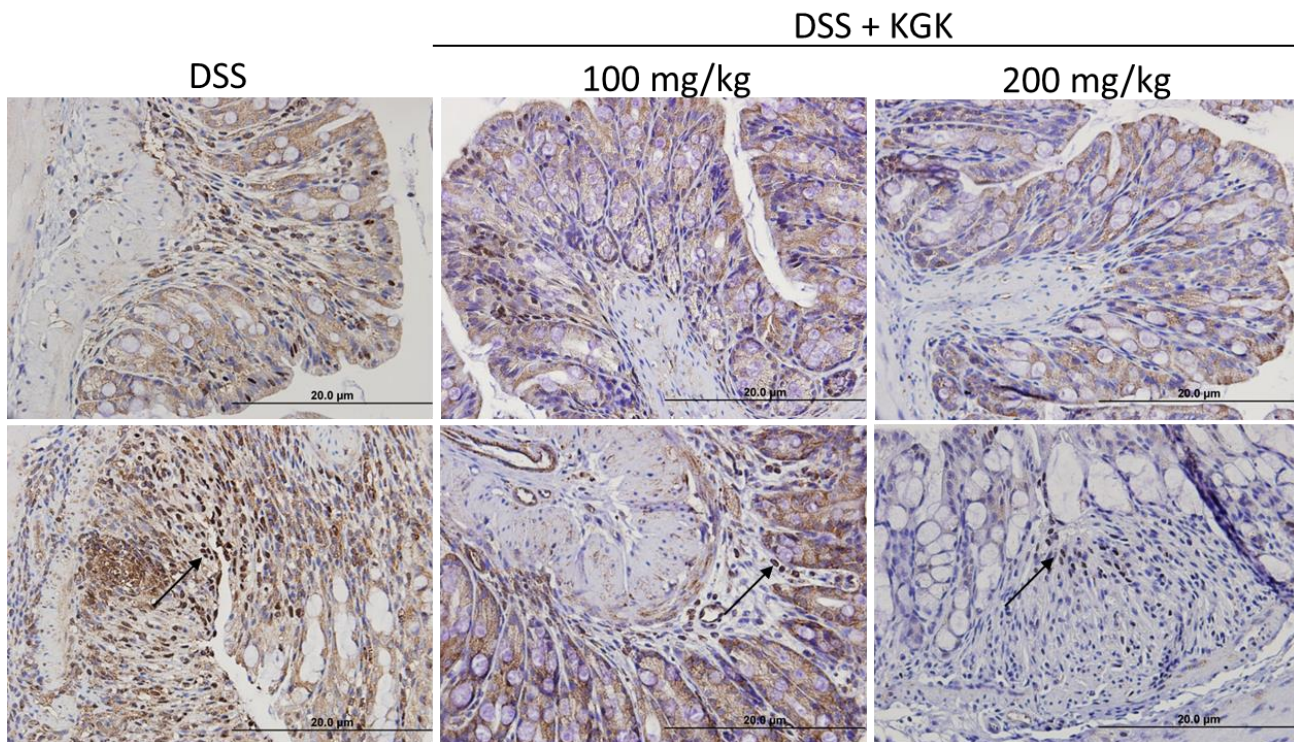
### **4.3. Promjene izražaja NF- $\kappa$ B i p-I $\kappa$ B $\alpha$ u tkivu debeloga crijeva tijekom kolitisa izazvanim primjenom DSS otopine**

Promjene izražaja p-I $\kappa$ B $\alpha$  proteina u tkivu debelog crijeva prikazane su na slici 13. Rezultati ukazuju da je izražaj ispitivanog proteina značajno povećan u skupini miševa koji su tijekom sedam dana pili samo DSS otopinu te u skupini koja je uz DSS otopinu primala i KGK i to u dozi od 100 mg/kg. Nadalje, možemo uočiti da u skupini miševa koji su uz DSS primali KGK u dozi od 200 mg/kg vrijednost odnosno relativni izražaj p-I $\kappa$ B $\alpha$  je gotovo identičan vrijednostima zabilježenim u kontrolnoj skupini životinja. Potonja vrijednost p-I $\kappa$ B $\alpha$  je značajno niža u odnosu na vrijednost zabilježena u DSS skupini miševa. S druge strane, imunohistokemijsko određivanje NF- $\kappa$ B na parafinskim rezovima pokazalo je povećan izražaj ovog proteina u tkivu debelog crijeva u skupinama miševa kod kojih je primjenjena samo DSS otopina (Slika 14). Imunohistokemijska analiza pokazala je i da je u miševa kod kojih je primjenjena samo DSS otopina vidljiv je povećan izražaj NF- $\kappa$ B u jezgri. U skupinama miševa kod kojih je uz DSS primjenjena i KGK došlo je do povećanja izražaja ali on nije bio izražen kao kod skupine ispitivanih životinja kod kojih je primjenjena samo DSS otopina. Nadalje, KGK je utjecala i na smanjenje izražaja ovog proteina u jezgri.



**Slika 13. Utjecaj klorogenične kiseline (KGK) na izražaj p-IκBα proteina u tkivu debeloga crijeva tijekom kolitisa izazvanog primjenom natrijevog dekstran sulfata (DSS)**

A) Reprezentativni prikaz izražaja p-IκBα u debelom crijevu B) Relativan izražaj p-IκBα proteina u tkivu debelog crijeva. a-značajno u odnosu na kontrolnu skupinu, b- statistički značajno u odnosu na DSS skupinu miševa. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. n = 6 miševa /skupina.



**Slika 14. Utjecaj klorogenične kiseline (KGK) na izražaj NF- $\kappa$ B u tkivu debelog crijeva tijekom kolitisa izazvanog primjenom natrijevog dekstran sulfata (DSS)**

Reprezentativne slike izražaj i distribucija NF- $\kappa$ B u akutnoj fazi kolitisa. Izražaj NF- $\kappa$ B utvrđen je imunohistokemijskim bojanjem parafinskih tkivnih rezova sluznice debelog crijeva nakon primjene DSS otopine ili DSS otopine uz dodatak KGK u dozi od 100 mg/kg i 200 mg/kg. Strelica označava pozitivno obojane jezgre stanica. Izvorno uvećanje,  $\times 40$ . n = 6 miševa/ skupina.

## 5. RASPRAVA

Upala je složen proces koji se razvija kao reakcija na različite endogene i/ili egzogene podražaje koji dovode do narušavanja homeostaze tkiva. Prilikom napredovanja upalnog procesa dolazi do privlačenja upalnih stanica kao što su monociti koji u tkivu dozrijevaju do aktivnih makrofaga i mastocita. Obje vrste stanica proizvode i ispuštaju upalne posrednike citokinine, kemokinine, histamin i slične bioaktivne tvari koje privlače druge upalne stanice. Uz makrofage, u upalom promijenjenom mikrokolišu možemo naći i stanice poput dendritičkih, NK stanica, leukocite neutrofile, euzinofile i limfocite. Najznačajniji upalni čimbenici koji dovode do pokretanja i nakupljanja upalnih stanica na mjestu upale su MCP-1, čimbenik rasta krvožilja (VEGF, engl. *Vascular endothelial growth factor*), te čimbenici stimulacije rasta kolonija (CSF-1, engl. *Colony stimulator factor 1*) (6, 17, 20).

Značajan doprinos u razjašnjavanju imunopatofiziologije UBC su pokusni modeli koji svojim kliničkim simptomima, histološkim i promjenama u imunosnom odgovoru nalikuju humanim oblicima bolesti. Do danas je razvijen velik broj životinjskih modela koji služe upravo proučavanju UBC-a. Istraživanja provedena na životinjama dala su značajan doprinos ne samo detaljnijem definiranju mehanizama patogeneze UBC-a, već su i doprinijeli razvijanju novih terapijskih strategija. DSS se u ovom istraživanju koristio kao egzogeni čimbenik koji svojim djelovanjem na epitelne stanice sluznice debelog crijeva narušava prethodno spomenutu homeostazu tkiva te se kao posljedica razvija upalni proces. Promjene nastale primjenom otopine DSS svojim kliničkim i patohistološkim karakteristikama nalikuju humanom obliku ulceroznog kolitisa te stoga ovaj DSS inducirani kolitis predstavlja dobar model za proučavanje etiopatogeneze potonje bolesti (21). Razvoj upalnog procesa odnosno ulceroznog kolitisa uslijed djelovanja otopine DSS potvrđen je rezultatima dobivenim ovim istraživanjima. Na lokalnoj razini, pokazano je mikroskopski oštećenje sluznice crijeva, a makroskopski promjena dužine crijeva. Na sistemske razini došlo je do smanjenja tjelesne

mase, razvoja proljeva te pojava krvi u stolici što je identično simptomima humanog oblika UK. Svi simptomi su se smanjili prilikom primjene KGK što upućuje na zaključak da KGK ima pozitivan učinak u sprečavanju razvoja intenziteta kolitisa. Budući da smo dokazali da KGK usporava razvoj i smanjuje težinu kliničke slike kolitisa postavlja se pitanje mehanizma djelovanja KGK.

NF- $\kappa$ B je protein prisutan u stanici u neaktivnom obliku, za svoju aktivaciju treba druge proteine. Postoji nekoliko signalnih putova koji dovode do aktivacije NF- $\kappa$ B ali najčešći je klasični put aktivacije. Kao što je u uvodu navedeno NF- $\kappa$ B se nalazi u citoplazmi udružen s I $\kappa$ B $\alpha$ , a proces aktivacije NF- $\kappa$ B započinje njihovim razdvajanjem odnosno razgradnjom kompleksa. Da bi došlo do razdvajanja kompleksa podjedinica I $\kappa$ B mora proći kroz proces kovalentne modifikacije odnosno u ovom slučaju će doći do njene fosforilacije. Fosforilacijom I $\kappa$ B $\alpha$  podjedinice dolazi do degradacije kompleksa, oslobađanja NF- $\kappa$ B i njegovog ulaska u jezgru stanice. Rezultat ulaska u jezgru stanice je pokretanje transkripcije specifičnih pro-upalnih gena (7). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem potvrđuju prethodno. Razvojem upalnog procesa odnosno primjenom samo DSS otopine u ispitivanim skupinama miševa došlo je do pojačanog izražaja fosforiliranog oblika p-I $\kappa$ B $\alpha$  podjedinice što je dokaz oslobađanja NF- $\kappa$ B iz kompleksa. Nadalje, pojačan izražaj p-I $\kappa$ B $\alpha$  podjedinice prisutan je i prilikom primjene KGK kiseline međutim, vidljivo je da se povećanjem doze smanjuje izražaj p-I $\kappa$ B $\alpha$ . temeljem navedenog možemo zaključiti da tijekom DSS kolitisa dolazi do aktivacije NF- $\kappa$ B te da KGK ima inhibicijski učinak na njegovu aktivaciju.

Obzirom na dosadašnje spoznaje smatra se da NF- $\kappa$ B može djelovati u održavanju i/ili pojačavanju upalnog procesa. Pokazano je da inhibicija NF- $\kappa$ B u razvojnoj fazi upale može produžiti postojanje upalnih promjena i time spriječiti ispravno ozdravljenje tkiva (25, 28). Rezultati dobiveni uspostavom životinjskih modela upale crijeva i ozljeda pokazuju da NF- $\kappa$ B ima višestruke učinke međutim ti učinci su često oprečni te se još uvijek nije u potpunosti

razjasnila uloga NF- $\kappa$ B u razvoju upale odnosno UK. Kao i kod životinjskih modela tako i kod humanog oblika upalne bolesti crijeva pokazana je aktivacija NF- $\kappa$ B. Rezultati dosadašnjih istraživanja upućuju na zaključak da uvjeti mikrookoliša utječu na konačni učinak NF- $\kappa$ B u organizmu odnosno na mjestu upale. Rezultati ovog istraživanja odnosno imunohistokemijska analiza izražaja NF- $\kappa$ B u tkivu debeloga crijeva potvrđuju pojačan izražaj NF- $\kappa$ B u skupini miševa koji su primila samo DSS otopinu. Također, identično kao u slučaju aktivacije p-I $\kappa$ B izražaj NF- $\kappa$ B u tkivu debelog crijeva smanjio se primjenom KGK posebno primjenom doze od 200 mg/kg.

Pokazano se da je aktivacija NF- $\kappa$ B potrebna za preživljavanje makrofaga i da inhibicija NF- $\kappa$ B aktivnosti rezultira apoptozom makrofaga. Naša prethodna istraživanja pokazala su da se broj makrofaga u sluznicu debelog crijeva povećava u akutnoj fazi kolitisa, a aktivacija p65 podjedinice NF- $\kappa$ B prikazane ovdje dodatno podupire njihovu ulogu kao važnih posrednika (32). Nadalje, u bolesnika oboljelih od upalnih bolesti crijeva pokazano je da makrofagi koji imaju povećan izražaj NF- $\kappa$ B proteina istovremeno imaju veći kapacitet proizvodnje proupalnih citokina odnosno TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-1 (28). Ovim saznanjima podupire se prethodno spomenuta pretpostavka da NF- $\kappa$ B ima važnu ulogu u kontroli lučenja proupalnih citokina koji utječu na intenzitet oštećenja tkiva. Također, saznanja vezana uz NF- $\kappa$ B potvrđuju njegovu indirektnu ulogu u održavanju odnosno pojačavanju upalnog procesa. S druge strane, smanjenje izražaja NF- $\kappa$ B i p-I $\kappa$ B uslijed primjene KGK upućuje na mehanizam djelovanja KGK kojim ona ostvaruje svoj protupalni učinak.

Iako je poprilično jasno da u razvoju upalnih bolesti crijeva NF- $\kappa$ B izražen na makrofagima ima proupalnu ulogu uloga izražaja ovog proteina na epitelnim stanicama sluznice crijeva je poprilično nejasan odnosno kontraverzan. Postoje dokazi da je NF- $\kappa$ B u kombinaciji s IL-6 uključen u pro-upalni odgovor ali s druge strane pokazano je da specifična inhibicija NF- $\kappa$ B na epitelnim stanicama vodi ka spontanom razvoju teške upalne bolesti

crijeva. Nadalje, pokazano je da delecija I $\kappa$ B $\alpha$  podjedinice vodi ka smanjenoj proizvodnji limfopoetina, oslabljenom odgovoru na patogenom uzrokovanim Th2 odgovor što olakšava razvoj infekcija.

Na kraju možemo zaključiti da je NF- $\kappa$ B ključan faktor u razvoju upalnog procesa i da lijekovi koji vode ka inhibiciji ovog čimbenika važni u liječenju upalne bolesti crijeva. Međutim, potrebno je uzeti u obzir da nam je NF- $\kappa$ B ključan u nekim fiziološkim procesima poput razvoja limfocita, borba protiv nekih bakterija te u razvoju karcinom. Stoga, u cilju da se spriječi razvoj nuspojava potrebno je inhibirati NF- $\kappa$ B na lokalnoj razini, odnosno na mjestu upale (31). Ovo je istraživanje prvi dokaz djelovanja KGK putem inaktivacije transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B u modelu DSS potaknutog ulceroznog kolitisa te su stoga daljnja istraživanja potrebna kako bi se razjasnili mehanizmi djelovanja KGK.

## 6. ZAKLJUČAK

Iz rezultata dobivenih ovim istraživanjem proizlaze sljedeći zaključci:

1. Peroralna primjena DSS otopine potaknula je razvoj kolitisa, a bolest se klinički manifestirala smanjenjem tjelesne mase i mase slezene te duljine debeloga crijeva u svim ispitivanim skupinama miševa.
2. Primjena KGK utjecala je na kliničku prezentaciju UK te su se njenom primjenom simptomi bolesti te intenzitet bolesti smanjili, a promjene pokazuju ovisnost o primijenjenoj dozi KGK.
3. Utvrđen je povećan izražaj NF- $\kappa$ B p65 podjedinice i p-I $\kappa$ B $\alpha$  u upalno promijenjenom tkivu debeloga crijeva na proteinskoj razini u skupinama životinja kod kojih je primijenjena samo DSS otopina.
4. Primjena KGK značajno je utjecala na izražaj NF- $\kappa$ B p65 podjedinice i p-I $\kappa$ B $\alpha$  u upalno promijenjenom tkivu, a promjene izražaja su obrnuto proporcionalne s dozom KGK.
5. Rezultati upućuju na zaključak da primjena KGK tijekom razvoja kolitisa ima zaštitnu ulogu u smislu brzine razvoja i intenziteta upalnog procesa.
6. Saznanja dobivena ovim istraživanjem vode ka novim istraživanjima mehanizama djelovanja KGK u procesu modulacije upalnog odgovora i terapije UK.



## 7. LITERATURA

1. Tomac I, Šeruga M; Electrochemical properties of Chlorogenic Acids and determination of their content in coffee using differential pulse voltammetry; International journal of electrochemical science; 11 January 2016.
2. Liang N, Kitts D; Role of Chlorogenic Acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions 2015; PMC National.
3. Luongo de Matos L, Truffelli DC, Luongo de Matos MG i Aparedcida da Silva Pinhal M; Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice; Biomarker Insights 2010.
4. Naved M, Hejazi V, Abbas M. i dr; Chlorogenic acid (CGA): a pharmacological review and call for further resarch; Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018; 97:67-74
5. Ma Y, Gao M, Liu D; Chlorogenic acid improves high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice; Pharm. Res. 2015;32:1200–9.
6. Medzhitov R; Origin and physiological roles of inflammation; Nature 2008;454:428–35.
7. Lawrence T; The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation; Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2009, 1.
8. Shan J, Fu J, Zhao Z, Kong X, Huang H, Luo L, Yin Z; Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF-κB and JNK/AP-1 activation; Int. Immunopharmacol. 2009;9:1042–48.
9. Zatorski H, Sałaga M, Zielińska M, Piechota-Polańczyk, Lewandowska U; Experimental colitis in mice is attenuated by topical administration of chlorogenic acid; Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2015, 388, 643–651.

10. Chauhan PS, Satti NK, Sharma VK, Dutt P, Avtar K, Bani; Amelioration of inflammatory responses by chlorogenic acid via suppression of pro-inflammatory mediators; *J. Appl. Pharm. Sci.* 2011;1:67–75.
11. Khaitan, Dental Institute, RIMS, Ranchi, Bhattacharya PT, Sarjug Dental college Darbhanga; Principle and techniques of immunohistochemistry, January 2015-12.
12. Levine A, Griffi A, Markowitz J i dr; Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease; the Paris classification; *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 1314-21
13. Dignass A, Eliakim R, Magro F i dr; Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis Part 1: Definitions and diagnosis. *J Crohn's Colitis* 2012;6:965-990.
14. Truelove SC, Witts LJ; Cortisone in ulcerative colitis; Final report on a therapeutic trial, *Br Med J* 1955;2:1041-8.
15. D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG. i dr; A review of activity indices and efficacy and points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis; *Gastroenterology* 2007;132:763-86.
16. Škunca Ž; Prognostički utjecaj NF-κB ekspresije kod podskupina difusnog B-velikostaničnog limfoma; *Acta Med Croatica* 2015;69:25-32.
17. Vragović J; Upalne bolesti crijeva; završni rad 2015.
18. Vuković D; Zdrastvena njega bolesnika oboljelih od ulceroznog kolitisa; završni rad 2016
19. Henderson P, Van Limbergen JE, Schware J i dr; Function of the intestinal epithelium and it's dysregulation in inflammatory bowel disease; *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:382-95

20. McDonlad TT, Monteleone I, FantiniI MC i sur.; Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine; Gastroenterology 2011;140:1768-75.
21. Derežić I; Inducirani animalni modeli u fiziologiji i imunologiji; seminarski rad 2015
22. Vukoja N, Hančić S, Korać P; Razvoj metoda imunohistokemijskog bojenja i optimizacija protokola za detekciju transkripcijskog faktora BACH2.
23. Bucat; Imunohistokemijsko prikazivanje molekula signalnog puta GABA-e izvan središnjeg živčanog sustava; diplomski rad
24. Tak PP, Firestein GS; NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases; The journal of clinical investigation 2001 Jan 1; 107(1):7-11
25. Liu T, Zhang L, Donghyun J, Shao-Cong S; NF- $\kappa$ B signaling in inflammation; Signal Transduction and Targeted Therapy (2017).
26. Balen B; Promjene u ekspresiji biljnih proteina izazvane nanočesticama srebra; Educ. biol., 2016;2:115-131
27. Cebalo LJ; Imunoreakcije uzrokovane infekcijom virusima Hantaan i Andes u MRC-5 i HEK 293 stanicama; doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu (2007.)
28. Lawrence T; The Nuclear Factor NF- $\kappa$ B Pathway in Inflammation; PubMed; 2009 Dec
29. Marušić M, i dr; Upalne bolesti crijeva od etiologije do terapije; Monografija za liječnike
30. A. Butoraci i dr; Analytical methods in food forensics; Croatian Journal of Food Technology Biotechnology and Nutrition 2013;8 (3-4), 90-101.
31. Atreya I, Atreya R, Neurath MF; NF-kappaB in inflammatory bowel disease; J Intern Med. 2008;263:591-6.

32. Detel D, Pugel EP, Pucar LB, Buljevic S, Varljen J; Development and resolution of colitis in mice with target deletion of dipeptidyl peptidase IV. *Exp Physiol.* 2012;97(4):486-96

## **8. PRILOZI**

### **8.1. Popis slika**

**Slika 1.** Strukturna formula klorogenične kiseline

**Slika 2.** Prikaz apsorpcije klorogenih kiselina u gastrointestinalnom sustavu

**Slika 3.** Prikaz zahvaćenosti tankog i debelog crijeva u Crohnovoj bolesti i ulceroznom kolitisu

**Slika 4.** Prikaz lokalizacije upalnih promjena sluznice gastrointestinalnog trakta u ulceroznom kolitisu podjedinice p50 i p65

**Slika 5.** Prikaz promijenjene sluznice u ulceroznom kolitisu

**Slika 6.** Endoskopski prikaz zdrave i upalom zahvaće sluznice debelog crijeva

**Slika 7.** Struktura NF- $\kappa$ B/DNA kompleksa. Transkripcijski čimbenik NF- $\kappa$ B sastoji se od dvije

**Slika 8.** Kanonski i alternativni aktivacijski putevi transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B

**Slika 9.** Indirektna imunohistokemija – osnovni princip

**Slika 10.** Utjecaj klorogenične kiselina (KGK) na kliničku manifestaciju i aktivnost kolitisa izazvanog primjenom natrijevog dekstran sulfata (DSS)

**Slika 11.** Utjecaj klorogenične kiselina (KGK) na masu slezene tijekom kolitisa izazvanog primjenom natrijevog dekstran sulfata (DSS)

**Slika 12.** Utjecaj klorogenične kiseline (KGK) na patohistološke promjene sluznice debelog crijeva u kolitisu izazvanom primjenom natrijevog dekstran sulfata (DSS)

**Slika 13.** Utjecaj klorogenične kiseline (KGK) na izražaj p-I $\kappa$ B $\alpha$  proteina u tkivu debeloga crijeva tijekom kolitisa izazvanog primjenom natrijevog dekstran sulfata (DSS)

**Slika 14.** Utjecaj klorogenične kiseline (KGK) na izražaj NF- $\kappa$ B u tkivu debeloga crijeva tijekom kolitisa izazvanog primjenom natrijevog dekstran sulfata (DSS)

## 9. ŽIVOTOPIS

### OSOBNJE INFORMACIJE

Franović Barbara

📍 Ferenci 11b, 51216 Viškovo (Hrvatska)

📞 0981384497

✉ franovic.barbara@gmail.com

### OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

06/10/2014–danas **Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarnog inženjerstva**  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

06/09/2010–16/05/2014 **SSS - Opća gimnazija**  
Prva sušačka hrvatska gimnazija u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

01/09/2004–03/07/2008 **Osnovna glazbena škola**  
Glazbena škola Ivan Matetić Ronjgov, Rijeka, Rijeka (Hrvatska)  
Svladano znanje i vještina sviranja glasovira.

10/09/2001–18/06/2010 **Osnovna škola**  
Osnovna škola Čavle, Rijeka (Hrvatska)

### OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

#### Strani jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	B2	B2	B2	B2	B2
njemački	B2	B2	B2	B2	B2

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik

Zajednički europski referentni okvir za jezike

**Komunikacijske vještine** Sklonost timskom radu, komunikativna te ljubazna osoba

#### Poslovne vještine

- odgovorna i ambiciozna
- poštena
- želja za uspjehom i napretku u učenju

- motivirana za kvalitetno izvršavanje zadataka

#### Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Iskusni korisnik

#### Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu

Vozačka dozvola B

#### DODATNE INFORMACIJE

Priznanja i nagrade

1. Dječiji festival "Volim glasovir" - 2.3.2005 - osvojena I. nagrada A kategorije
5. Školsko natjecanje "Volim glasovir" - 8.10.2006 - osvojena II. nagrada A kategorija
6. Školsko natjecanje "Volim glasovir" - 27.2.2008 - osvojena II. nagrada C kategorije