

# Uloga i mehanizam djelovanja luteolina u kolitisu

---

Varda, Sara

Master's thesis / Diplomski 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:184:930017>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Sara Varda

ULOGA I MEHANIZAM DJELOVANJA LUTEOLINA U KOLITISU

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Sara Varda

ULOGA I MEHANIZAM DJELOVANJA LUTEOLINA U KOLITISU

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

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

Diplomski rad obranjen je dana 29. rujna 2022. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u

Rijeci, pod povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Lara Batičić
2. Prof. dr. sc. Ester Pernjak Pugel
3. Izv. prof. dr. sc. Dijana Detel

Rad ima \_\_47\_\_ stranica, \_\_11\_\_ slika, \_\_1\_\_ tablica, \_\_34\_\_ literaturnih navoda.



## **SAŽETAK**

**UVOD:** Ulcerozni kolitis (UK) je kronična upalna bolest koja zahvaća gastrointestinalni sustav, a čija incidencija je u konstantnom porastu i time predstavlja važan javnozdravstveni problem. Upalni proces zahvaća sluznicu debelog crijeva, a bolest karakteriziraju razdoblja remisije i pogoršanja. Čimbenici kao što su genetska predispozicija, imunološki sustav, mikroorganizmi, te čimbenici okoliša povezuju se s nastankom UK. Unatoč brojnim istraživanjima etiopatogeneza nije razjašnjena. Istraživanja, kako epidemiološka tako i eksperimentalna, pokazala su povezanost između luteolina, prevencije i razvoja kroničnih bolesti. Pokazano je da luteolin ima široki spektar bioloških učinaka uključujući antioksidacijsko, protuupalno i antitumorsko ali je njegova uloga i mehanizam djelovanja u UK slabo istražena.

**CILJ:** Cilj rada je ispitati utjecaj luteolina na tijek razvoja UK te ispitati ulogu signalnog puta posredovanog izvanstaničnim signalima reguliranih kinaza (ERK) u mehanizam djelovanja luteolina i terapiji UK.

**MATERIJALI I METODE:** Istraživanje je provedeno na eksperimentalnom modelu kolitisa. U istraživanju tijekom razvoja kolitisa procijenio se temeljem kliničkih parametara te stupnja oštećenja na razini tkiva debelog crijeva. Izražaj proteina određen je Western blot metodom, a ERK inhibitor primjenjen je kako bi se ispitala uloga ERK signalne molekule u razvoju kolitisa.

**REZULTATI:** Luteolin je ublažio kliničke simptome kolitisa i smanjio intenzitet upalnog procesa u debelom crijevu. Luteolin aktivira ERK protein. Primjena ERK inhibitora pogoršava kliničke simptome kolitisa i smanjuje učinak luteolina.

**ZAKLJUČAK:** Istraživanjem je pokazan protuupalni i antiapoptotski učinak luteolina koji je posredovan ERK signalnim putem.

**KLJUČNE RIJEČI:** Ulcerozni kolitis, luteolin, ERK, Western blot

## **SUMMARY**

**INTRODUCTION:** Ulcerative colitis (UC) is an inflammatory disease that affects the gastrointestinal system. Since the incidence constantly increasing the UC represents an important public health problem. The inflammatory process affects the mucous membrane of the large intestine and disease is accompanied by periods of remission and aggravation. Factors such as genetic predisposition, the immune system, microorganisms, and environmental factors are associated with the onset of UC. Despite numerous pieces of research, etiopathogenesis has not been clarified. Research, both epidemiological and experimental, have shown a connection between luteolin, prevention and development of chronic diseases. Luteolin has been shown to have a wide range of biological effects including antioxidant, antiinflammatory, and antitumor but its role and mechanisms of action in the UC are poorly researched.

**OBJECTIVE:** The work aims were to examine the influence of luteolin on the development of UC and to examine the role of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) signaling molecule in the mechanism of action of luteolin and therapy of UC.

**MATERIALS AND METHODS:** The research was conducted on an experimental model of colitis. The course of development of colitis was assessed based on clinical parameters, and the degree of colon tissue damage. The expression of the investigated proteins was determined by the Western blot method. By inhibition of the ERK signaling molecule its role, during colitis development, was investigated.

**RESULTS:** Luteolin alleviated the clinical symptoms of colitis and reduced the intensity of the inflammatory process in the colon. Luteolin activates the ERK protein. The use of ERK inhibitors worsens the clinical symptoms of colitis and reduces the effect of luteolin.

**CONCLUSION:** The research demonstrated the anti-inflammatory and antiapoptotic effect of luteolin, which is mediated by the ERK signaling pathway.

**KEY WORDS:** Ulcerative colitis, luteolin, ERK, Western blot



# SADRŽAJ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA RADA .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1. ULCEROZNI KOLITIS .....  | 1         |
| 1.1.1. POVIJEST .....   | 3         |
| 1.1.2. EPIDEMIOLOGIJA .....   | 4         |
| 1.1.3. PATOHISTOLOŠKE PROMJENE TIJEKOM RAZVOJA ULCEROZNOG KOLITISA .....  | 4         |
| 1.1.4. KLINIČKA SLIKA .....   | 5         |
| 1.1.5. DIJAGNOZA .....  | 7         |
| 1.1.6. TERAPIJSKI POSTUPCI .....  | 8         |
| 1.2. EKSPERIMENTALNI MODELI UPALNIH BOLESTI CRIJEVA.....  | 9         |
| 1.2.1. Potaknuti modeli kolitisa .....  | 9         |
| 1.3. FLAVONOIDI.....  | 11        |
| 1.3.1. LUTEOLIN.....  | 12        |
| 1.3.2. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE LUTEOLINA .....  | 13        |
| 1.3.3. PROTUUPALNO DJELOVANJE LUTEOLINA .....   | 14        |
| 1.3.4. PRIMJENA LUTEOLINA U ULCEROZONOM KOLITISU .....  | 15        |
| <b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>  | <b>17</b> |
| <b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>   | <b>18</b> |
| 3.1. PRIMARNA I SEKUNDARNA PROTUTIJELA.....   | 18        |
| 3.2. EKSPERIMENTALNI MODEL KOLITISA I UZORCI ZA ISTRAŽIVANJE .....  | 19        |
| 3.3. PRIPREMA I PRIMJENA LUTEOLINA I ERK INHIBITORA.....  | 20        |
| 3.4. UKLAPANJE TKIVA DEBELOG CRIJEVA U PARAFIN I BOJANJE HEMATOKSILIN-EOZINOM.....  | 22        |
| 3.5. IZRAČUN MIKROSKOPSKOG INDEKSA OŠTEĆENJA TKIVA DEBELOG CRIJEVA .....  | 23        |
| 3.6. IZOLACIJA I ODREĐIVANJE IZRAŽAJA PROTEINA .....  | 24        |
| 3.7. ETIČKI ASPEKT ISTRAŽIVANJA NA EKSPERIMENTALNIM ŽIVOTINJAMA .....   | 26        |
| 3.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....   | 26        |
| <b>4. REZULTATI.....</b>  | <b>27</b> |
| 4.1. LUTEOLIN UTJEČE NA INTENZITET UPALNOG PROCESA TIJEKOM RAZVOJA KOLITISA .....   | 27        |
| 4.2. LUTEOLIN UTJEČE NA IZRAŽAJ ERK1/2 PROTEINA U DEBELOM CRIJEVU TIJEKOM RAZVOJA KOLITISA .....                                | 29        |
| 4.3. INHIBITOR ERK1/2 SIGNALNOG PUTA UTJEČE NA INTENZITET UPALNOG PROCESA I DJELOVANJE LUTEOLINA TIJEKOM RAZVOJA KOLITISA ..... | 30        |

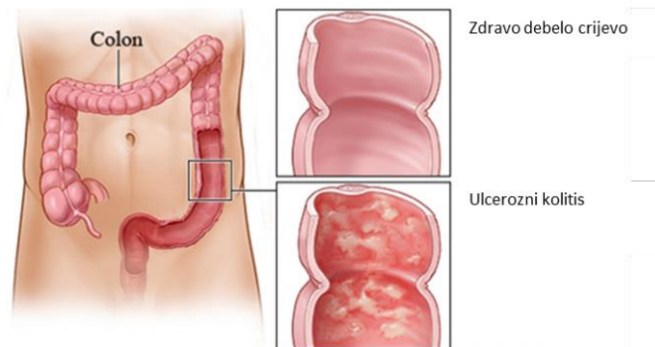
|  |           |
|--|-----------|
| 4.4. INHIBICIJA ERK1/2 SIGNALNOG PUTA SMANJUJE ZAŠTITNO DJELOVANJE LUTEOLINA TIJEKOM RAZVOJA KOLITISA..... | 32        |
| 4.5. INHIBICIJA ERK SIGNALNOG PUTA SMANJUJE UTJECAJ NA IZRAŽAJ PROTEINA .....                              | 34        |
| <b>5. RASPRAVA .....</b>   | <b>36</b> |
| <b>6. ZAKLJUČAK.....</b>   | <b>40</b> |
| <b>7. LITERATURA .....</b>   | <b>41</b> |
| <b>8. PRILOZI.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>ŽIVOTOPIS.....</b>  | <b>46</b> |

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA RADA

Dosadašnje spoznaje ukazuju da se u podlozi mnogih bolesti nalazimo tri ključna čimbenika, genetska predispozicija, imunosni poremećaj i upalni proces. Za Chronovu bolest i ulcerozni kolitis (UK), dugi niz godina se smatra da se radi o kroničnom upalnom procesu gastrointestinalnog sustava koji se razvija kao posljedica interakcije prethodno spomenutih čimbenika. U skladu s navedenim smatra se da se one razvijaju kao rezultat neprimjerenog imunosnog odgovora na intestinalnu mikrobiotu u genetski predisponiranog domaćina. Ako se ove dvije bolesti usporede prema patomorfologiji naići ćemo na mnoge različitosti. Međutim, ako usporedimo njihovu epidemiologiju i kliničku sliku onda pronalazimo mnoge sličnosti. Tijekom povijesti podjela upalnih bolesti crijeva nije se značajno mijenjala, a danas je ona malo detaljnija budući da se osim dva osnovna patomorfološka oblika navode i drugi oblici kao što je nedeterminirani ili nediferencirani kolitis te pouchitis. U slučaju kada se na temelju fizičkog pregleda, kliničke slike, kao i općenito cjelokupne dijagnostike ne može ustvrditi radi li se o Chronovoj bolesti ili UK postavlja se dijagnoza nedeterminiranog kolitisa. Tijek bolesti je nepredvidiv, a terapijske su preporuke teške.

## 1.1. ULCEROZNI KOLITIS

Levine i sur. (1) su UK opisali kao upalni proces koji zahvaća debelo crijevo te napreduje prema ili do završnog dijela sluznice debelog crijeva odnosno rektuma. Širenje upalnog procesa je kontinuirano, a za razliku od Chronove bolesti, zahvaćena je samo sluznica i upala se ne širi u dublje slojeve stijenke debelog crijeva. Zbog kroničnog upalnog procesa i intenzivne obnove sluznice postoji veliki rizik za razvoj karcinoma debelog crijeva.



Slika 1. Ulcerozni kolitis (2)

U definiranju postotka zahvaćenosti debelog crijeva upalnim procesom koriste se različiti termini. Prema Montrealskoj klasifikaciji iz 2005. godine nailazimo na različite stupnjeve zahvaćenosti debelog crijeva (3)

- Ulcerozni proktitis i proctosigmoiditis
- Lijevostrani UK (proširenost na kolon distalno od lijenalne fleksure) ili distalni kolitis
- Ekstenzivni odnosno prošireni kolitis (proširenost proksimalno od lijenalne fleksure, uključuje i pankolitis)

U slučaju kada je upalom zahvaćen kolon cijelom svojom dužinom onda govorimo o pankolitisu, a ukoliko je zahvaćeno samo područje rektuma onda se to opisuje kao ulcerozni proktitis (slika 2). Naziv distalni kolitis ili proktosigmoiditis koristi se u slučaju kada je upala proširena unutar dosega vidljivosti sigmoidoskopa odnosno negdje do polovine sigme. Lijevostrani UK definira se kao bolest proširena na dio debelog crijeva najbliže slezeni.



Proktitis 32%    Lijevostrani kolitis 27%    Pankolitis 41%

Slika 2. Prikaz proširenosti upale sluznice debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa (4)

Kako bismo odredili stupanj bolesti prema kliničkoj slici, u obzir uzimamo aktivnost UK te na temelju kliničkih kriterija i endoskopske aktivnosti, bolest definiramo kao blagu, umjerenu, tešku i remisiju UK (5). Danas je poznato da se stupanj intenziteta bolesti može izračunati i izraziti kao indeks aktivnosti, a jedan od poznatijih indeksa koji se vrlo često primjenjuje u kliničkoj praksi je Truelove Witts indeks (6). Kada želimo definirati odnosno učiniti ukupnu procjenu koja uključuje aktivnost i proširenost bolesti koristi se Mayo kliničko-endoskopski indeks (7).

### 1.1.1. POVIJEST

Kao jedan od prvih koraka prilikom prepoznavanja upalne bolesti crijeva, svakako je bilo otkriće električnog sigmoidoskopa u 19. stoljeću. Otkriće ovog uređaja omogućilo je promatranje unutrašnjosti crijeva što je uvelike rezultiralo prepoznavanjem Chronove bolesti i UK u 20. stoljeću. Samuel Wilks bio je jedan od prvih koji je 1895. godine UK prepoznao i opisao kao novi entitet te je time tvrdnja da je uzrok UK bacilarna dizenterija odbačena. Kada govorimo o prvim simptomima i detaljnijem opisu tijekom bolesti, njih je prvi opisao Hawkins 1909. godine (8).

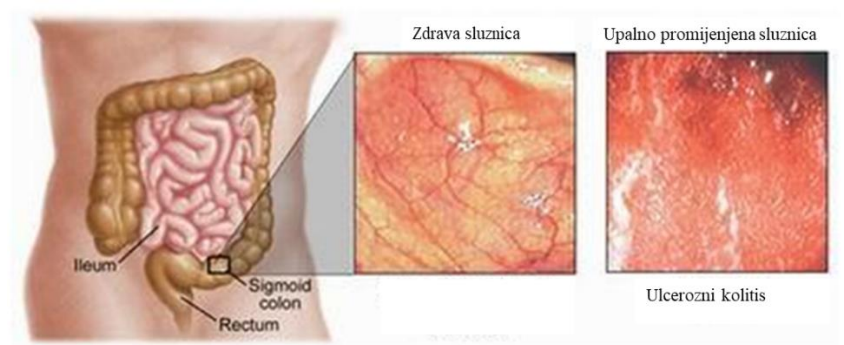
### 1.1.2. EPIDEMIOLOGIJA

Kada je riječ o incidenciji UK ona je učestalija u zemljama kojima je infrastruktura razvijenija te se kreće stopom od 0,6 - 24,5 na 100 000 stanovnika godišnje. Broj novooboljelih u Hrvatskoj u korelaciji je s prosječnom incidencijom zemalja s visokim stupnjem razvijenosti, a iznosi oko 11/100 000 stanovnika godišnje. Kada govorimo o dobnim skupinama u kojima se UK pojavljuje, pokazano je da je bolest karakterističnija je za osobe u dobi od 20-40 godina, ali i kod osoba u starijoj dobi odnosno od 60-80 godina. UK je bolest koja se češće javlja kod muškaraca, ali i u osoba s pozitivnom obiteljskom anamnezom. Epidemiološke studije ukazuju da je rizik za oboljevanjem od UK, u prvoj generaciji srodnika, 1,6%. U slučaju kada je kod oba roditelja dijagnosticirana bolest kod djece se povećava rizik da obole čak za 30%. Kako je u uvodnom dijelu naglašeno, smatra se da djelovanje okolišnih i genetskih faktora uvelike rezultira reakcijom imunološkog sustava te da veći doprinos kod nastanka UK imaju genetskih čimbenici s postotkom od 40%. Upravo iz ovog razloga, UK se svrstava se u poligensku bolest. Također, valjalo bi spomenuti kako i pušenje ima pozitivan učinak u razvoju UK, a ono se objašnjava kao pojačano izlučivanje sluzi koja ima zaštitnu ulogu (9).

### 1.1.3. PATOHISTOLOŠKE PROMJENE TIJEKOM RAZVOJA ULCEROZNOG KOLITISA

Tijek bolesti započinje na način da se upala prvo javlja na samom rektumu, a zatim se širi proksimalno. Najčešće je upalom zahvaćena sluznica, ali može biti zahvaćena i podsluznica debelog crijeva. Intenzitet promjena na razini sluznice ovisan je o dužini trajanja upalnog procesa odnosno bolesti. Ako se radi o blagom stadiju upale, sluznica je u tom slučaju granulirana, eritematozna uz mogućnost nastanka spontanog krvarenja. S druge strane, ukoliko se radi o težoj

varijanti upale, sluznica je hemoragična, edematozna, a ono karakteristično je pojava ulceracija. Upravo zbog ovih razlika na sluznici, prilikom dodira jasno se može razlučiti radi li se o zdravoj ili upalno promijenjenoj sluznici debelog crijeva. Ukoliko se radi o aktivnom obliku upale, postoji mogućnosti nastanka polipa, dok u stadiju remisije sluznica naizgled može biti normalna, ali je vrlo često blijeda i atrofična, posebno ako je u pitanju dugi tijek bolesti.



Slika 3. Promjene sluznice tijekom razvoja ulceroznog kolitisa (8)

#### 1.1.4. KLINIČKA SLIKA

Kada je riječ o kliničkoj slici UK ona ovisi o organizmu svakog pojedinca pa sukladno tome i varira. Postoji mogućnost varijacije kliničke slike i u istog bolesnika, a sve ovisno o kojem je stadiju bolesti riječ. Neki od glavnih simptoma ove bolesti su: rektalno krvarenje, zatim tekuće, sluzave stolice s tragovima krvi, tenezmi kao i urgenacija, drugim riječima “lažni poziv” za obavljanje nužde, ali i bol u abdomenu. Proljevaste stolice nisu samo proljevaste već je prisutna velika količina sluzi, a također krv i gnoj. U najvećem broju oboljelih, oko 70%, tijekom bolesti je karakteriziran izmjenom razdoblja pogoršanja i remisije, a u 10-15% oboljelih zabilježena je aktivnost kontinuiranog tipa. S druge strane, bolest je popraćena sistemskim simptomima kao što su mučnina, anoreksija, koji put i povraćanjem, dolazi do gubitka tjelesne težine, povišene tjelesne

temperature, ali i pojave simptoma anemije kao što su umor i otežano disanje. Svaki od navedenih kliničkih simptoma se može bodovati te naj taj način izračunati indeks aktivnosti bolesti. Jedan od indeksa, koji se primjenjuje u kliničkoj praksi, za procjenu aktivnosti bolesti je Montrealska klasifikacija (Tablica 1).

Tablica 1. Montrealska klasifikacija aktivnosti bolesti u UK (10)

|                         | <b>S0</b> | <b>S1</b>          | <b>S2</b>                        | <b>S3</b>       |
|-------------------------|-----------|--------------------|----------------------------------|-----------------|
|                         | REMISIJA  | BLAGI              | UMJERENI                         | TEŠKI           |
| <b>Broj stolica/dan</b> |           | ≤ 4                | > 4                              | ≥ 6             |
| <b>Krv u stolici</b>    |           | Može biti prisutna | Prisutna                         | Prisutna        |
| <b>Puls</b>             |           | Sve normalno       | Nedostaju ili su minimalni znaci | > 90/min ili    |
| <b>Temperatura</b>      |           |                    | sistemne                         | > 37,5°C ili    |
| <b>Hemoglobin</b>       |           |                    | toksičnosti                      | < 10.5 g/dL ili |
| <b>SE</b>               |           |                    |                                  | > 30 mm/h ili   |
| <b>CRP</b>              |           |                    |                                  | > 30 mg/L       |

UK: ulcerozni kolitis, SE: sedimentacija, CRP: C-reaktivni protein

Također, kod teških oblika UK dolazi i do pojave komplikacija koje dijelimo na intestinalne i ekstraintestinalne.

Intestinalne komplikacije su (9, 11):

- Perianalna bolest (hemeroidi, perianalni apscesi....)
- Intenzivno krvarenje (pojava kod <5% oboljelih)
- Pseudopolipoza koja se razvija kao rezultat brze i intenzivne obnove sluznice



- Toksični megakolon (akutna dilatacija kolona na >6-7cm u promjeru koja je ujedno i najteža komplikacija UK te se javlja samo u 2-10% bolesnika dok smrtnost u prosjeku iznosi 30%)
- Karcinom kolona (javlja se u visokorizičnih bolesnika s dugim tijekom bolesti i u bolesnika s pankolitisom)

Ekstraintestinalne komplikacije su (9, 11):

- Nutritivne i metaboličke (pad koncentracije kalija, kalcija, albumina, željeza)
- Hepatobilijarne (učestale; masna jetra)
- Hematološke (sideropenična anemija)
- Promjene u zglobovima (atralgije, periferni artritis, ankilozantni sponditis)
- Očna bolest (uveitis)
- Promjene na koži (*Erythema nodosum*, *Pyoderma gangrenosum*)

#### 1.1.5. DIJAGNOZA

Na temelju laboratorijskih nalaza koji ukazuju na povećane vrijednosti upalnih procesa, nalozom upaljene sluznice, ali i na temelju kliničkih simptoma postavlja se dijagnoza UK. Jedne od važnijih pretraga za postavljanje dijagnoze su svakako kolonoskopija ili irigografija crijeva, kao i mikrobiološka analiza stolice. Isto tako, važno je napraviti i rendgenski snimak abdomena kako bi se točno naznačio stupanj zahvaćenosti debelog crijeva, ali i kako bi se otkrilo ukoliko je došlo do transformacija na hepatobilijarnom i uropoetskom traktu. U laboratorijskim nalazima u akutnoj fazi postoji povećan broj leukocita, ubrzana sedimentacija eritrocita, trombocitoza te povišen nalaz upalnih markera, fibrinogena i C-reaktivnog proteina. Također, krvnom pretragom može se ukazati na pojavnost anemije ili elektrolitskih promjena (8). U dijagnostičkom postupku često se koristi i

ultrazvučni pregled abdomena kojim se vrlo lako mogu detektirati crijevne dilatacije, a osim toga i komplikacije na hepatobilijarnom i uropoetskom traktu.

#### 1.1.6. TERAPIJSKI POSTUPCI

Kao što znamo, glavni cilj u sprječavanju bilo kakve bolesti je adekvatna terapija. Primjenom terapije nastoji se simptome bolesti staviti pod kontrolu, ali i što je brže i bezbolnije doći do faze remisije. Upravo zbog toga, kod UK nastoji se izbjeći progresivna destrukcija tkiva kao i nastanak komplikacija. Nadalje, važno je poboljšati kvalitetu života bolesnika, ali i spriječiti nastanak invaliditeta.

##### *Farmakološka terapija*

Ukoliko se radi o blažem obliku bolesti UK, prepisuje se terapija u obliku topičkih aminosalicilata u obliku klizme. Isto tako postoje i primjenjuju se topički kortikosteroidi i oralni aminosalicilati. Primjena ove vrste lijekova u prosjeku traje između četirir do dvanaest tjedana te se čepići i klizme mesalazina konzumiraju svaku večer, ali se preporuča smanjivanje doza nakon sve 2-3 večeri. Kod kroničnog oblika UK, kao terapija koriste se oralni aminosalicilati s preporukom primjene dijete ali s povećanim unosom proteina i kalorija (12).

##### *Kirurška terapija*

Kada je riječ o kirurškoj terapiji važno je znati da se ona dijeli na hitnu, urgentnu i elektivnu. Hitnom operacijom podvrgava se bolesnik s nekontroliranim masivnim krvarenjem i toksičnim megakolonom, dok se urgentnom operacijom podvrgava bolesnik s teškim kolitisom. Elektivnoj operaciji izlaže se pacijent kod kojeg terapija ne djeluje te je potrebno poduzeti druge mjere (12).

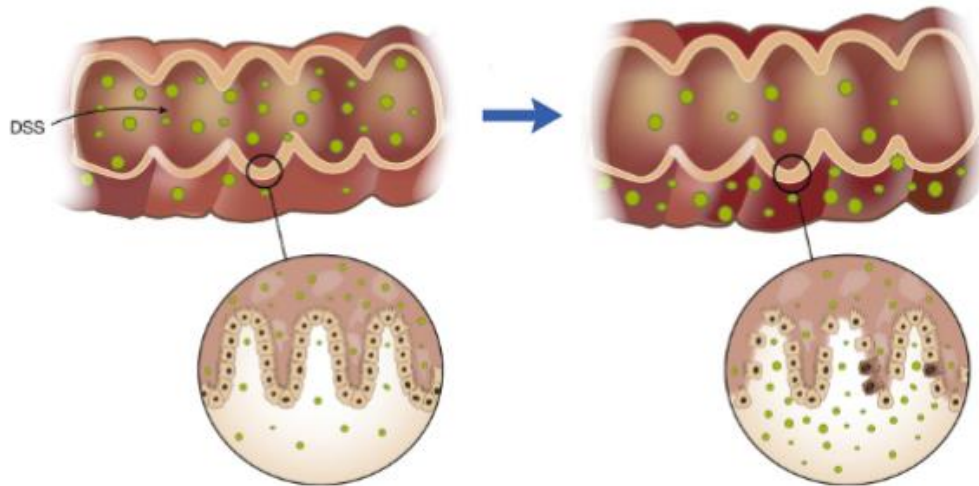
## 1.2. EKSPERIMENTALNI MODELI UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

Tijekom godina rastao je broj istraživanja na pokusnim modelima, a istraživanja na pokusnim modelima uvelike su pomogla u razumijevanju etiopatogenih čimbenika te patohistoloških promjena tijekom razvoja bolesti. Eksperimentalni modeli značajno nadopunjuju klinička istraživanja jer se kroz njih mogu provesti istraživanja koja nije moguće provesti u ljudi. Nadalje, koristeći eksperimentalne metode izolirano se mogu proučavati faze bolesti te utjecaj ključnih čimbenika u etiopatogenezi kolitisa. Ovisno o metodi koja se koristi za razvoj bolesti, pokusni modeli dijele se u nekoliko kategorija, a to su: a) spontani b) potaknuti c) modeli razvijeni kao rezultat genetske manipulacije te d) modeli razvijeni kao rezultat prijenosa imunskih stanica. Dosad provedenim istraživanjima dokazano je da niti jedan, dosad opisan, pokusni model bolesti ne može u cjelosti zadovoljiti sve kriterije kada je riječ o upalnim bolestima crijeva. Upravo zbog toga, teži se tome da se pokusni model izabere na temelju segmenta bolesti koji se želi istraživati. U tablici 1. prikazani su različiti modeli upalne bolesti crijeva koji se danas primjenjuju u istraživanjima.

### 1.2.1. Potaknuti modeli kolitisa

U slučaju potaknutih eksperimentalnih modela primjenjuju se tri načina razvoja upalnog procesa: prijenos iz jednog *in vivo* modela u drugi odnosno prijenos iz bolesnika u pokusne životinje, lokalnom primjenom neke kemijske tvari ili lokalnom primjenom dijelova mikrobioloških organizama. Jedan od primjera kemijskog modela kolitisa je primjena 4-5% octene kiseline. Uz octenu kiselinu, također se koriste jodoacetamid, indometacin, natrijev dekstran sulfat (eng. dextran sodium sulfate - DSS), trinitrobenzensufonska kiselina, oksazoloni i peptoglikan polisaharid kao induktori nastanka upale gastrointestinalnog trakta. Spojevi kao što je glutatjon koriste se prilikom zaštite sluznice crijeva ukoliko se kao indikator nastanka bolesti koristi jodoacetamid. Također u istraživanjima, jedan od zanimljivijih spojeva koji se koristi u izazivanju

kolitisa sličnom Chronovoj bolesti je i već prije spomenut TNBS. Najčešće primjenjivani i već duže vremena poznat je pokusni model izazvan primjenom DSS-a. Ovaj eksperimentalni model je jedan od najkompatibilnijih s humanim oblikom kolitisa, jednostavan je za uspostavu i pokazuje visok stupanj reproducibilnosti. Ukoliko DSS primjenjujemo u različitim koncentracijama uz različitu dužinu primjene, može doći do razvoja akutnog odnosno kroničnog oblika bolesti. DSS model nije prikladan samo za proučavanje razvoja kolitisa, ovaj model dobro nam služi i kod istraživanja nastanka karcinoma debeloga crijeva. Natrij dekstran sulfat je negativno nabijen polisaharid dobro topiv u vodi za piće, a molekularna masa iznosi mu od 5-1400 kDa. Mase od 40-50 kDa primjenjive su kod razvoja UK. DSS se primjenjuje *per os*, u različitim postocima kao i u različitim dužinama upotrebe (ako se radi o akutnom kolitisu, primjena traje 5-7 dana), a kao sekundarni odgovor u razvoju kolitisa javlja se i aktivacija imunološkog sustava (13). DSS je polisaharid koji ima toksičan učinak na sluznicu debelog cijeva te uzrokuje njezino oštećenje što rezultira njezinom povećanom propušnošću i sekundarnim odgovorom odnosno aktivacijom imunološkog odgovora (slika 4). Ono što karakterizira ovaj model je gubitak tjelesne mase, proljev, rektalno krvarenje, dolazi do skraćivanja crijeva, ali i pojavnosti čireva kao i infiltracije, upalnih stanica, posebice, neutrofila (14).



Slika 4. Mehanizam djelovanja natrijevog dekstran sulfata (DSS) tijekom razvoja kolitisa  
(15)

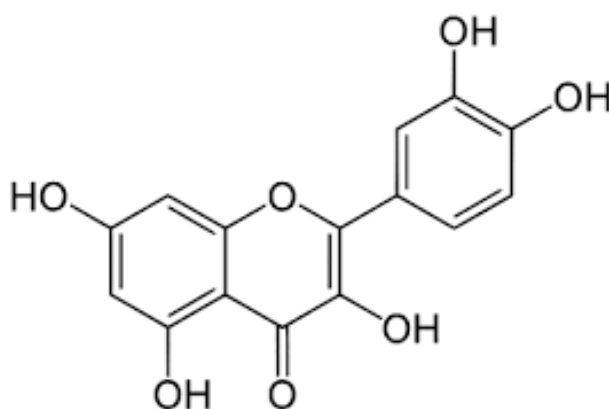
### 1.3. FLAVONOIDI

Prirodni heterociklički spojevi s kisikom velika su skupina spojeva koja se razlikuje prema strukturi, a posebno prema biološkoj ulozi. Zastupljeni su u mnogim vrstama voća i povrća (mrkva, brokula, luk, paprika, kupus), začina poput celera i peršina. U povijesti se bilje koristilo kao komplementarna terapija. Glavne skupine flavonoida su: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavani, izoflavoni i antocijanidini. Flavonoidi su polifenoli čija biološka aktivnost ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi. Svoju biološku aktivnost ostvaruju kroz nekoliko mehanizama poput aktivacije antioksidativnih enzima, a osobito je zanimljivo njihovo protuupalno, kemoprotektivno i antitumorsko djelovanje.

### 1.3.1. LUTEOLIN

Luteolin je metabolit iz skupine flavona, a koji pripada skupini flavonoida. Možemo ga pronaći u raznim proizvodima biljnog podrijetla u obliku aglikona ili glikozida. Glavna razlika između ova dva oblika je što su aglikoni molekule koje na sebe nemaju vezan šećer, dok su glikozidi aglikoni na koje je vezan jedan ili više šećera. One vrste biljaka u kojima možemo pronaći luteolin su: zelena salata, mrkva, celer, kelj, papar, maslinovo ulje, ružmarin, metvica, kupus, cvjetača, vlasac, peršin, špinat, repa, krastavac, limun, nar, čokolada kao i zeleni čaj, ali i mnoge ostale (16).

Što se tiče same strukture luteolina, on posjeduje C6-C3-C6 strukturu zajedno s dva benzenska prstena (prsteni A i B) te jednim prstenom (prsten C) na koji je vezan kisik, te C2-C3 dvostruka veza. Sa svojim hidroksilnim skupinama na 5,7,3',4' ugljikovim atomima, te sa svojom dvostrukom vezom, luteolin je odgovoran za biokemijska i biološka svojstva antioksidativnog djelovanja (17).



Slika 5. Kemijska struktura luteolina (18)

Kada je riječ o apsorpciji luteolina, ona je brza i jednaka u svim dijelovima crijeva, ali se smatra kako je izraženija u duodenumu te jejunumu za razliku od kolona i ileuma. S druge strane,

izlučivanje luteolina iz organizma je sporije. Važno je razlikovati apsorpciju luteolin aglikona i njegovog najčešćeg derivata – luteolin-7-*O*- $\beta$ -D-glukozida. Dok se luteolin aglikon direktno apsorbira, njegov glikozid se prvo hidrolizira u aglikon pod utjecajem mikroorganizama u crijevima, a zatim se apsorbira u sistemsku cirkulaciju (19). Nakon apsorpcije slijedi konjugacija luteolin aglikona s glukuronskom kiselinom pri čemu nastaje luteolin glukuronid od kojih je najpoznatiji luteolin-3'-*O*- $\beta$ -D-glukuronid s pretpostavkom da ima fiziološki učinak (20). Provedenim istraživanjima dokazano je da se u plazmi štakora, osim slobodnog luteolina nalaze i glukuronid i sulfat konjugat, kao i *o*-metil luteolin (diosmetin i krizoeriol), dok se u ljudskoj plazmi nalazi u većem djelu sulfat metabolit od čega je većim djelom prisutan luteolin-3'-*O*-sulfat (20,21). Izlučivanje luteolina iz organizma vrši se urinom i žuči u obliku glukurono-konjugata te sulfo-konjugata, a putem fecesa izlučuje se u obliku aglikona (19).

Temeljem istraživanja, kako epidemioloških tako i eksperimentalnih, dokazana je povezanost između unosa hrane koja sadrži luteolin te razvoja kroničnih bolesti, ali i širok spektar djelovanja luteolina prilikom prevencije i liječenja raznih bolesti. Što se tiče biološke aktivnosti luteolina, on ima antioksidacijsko, antitumorsko i protuupalno djelovanje.

### 1.3.2. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE LUTEOLINA

Oksidativni stres predstavlja metaboličko stanje organizma koje može dovesti do kronične upale, a koje se javlja u stanicama za koje je karakteristično da postoji neravnoteža između razina reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i antioksidativne obrane. Proizvodnja ROS-a posljedica je prijenosa elektrona s kisika duž enzima dišnog lanca. Ukoliko taj sustav prijenosa nije u ravnoteži, ROS vrlo lako može izazvati oštećenje DNA koje zatim dovodi do mutageneze i raka kao i umrežavanja proteina, lipidne peroksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina (što za

posljedicu ima starenje stanica), oštećenja staničnih membrana, ali i oksidaciju lipoproteina niske gustoće što kasnije može dovesti do oštećenja krvožilnog sustava (16). No zbog svoje karakteristične strukture antioksidacijsko djelovanje luteolina očituje se na uklanjanju ROS-a. Ovdje važnu ulogu imaju hidroksilne skupine na 3' i 4' ugljikovim atomima (one stabiliziraju slobodne radikale na način da doniraju H<sup>+</sup> atom), C2-C3 dvostruka veza, te karbonilna skupina na C4. Također, antioksidacijsko djelovanje može se vidjeti i tijekom inaktivacije oksidaze koja sudjeluje u stvaranju ROS-a kao npr. ksantin oksidaza, ali i prilikom aktiviranja antioksidacijskih enzima kao što su glutathion-S-transferaza (GST, engl. *glutathione-S-transferase*), glutathion reduktaza (GR, engl. *glutathione reductase*), SOD i CAT. Isto tako antioksidacijsko djelovanje očituje se i prilikom inhibicije enzima (npr. lipooksigenaza i ciklooksigenaza) koji uzrokuju oksidacijsko oštećenje staničnih komponenti, ali i kod keliranja nekih metala kao što su željezo i bakar (17).

### 1.3.3. PROTUUPALNO DJELOVANJE LUTEOLINA

Upala je lokalna reakcija na mjestu infekcije ili oštećenog tkiva, a koja predstavlja obrambeni mehanizam za stanice imunološkog odgovora. Ona sprječava širenje patogena, potiče obnovu tkiva, a može biti kratkotrajna (akutna upala) ili dugotrajna (kronična upala).

Protuupalno djelovanje luteolina očituje se kroz regulaciju upalnih posrednika, odnosno kroz regulaciju djelovanja citokina, kemokina i eikozanoida, ali i prilikom modulacije signalnih putova.

Neki od proupalnih citokina na koje luteolin djeluje su: (interleukin) IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, tumor nekrotizirajući čimbenik alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ), te interferon (IFN)- $\beta$ , dok s druge strane može aktivirati određene citokine kao što je to IL-10 (17).

Transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B modulira ekspresiju upalnih medijatora poput ciklooksigenaze



(COX)-2 i iNOS (inducibilna sintetaza dušikovog oksida) te se protuupalno djelovanje luteolina, osim gore navedenih može očitovati i kroz smanjenje proizvodnje oksida i prostanglandina (16). Ono što čini najistaknutiji protuupalni učinak djelovanja luteolina svakako je aktivacija NF- $\kappa$ B i MAPK (proteinska kinaza aktivirana mitogenom, engl. *mitogen-activated protein kinase*) signalnih puteva. MAPK je obitelj serin-treonin kinaza koji je uključen u različite fiziološke procese kao što je proliferacija, apoptoza i iniciranje upalnog odgovora. Aktivacija MAPK-a događa se prilikom fosforilacije podvrsta MAPK djelovanjem stimulansa npr. TNF, IL-1 i IL-6. U konačnici, rezultat je indukcija aktivacije transkripcijskih faktora što dovodi do pojačavanja upalnog odgovora (16). Isto tako, osim djelovanja na NF- $\kappa$ B i MAPK, važnu ulogu ima i signalni put upala janus kinaza (JAK, eng. *Janus kinase*)/pretvarač signala i aktivator transkripcije (STAT, engl. *signal transducer and activator of transcription*). JAK/STAT put uključen je u imunološki posredovane bolesti. Njegovo djelovanje vidi se prilikom vezivanja IL-6 s njegovim receptorom tirozin kinaze pri čemu se dešava aktivacija JAK-a, te se zauzvrat fosforilira STAT koji ima tendenciju formiranja stabilnih dimera te translokacije iz citoplazme u jezgru pri čemu se aktivira transkripcija nizvodnih citokina (16,17).

#### 1.3.4. PRIMJENA LUTEOLINA U ULCEROZONOM KOLITISU

U dosad provedenim istraživanjima dokazano je da luteolin u tretmanu UK ima zaštitnu ulogu gdje se ta uloga prvo očituje u protuupalnom, a zatim slabije u antioksidacijskom djelovanju. Ono što čini prvu crtu obrane organizma u gastrointestinalnom sustavu od upale, svakako, su intestinalne epitelne i imunološke stanice. Istraživanja su pokazala da upravo u njima dolazi do smanjenja upalnog procesa prilikom djelovanja luteolina (22). Protuupalno djelovanje luteolina temelji se na smanjenju proizvodnje proupalnih čimbenika te inhibiciji NF- $\kappa$ B. Pokazano je da

luteolin primjenjen oralnim putem, kako zasebno tako i kao dio biljnog pripravka, rezultira ublažavanjem kliničke slike bolesti (22). Osim ovog, vidljivo je posljedično smanjenje patohistoloških promjena kolona, kao i smanjenje infiltracije upalnih stanica u tkivo te proizvodnji proupalnih čimbenika (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ ) i ostalih posrednika upale (COX-2). Ne smije se zaboraviti da važnu ulogu ima i JAK/STAT inhibicija signalnog puta koja je također potaknuta djelovanjem luteolina (17). S druge strane, u jednom istraživanju pokazano je kako luteolin može imati suprotno djelovanje, odnosno da može doći do pogoršanja kolitisa kao i do njegova uznapredovanja (23). Razlog tome je primjena DSS-a u razvoju kolitisa, a ne njegov spontani razvoj kao što je to kod IL-6 *knockout* miševa kod kojih je prikazano zaštitno djelovanje luteolina inhibicijom NF- $\kappa$ B.

Osim protuupalnog djelovanja, zabilježeno je i antioksidacijsko djelovanje luteolina, no ono nije tako snažno kao protuupalno. Antioksidacijsko djelovanje luteolina u UK možemo vidjeti prilikom aktivacije Nrf2 transkripcijskog čimbenika te kod jačanja obrambenog sustava u tkivu debelog crijeva prilikom aktivacije enzima, superoksid-dismutaze i katalaze.

Usprkos svemu navedenom, potrebno je provoditi daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti razjasnio mehanizam djelovanja luteolina u tretmanu UK što bi bilo od velike važnosti prilikom primjene postojeće terapije ili s druge strane da se poradi na pronalaženju nove, odgovarajuće.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Dosadašnja istraživanja su pokazala pozitivan učinak prirodnih spojeva, posebice iz skupine flavonoidnih polifenola, u tretmanu različitih bolesti, osobito kroničnih, te stoga postoji opravdano zanimanje za istraživanje luteolina kao potencijalnog preventivnog i terapijskog prirodnog spoja. Međutim, molekularni mehanizmi djelovanja luteolina u razvoju i liječenju kroničnih, upalnih bolesti, kao što je UK nisu u potpunosti razjašnjeni.

Temeljem dosadašnjih spoznaja hipoteza ovog istraživanja je da će luteolin djelovati protuupalno na razvoj kolitisa.

Stoga su u ovom istraživanju postavljeni sljedeći ciljevi:

1. Ispitati utjecaj luteolina na razvoj i napredovanje UK u eksperimentalnom modelu kolitisa
2. Ispitati utjecaj luteolina na izražaj ERK signalne molekule
3. Predložiti potencijalni molekularni mehanizam terapijskog djelovanja luteolina u tretmanu UK.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. PRIMARNA I SEKUNDARNA PROTUTIJELA

##### *Primarna protutijela*

Zečje monoklonsko protu-ERK1/2 protutijelo (#4695, Cell Signaling Technology)

Zečje monoklonsko protu-p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) protutijelo (#4370, Cell Signaling Techn

Zečje poliklonsko protu-cijepana kaspaza-3 protutijelo (Asp175) (#9661, Cell Signaling Technology)

Zečje poliklonsko protu-LC3B-I/II protutijelo (ab48394, Abcam)

Mišje monoklonsko protu-TNF- $\alpha$  protutijelo (ab1793, Abcam)

Mišje monoklonsko protu- $\beta$ -aktin protutijelo (ab8226, Abcam)

##### *Sekundarna protutijela*

Sekundarno poliklonsko kozje protu-zečje protutijelo konjugirano s peroksidazom hrena (HRP, engl. *horseradish peroxidase*), (ab6721, Abcam)

Sekundarno poliklonsko kozje protu-mišje protutijelo konjugirano s HRP, (ab97023, Abcam)

Primarna i sekundarna protutijela korištena u istraživanju pripremljena su razrjeđivanjem u reagensu za blokiranje (Western Blocking Reagent (10x), Cat. No. 11921763001, Roche Diagnostic, Mannheim, Njemačka) u odgovarajućem omjeru. Za analizu izražaja proteina u tkivu debelog crijeva Western blotom korištena su sljedeća primarna protutijela u sljedećim razrijeđenjima: mišje monoklonsko protu- $\beta$ -aktin protutijelo (1:10000), zečje poliklonsko protu-cijepana kaspaza-3 (Asp175) protutijelo (1:500), zečje monoklonsko protu-ERK1/2 protutijelo (1:1000), zečje monoklonsko protu-p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) protutijelo (1:1000), zečje

poliklonsko protu-LC3B-I/II protutijelo (1:1000), mišje monoklonsko protu-TNF- $\alpha$  protutijelo (1:1000).

### 3.2. EKSPERIMENTALNI MODEL KOLITISA I UZORCI ZA ISTRAŽIVANJE

U svrhu provođenja istraživanja koristili su se uzorci debelog crijeva izoliranih iz kontrolnih i tretiranih skupina miševa soja C57BL/6 usmrćenih cervikalnom dislokacijom. Nakon izolacije uzorci debelog crijeva su izvagani, izmjerena im je dužina (od cekuma do antrum) te su narezani na manje dijelove. Dio debelog crijeva izdvojen je za uklapanje u parafin te su dalje korišteni za patohistološke analize. Ostatak tkiva debelog crijeva zamrznut je u tekućem dušiku i pohranjen na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize izražaja proteina Western blot metodom. Također, uz debelo crijevo uzeta je i slezena, kao neposredni pokazatelj upale, izvagana joj je masa, a podatak o masi se koristio za određivanje omjera mase slezene i tjelesne mase.

Miševi su uzgajani u kontroliranim uvjetima uzgojnoog centra i inženjering laboratorijskih miševa Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. U prostoriji za smještaj životinja uspostavljeni su kontrolactemperature ( $20 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i vlage ( $50 \pm 5\%$ ) te izmjena ciklusa svjetla i mraka svakih 12 sati, uz 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, engl. *dextrane sulfate sodium salt*, MW 36000 – 50000 Da; Cat. No. 160110, MP Biomedicals, Solon, OH, SAD) tijekom 5 – 7 dana izazvan je eksperimentalni UK. DSS je otopljen u vodi za piće, a životinje su žrtvovane pet ili sedam dana nakon početka primjene DSS-a. Tijekom razvoja kolitisa pratili su klinički parametri (tjelesna masa, konzistencija stolice, pojava krvi u stolici, opće stanje miševa, promjena u ponašanju) te se temeljem dobivenih vrijednosti izračunao indeks aktivnosti bolesti i procijenilo

zdravstveno stanje životinja. Za procjenu zdravstvenog stanja koristila se bodovna skala za sljedeće parametre: gubitak tjelesne mase (gubitak tjelesne mase, 0 bodova – gubitak <5%; 1 bod - gubitak tjelesne mase 5 – 10%; 2 boda - gubitak tjelesne mase 10 – 15%; 3 boda - gubitak tjelesne mase 15 – 20%; 4 boda - gubitak tjelesne mase >20%), rektalno krvarenje (0 bodova – nema rektalnog krvarenja; 4 boda - vidljivo rektalno krvarenje), konzistencija stolice (0 bodova - formirani peleti; 2 boda - mekana/polufirmirana stolica; 4 boda - dijareja). Ocjenjivanjem svakog parametra, odredio se indeks aktivnosti bolesti (DAI, engl. *disease activity index*) i to na način da se zbroj bodova za sve ispitivane parametre podijelio s tri za svaku životinju, a zatim se odredila srednja vrijednost za pojedinu ispitivanu skupinu (24).

### 3.3. PRIPREMA I PRIMJENA LUTEOLINA I ERK INHIBITORA

Kako bi se ispitaio utjecaj luteolina na razvoj kolitisa i njegov mehanizam djelovanja kolitisa uz DSS miševi su, od 0. do 7. dana pokusnog perioda, primali i luteolin (sc-203119C, ChemCruz Biochemicals, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD) koji je primjenjen oralno u dozi od 100 mg/kg. Za pripremu početne otopine luteolin je otopljen u dimetil sulfoksidu (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka), a za daljnje razrjeđivanje otopine luteolina koristio se fosfatni pufer (0,01 M, pH 7,4).

Kako bi se ispitalo prethodno navedeno uzorci debelog crijeva za analize provedene u ovom istraživanju uzete su iz tri skupine miševa:

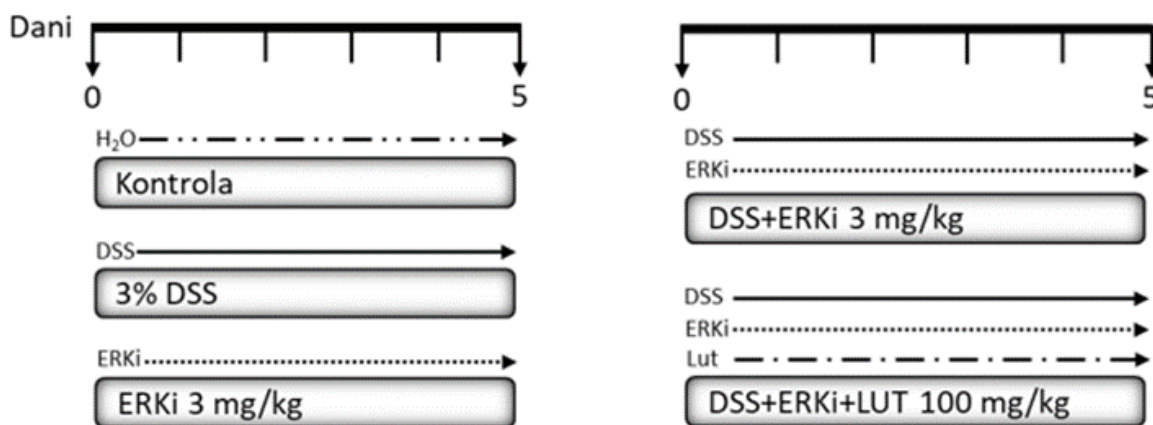
1. Kontrola - miševi koji su pili vodu za piće kroz 7 dana *ad libitum*
2. DSS - miševi tretirani DSS-om otopljenim u vodi za piće od 0. pa sve do 7. dana

3. DSS + Lut 100 mg/kg - miševi tretirani DSS-om otopljenim u vodi za piće te luteolinom, jednom dnevno do 7. dana pokusnog perioda.

Kako bi se ispitaio mehanizam djelovanja luteolina preko ERK ½ signalnog puta tijekom pokusnog perioda (od 0. do 5. dana) primijenio se i ERK inhibitor (ERKi; PD0325901 MEK inhibitor, Cat. No. A3013, ApexBio Tech LLC, Houston, TX, SAD) otopljen u DMSO-u, a zatim razrijeđen u fosfatnom puferu do koncentracije 3 mg/kg u kojoj je i apliciran miševima. ERKi je primjenjen intraperitonealno, u dozi od 100 µL/miš jednom dnevno kroz eksperimentalni period od pet dana.

Kako bi se ispitalo prethodno navedeno uzorci debelog crijeva za analize uzeti su iz sljedećih skupina miševa (slika 6.):

1. Kontrola - miševi koji su pili vodu za piće kroz 5 dana *ad libitum*
2. ERKi - miševi tretirani inhibitorom kako je prethodno opisano
3. DSS - miševi tretirani 3% otopinom DSS-a
4. DSS + ERKi miševi tretirani DSS-om otopljenim u vodi za piće kroz 5 dana, a istovremeno s primjenom DSS-a (0. dan) započeo je tretman inhibitorom
5. DSS + Lut 100 mg/kg + ERKi - miševi tretirani otopinom DSS-a, luteolinom u dozi 100 mg/kg p.o. i inhibitorom (i.p.).



Slika 6. Plan primjene natrijevog dekstran sulfata (DSS), ERK inhibitora (ERKi) i luteolina tijekom pokusnog perioda. n=5 miševa u ispitivanoj skupini.

#### 3.4. UKLAPANJE TKIVA DEBELOG CRIJEVA U PARAFIN I BOJANJE HEMATOKSILIN-EOZINOM

Kako je prethodno navedeno debelo crijevo je narezano u manje komade koji su se zatim stavili u plastične kazete i fiksirali u 4% paraformaldehidu (4% NB Formaldehyde, FNB4-5L, BioGnost d.o.o., Zagreb, Hrvatska) kroz 24 sata. Za dobivanje parafinskih preparata tkiva debelog crijeva uzorci su, nakon fiksacije, isprana tekućom vodom i stavljena u aparat (TP1020, Leica Biosystems) u kojem su uklopljena u parafin. Dobiveni parafinski blokovi su korišteni za dobivanje parafinskih preparata tkiva debelog crijeva debljine 4  $\mu$ m, a proces rezanja proveden je pomoću mikrotoma (HM340 E, Leica Biosystems). Parafinski preparati tkiva debelog crijeva su obojani hematoksili-eozin bojanjem (HE) i korišteni za histopatološku analizu tkiva debelog crijeva.

Hematoksilin tkiva debelog crijeva boji kiselinske strukture (kromatin i jezgra) ljubičasto-plavo, dok se bazične strukture (citoplazma) uz pomoć eozina boje crveno. Prije provođenja HE bojanja,



tkivni preparati su deparafinizirani. Deparafinizacija tkivnih preparate provedena je uranjanjem u ksilen (postupak se provodio 3 puta u trajanju od 5 minuta). Nakon toga uslijedila je rehidracija gdje su se tkivni preparati uranjali u niz otopina etanola koji je imao padajuću koncentraciju (100%-tni etanol-2x4 min; 90%-tni etanol-1x4 min; 70%-tni etanol-1x4min; 50%-tni etanol-1x4 min). Zatim je uslijedilo ispiranje preparata u trajanju od 4 minute s destiliranom vodom, nakon čega su se bojali hematoksilinom, uranjanjem u otopinu uz inkubaciju u trajanju od 1 minute. Poslije ispiranja ispod mlaza tekuće vode (15 min), preparati su se kratkotrajno (2 sekunde) uronili u otopinu za diferencijaciju (smjesa 70%ong etanola (100 mL) i klorovodične kiseline (0,5 mL)). Nakon diferencijacije, preparati su ponovno isprani mlazom tekuće vode, ovoga puta u trajanju od 10 minuta, a zatim su bili isprani s destiliranom vodom u trajanju od 3 minute. Isprani tkivni preparati zatim su se bojali eozinom uranjanjem u otopinu istog te inkubirali 1 minutu, nakon čega je opet slijedilo ispiranje uranjanjem u destiliranu vodu u trajanju od 5 minuta. Destilirana voda mijenjala se tri puta. Uslijedila je dehidracija tijekom koje su se preparati uranjali u niz otopina etanola s rastućom koncentracijom (96%-tnin etanol- 2x30 sek; 100%-tni etanol- 2x30 sek) te pročišćavanje uranjanjem u otopinu ksilena 3 puta po 5 minuta. Da bi se dobili trajni histološki preparati, prvo su se osušili na sobnoj temperature te su uklopljeni u medija za uklapanje. Uz pomoć svjetlosnog mikroskopa Olympus BX51, preparati su snimljeni i analizirani.

### 3.5. IZRAČUN MIKROSKOPSKOG INDEKSA OŠTEĆENJA TKIVA DEBELOG CRIJEVA

Izračun stupnja oštećenja tkiva debelog crijeva temelji se na ocjenjivanju pet parametara prema sljedećoj boodvnoj skali:

- a) težina upale (0 bodova - bez upale; 1 bod - blaga upalni proces; 2 boda umjereni upalni proces; 3 boda - jaka upala)
- b) infiltracija upalnih stanica (0 bodova - bez infiltracije; 1 bod - infiltracija u mukozi; 2 boda - infiltracija u mukozi i submukozi; 3 boda - transmuralna infiltracija)
- c) oštećenje epitela (0 bodova - bez oštećenja; 1 bod - distorzija kripti; 2 boda - erozija; 3 boda - ulceracija)
- d) opseg lezije (0 bodova - bez lezije; 1 bod - točkaste lezije; 2 boda - multifokalne lezije; 3 boda - difuzne lezije)
- e) edem (0 bodova - bez edema; 1 bod - edem u mukozi; 2 boda - mukozi i submukozi edem; 3 boda – transmuralni edem).

Zbrajanjem bodova za navedene parametre, prema navedenoj skali bodova, dobivena je vrijednost mikroskopskog indeksa oštećenja tkiva po svakom uzorku. U daljem izračunu određena je srednja vrijednost za svaku ispitivanu skupinu.

### 3.6. IZOLACIJA I ODREĐIVANJE IZRAŽAJA PROTEINA

Proteinski lizati koji su izolirani iz tkiva debelog crijeva korišteni su za analizu izražaja proteina uz pomoć Western blot metode. Za početak tkivo je homogenizirano (IKA T25 basic, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Njemačka) u puferu za liziranje (RIPA, engl. *radioimmunoprecipitation assay*) s dodatkom inhibitora fosfataza (PhosphoSTOP Phosphatase Inhibitor Coctail Tablets, Cat. No. 04906845001, Roche, Mannheim, Njemačka) i proteaza. Pufer za liziranje je dodan svakom uzorku debelog crijeva u odgovarajućem volumenu te su zatim uzorci homogenizirani i inkubirani 60 minuta na ledu. Nakon homogenizacije uslijedilo je centrifugiranje (Rotina 420R, Andreas

Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Njemačka) u trajanju od 45 min na 14000 okretaja, naposljetku se odvojio supernatant u kojem su sadržani proteini. Ukupni proteini su određeni, uz pomoć metode bicinkonične kiseline (BCA, engl. *bicinchoninic acid*), a apsorbancija se mjerila na 562 nm. Vrijednosti apsorbancija izravno su proporcionalne koncentracijama ukupnih proteina u uzorcima.

Elektroforezom na poliakrilamidnom gelu uz natrijev dodecil-sulfat (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) razdvojeni su proteini (30 – 50 µg) prema masi. Postupak elektroforeze je trajao oko 3 od 4 sata pri 4°C pri 120 V. Za razdavanje proteina koristio se gel koncentracije 10% (ERK1/2, p-ERK1/2 i TNF-α) ili 12,5% (β-aktin, cijepana kaspaza-3, LC3B-I/II). Poslije elektroforeze, proteini su bili prenešeni preko polusuhog transfera (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) na polivinilidenfluoridnu membranu (PVDF, engl. *polyvinylidene fluoride*), a prijenos je trajao 45 minuta pri 17 V. Zatim je uslijedila blokada membrane pomoću 5%-tnog nemasnog mlijeka (Blotting-Grade Blocker, Cat. #170-6404, Bio-Rad Laboratories, Inc., SAD) koji je otopljen u tris otopini pufera (TBS, engl. *tris buffered saline*) s dodatkom Tween-20 u trajanju od 1 sata. Nakon blokade membrane slijedila je inkubacija primarnim protutijelima, 1 sat na sobnoj temperaturi ili preko noći na +4°C. Po završetku inkubacije, slijedilo je ispiranje membrane TBST-om (3x5 minuta) te inkubacija sekundarnim protutijelima, 60 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja membrane s TBST-om (3x5 minuta) membrana je inkubirana uz pomoć reagensa za detekciju (Signal Fire Elite ECL Reagent, 12757P, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD) te skenirana. Uz pomoć računalnog programa za obradu slika, provedena je kvantifikacija izražaja proteina. Prema kuće-paziteljskom proteinu, β-aktinu, dobivene vrijednosti za ispitivane proteine su normirane.

### 3.7. ETIČKI ASPEKT ISTRAŽIVANJA NA EKSPERIMENTALNIM ŽIVOTINJAMA

Istraživanja koja su se provodila na pokusnim životinjama provedena su u skladu s važećim Zakonskim propisima (NN 19/99), Pravilnikom (NN 176/04) te su se poštivala temeljna etička načela kao i znanstveni principi o provođenju pokusa na životinjama. Također poštivala su se i načela 3R (1. Replacement-zamjena životinja, 2. Reduction- smanjivanje broja životinja, 3. Refinement- oplemenjivanje postupka prema životinjama). Isto tako izbjegavalo se i provođenje nepotrebnih pokusa, koristili su se što manje invazivni zahvati koji su omogućili smanjenje boli i patnje životinje. Naposljetku, koristio se onaj broj životinja u svim skupinama koji je bio dovoljan za provođenje eksperimenta i dobivanje pouzdanih i preciznih rezultata.

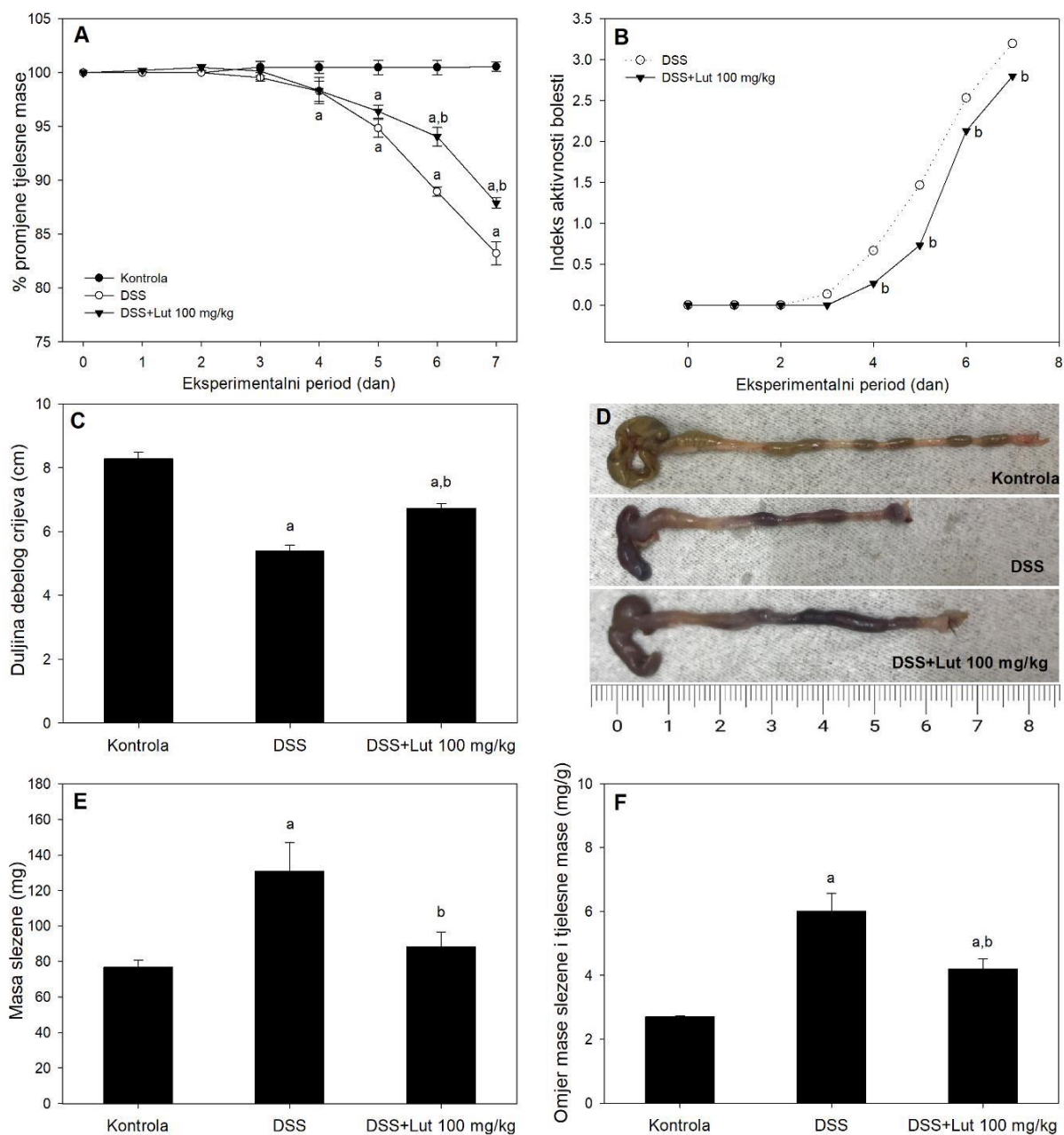
### 3.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Kvalitativni rezultati statistički su analizirani uz pomoć programa StatSoft STATISTICA 13.0 dok su kvantitativni rezultati prvo testirani Kolmogorov-Smirnovljevim testom gdje je prikazana normalna raspodjela podataka. Dobiveni podaci izraženi su preko aritmetičke sredine uz standardnu devijaciju. Koristeći se parametrijskim testom jednosmjerne ANOVA-e testirale su se statistički značajne razlike između skupina, a uz pomoć Tukey post-hoc testa utvrdile su se statistički značajne razlike. U svim usporedbama,  $P < 0,05$  smatrao se statistički značajnom razlikom.

## 4. REZULTATI

### 4.1. LUTEOLIN UTJEČE NA INTENZITET UPALNOG PROCESA TIJEKOM RAZVOJA KOLITISA

Primjena luteolina tijekom razvoja kolitisa značajno utječe na tijek razvoja upalnog procesa i prezentaciju kliničkih simptoma. Rezultati ukazuju da je primjena luteolina ublažila pad tjelesne mase u odnosu na pad tjelesne mase koji je zabilježen tijekom primjene samo DSS otopine. Gubitak tjelesne mase, sedmog dana pokusnog perioda, u životinja koje su tretirane samo DSS otopinom bio je 18,6% u odnosu na početnu tjelesnu masu dok je kod istovremene primjene DSS-a i luteolina pad bio 12,3% (slika 7A). Također, rezultati ukazuju da je luteolin utjecao na indeks aktivnosti bolesti te je pokazana značajna razlika, odnosno porast indeksa aktivnosti bolesti, od četvrtog dana pokusnog perioda pa sve do sedmog dana, u miševa koji su tretirani samo s DSS otopinom, a u odnosu na životinje koje su uz DSS dobivale i luteolin. Na lokalnoj razini, promjene duljine crijeva prate promjene na sistemskej razini te je, u odnosu na kontrolnu skupinu, najveće skraćenje debelog crijeva zabilježeno u skupini miševa koji su tretirani samo s DSS otopinom. Također, u toj skupini je zabilježen i najveći porast mase slezene.

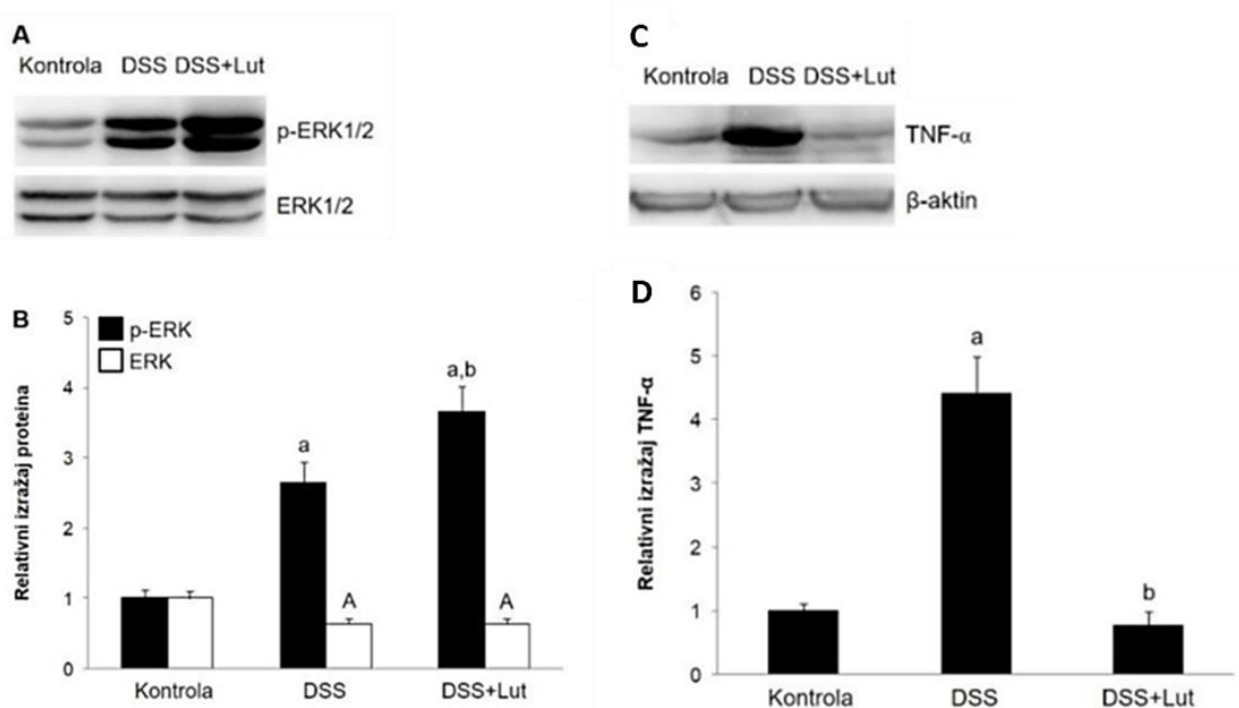


Slika 7. Utjecaj luteolina na kliničke parametre tijekom razvoja kolitisa

A) Gubitak tjelesne mase tijekom pokusnog perioda izražen kao srednji postotak početne tjelesne mase. B) Indeks aktivnosti bolesti u svim skupinama miševa C) duljina debelog crijeva u ispitivanim skupinama. D) Makroskopske promjene debelog crijeva. E) Promjene mase slezene, F) omjer slezene i tjelesne mase. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija; a;  $P < 0,05$  u usporedbi s kontrolnom skupinom, b;  $P < 0,05$  u usporedbi s DSS-om tretiranom skupinom.

## 4.2. LUTEOLIN UTJEČE NA IZRAŽAJ ERK1/2 PROTEINA U DEBELOM CRIJEVU TIJEKOM RAZVOJA KOLITISA

Rezultati izražaja proteina ukazuju izražaja fosforiliranog oblika ERK 1/2 signalne molekule (p-ERK) zabilježena je u miševa koji su tretirani samo DSS otopinom ali i kod miševa koji su istovremeno tretirani s otopinom DSS i luteolinom, a u odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim, prilikom primjene luteolina porast je bio veći u odnosu na skupinu koja je tretirana samo s DSS otopinom. Za raličku od izražaja ERK luteolin je u primjenjenoj dozi statistički značajno smanjio izražaj upalnog markera odnosno TNF- $\alpha$  (slika 8).

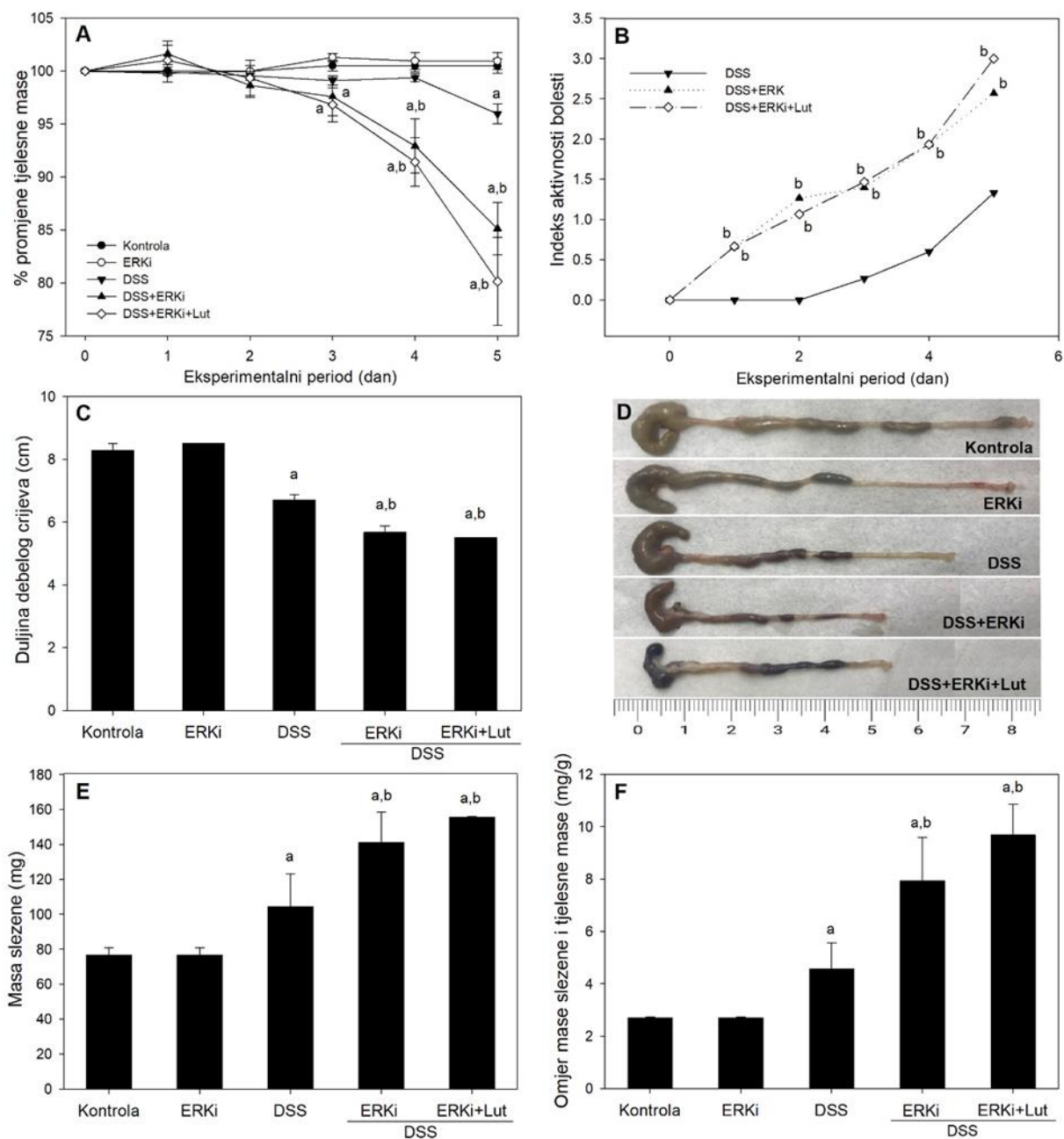


Slika 8. Utjecaj luteolina na izražaj ERK 1/2 proteina u debelom crijevu tijekom razvoja kolitisa A) i B) izražaj p-ERK1/2 i ERK1/2. C) i D) izražaj TNF- $\alpha$ . Gustoća prikazanih bendova normalizirana je na izražaj  $\beta$ -aktina. Relativni izražaj je izražen kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija, a, A;  $P < 0,05$  u usporedbi s kontrolnom skupinom, b;  $P < 0,05$  u usporedbi sa skupinu tretiranu DSS-om.

#### 4.3. INHIBITOR ERK1/2 SIGNALNOG PUTA UTJEČE NA INTENZITET UPALNOG PROCESA I DJELOVANJE LUTEOLINA TIJEKOM RAZVOJA KOLITISA

Gubitak tjelesne mase zabilježen je u svim ispitivanim skupinama miševa u odnosu na kontrolnu skupinu (slika 9) tijekom razvoja kolitisa. Pad tjelesne mase najizraženiji je u skupini miševa koji su primali DSS, ERKi i luteolin istovremeno. Vrlo sličan trend promjena vidljiv je i kod indeksa aktivnosti bolesti koji je bio najveći, u skupini miševa koji su tretirani s DSS-om, ERKi i luteolinom petog dana pokusnog perioda. Također, vidljivo je da se tijekom razvoja indeks aktivnosti bolesti nije značajno razlikovao između prethodne skupine i miševa koji su tretirani istovremeno s DSS-om i ERKi ali je razlika zabilježena na kraju eksperimentalnog perioda odnosno petog dana. Nadalje, ERKi primijenjen istovremeno s DSS otopinom utjecao je i na duljinu crijeva te možemo uočiti da je crijevo najkraće u skupinama miševa koje su tretirane s ERKi bilo samostalno ili u kombinaciji s luteolinom (slika 9C). Navedene promjene prati i promjena mase slezene budući da je u prethodno spomenutim eksperimentalnim skupinama miševa zabilježen kako porast mase slezene tako i omjer mase slezene i tjelesne mase miševa (slika 9E i F).



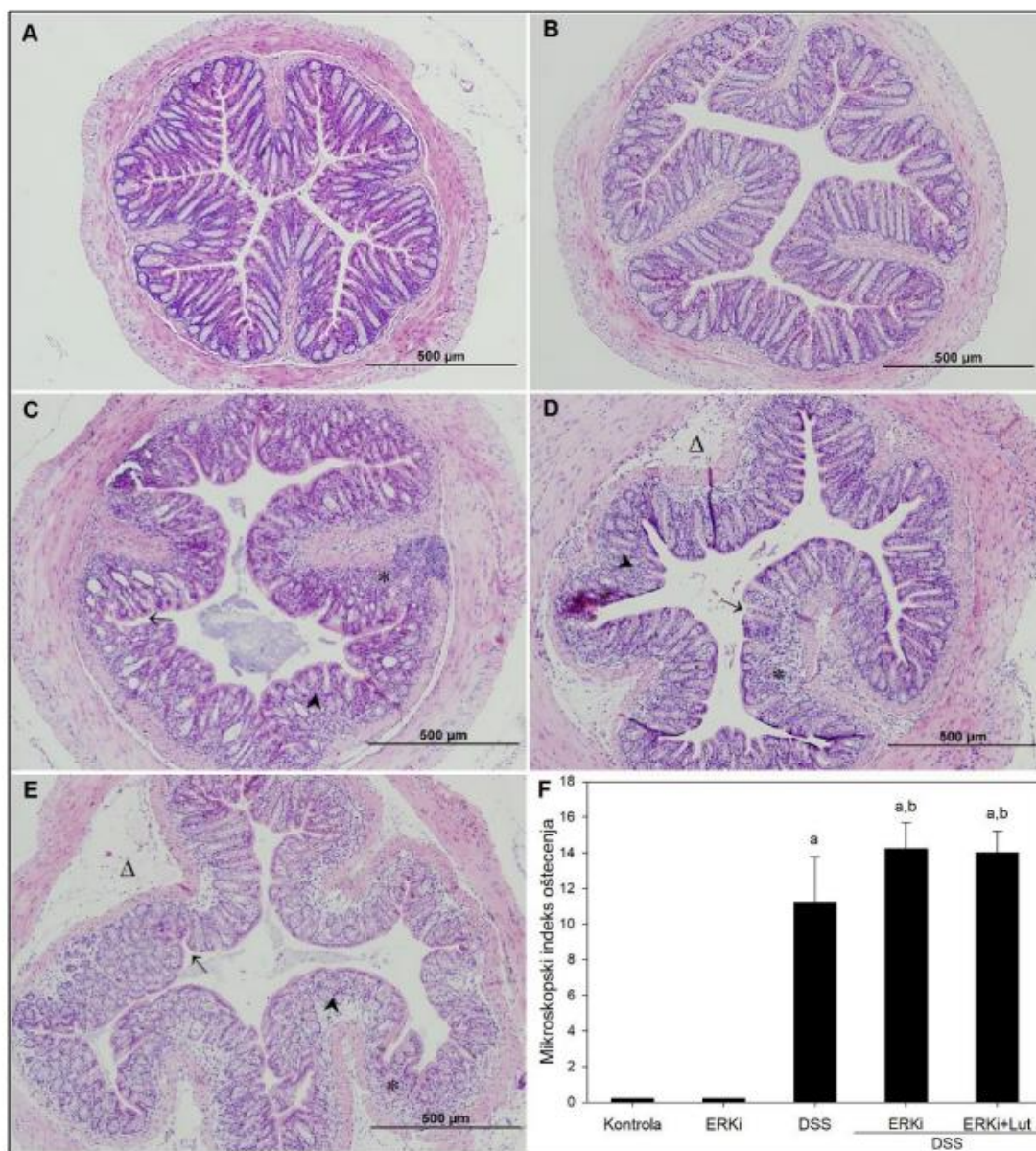


Slika 9. Utjecaj inhibicije ERK1/2 signalnog puta na razvoj kolitisa.

A) Promjene u tjelesnoj masi miševa, izražene kao srednja vrijednost smanjenja postotka početne mase B) Indeks aktivnosti bolesti kroz pokusni period C) Duljina debelog crijeva izoliranog iz miševa petog dana pokusa D) Reprezentativne makroskopske slike debelog crijeva E) Promjene u masi slezene izolirane iz miševa petog dana pokusa F) Omjer mase slezene i tjelesne mase. Rezultati su prikazani 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.

#### 4.4. INHIBICIJA ERK1/2 SIGNALNOG PUTA SMANJUJE ZAŠTITNO DJELOVANJE LUTEOLINA TIJEKOM RAZVOJA KOLITISA

Temeljem prethodno opisane skale bodovanja izračunat je mikroskopski indeks oštećenja tkiva debelog crijeva ispitivanih skupina miševa. Na slici 10A prikazana je zdrava sluznica debelog crijeva s pravilno raspoređenim kriptama. U skupini miševa koja je tretirana ERKi sluznica je identična sluznici netretiranih, kontrolnih životinja (slika 10B). Oštećenje epitela pokazano je skupinama miševa koji su tretirani DSS bilo u kombinaciji samo s ERKi ili još uz luteolin (slika 10C, D i E). Međutim, primjena ERKi u tretmanu miševa s DSS-om izazvanim kolitisom je uzrokovala značajnije oštećenje tkiva debelog crijeva u usporedbi s tkivom miševa koji su tretirani samo DSS-om (slika 10D). S druge strane, iako je primjena luteolina u kotretmanu s ERKi neznatno smanjila mikroskopsko oštećenje tkiva debelog crijeva miševa s DSS-om izazvanim eksperimentalnim kolitisom u usporedbi s mikroskopskim oštećenjem tkiva debelog crijeva miševa s DSS-om izazvanim eksperimentalnim kolitisom nakon primjene ERK inhibitorom zasebno, to smanjenje nije bilo statistički značajno (slika 10E i F).

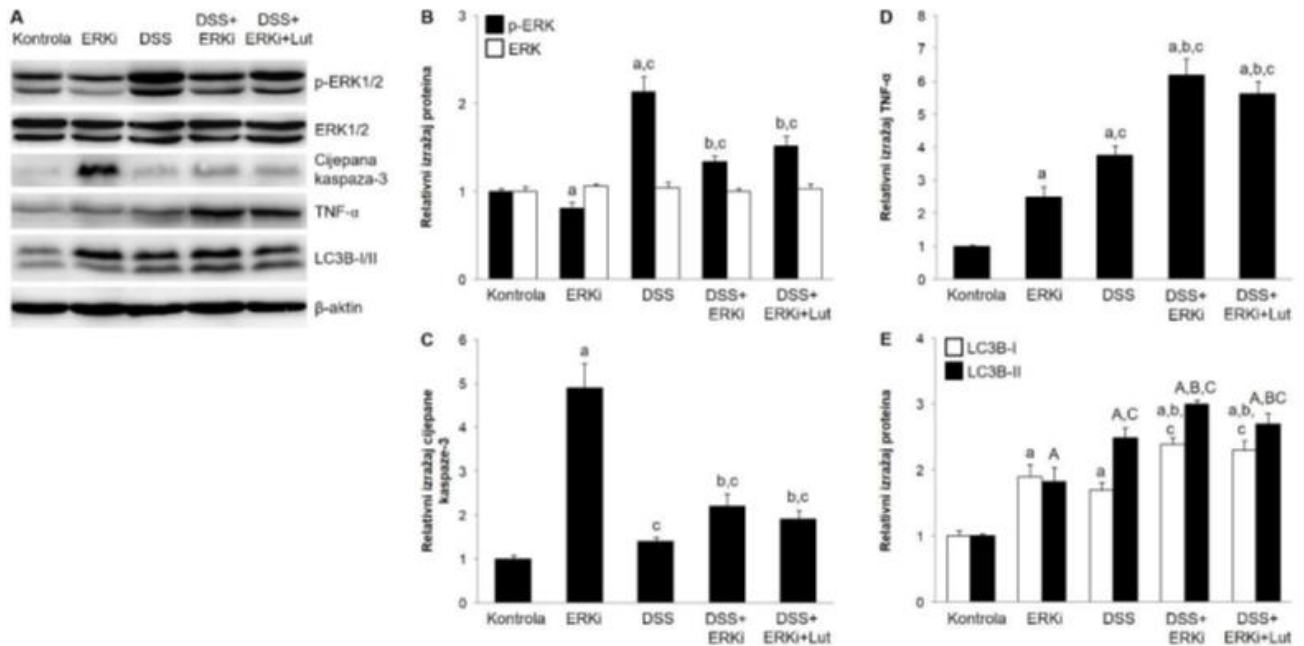


Slika 10. Utjecaj inhibicije ERK1/2 signalnog puta na histopatološke promjene u tkivu debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa.

Reprezentativne slike tkiva debelog crijeva miševa obojenog hematoxilin/eozinom A) kontrolna grupa, B) tretirana ERKi, C) tretirana DSS-om D) tretirane DSS+ERKi E) tretirane DSS+ERKi+Lut 100 mg/kg Povećanje 100x. ► područje gubitka vrčastih stanica, promjene arhitekture kripti i oštećenja mukoze; \* područje infiltracije upalnih stanica; → označava područje krvarenja; Δ područje submukoznog edema. F) Prikaz mikroskopskog indeksa oštećenja ispitivanih skupina. Brojčani rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. a:  $P < 0,05$  statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolnom skupinom; b:  $P < 0,05$  statistički značajna razlika u usporedbi sa DSS skupinom.

#### 4.5. INHIBICIJA ERK SIGNALNOG PUTA SMANJUJE UTJECAJ NA IZRAŽAJ PROTEINA

Na slici 11. prikazan je izražaj ERK proteina, TNF- $\alpha$  proteina te proteina koji sudjeluju u procesu apoptoze i autofagije. Uslijed inhibicije ERK molekule došlo je do porasta izražaja TNF- $\alpha$  proteina u ERKi skupini u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je tretman DSS-om statistički značajnije povećao izražaj TNF- $\alpha$  u odnosu i na kontrolnu, i na ERKi skupinu miševa, ukazujući tako povećanje upalnog procesa u tkivu (slika 11A i D). Izraženije povećanje izražaja TNF- $\alpha$  uočeno je nakon predtretmana miševa s DSS-om izazvanim eksperimentalnim kolitisom primjenom ERK inhibitora za koje je pokazano da je statistički značajno u odnosu na kontrolnu, ERKi i DSS skupinu. Blago sniženje izražaja TNF- $\alpha$ , iako ne statistički značajno, bilo je vidljivo kod miševa s DSS-om izazvanim eksperimentalnim kolitisom nakon kotretmana ERK inhibitorom i luteolinom u usporedbi s primjenom samo ERK inhibitora, no ono nije bilo statistički značajno. Izražaj TNF- $\alpha$  je u DSS+ERKi+Lut skupini bio statistički značajno veći u usporedbi s kontrolnom skupinom te skupinama u kojima su miševi bili tretirani samo DSS-om ili samo ERKi-om.



Slika 11. Izražaj proteina tijekom razvoja kolitisa uslijed inhibicije ERK signalnog puta  
 A) Reprezentativni imunoblotovi ispitivanih proteina B) relativni izražaj pERK i ERK u ispitivanim skupinama C) relativni izražaj cijepane kaspaze 3 D) relativni izražaj TNF- $\alpha$  E) relativni izražaj LC3B-I/II. Vrijednosti proteina su normalizirane prema  $\beta$ -aktinu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  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; c, C:  $P < 0,05$  statistički značajna razlika u odnosu na ERKi skupinu;

## 5. RASPRAVA

UK je okarakteriziran kao idiopatska kronična upalna bolest gastrointestinalnog sustava. U većini slučajeva zahvaća završni dio debelog crijeva. Prilikom razvitka upale, upalne stanice kao što su monociti, privlače se, te unutar tkiva dolazi do njihova dozrijevanja, odnosno do nastanka aktivnih makrofaga i mastocita. Makrofagi i mastociti, stanice su koje proizvode i otpuštaju upalne posrednike tipa histamina, citokinina i sličnih koji mogu privući ostale upalne stanice. Naspram makrofaga, u upalnom mikrookolišu mogu se pronaći i ostale stanice kao što su to NK stanice, dendritičke stanice, limfociti, leukociti, neutrofilni, ali i eozinofili. Neki od najvažnijih upalnih čimbenika svakako su MCP-1, čimbenik rasta krvožilja (VEGF, engl. *Vascular endothelial growth factor*), čimbenici stimulacije rasta kolonija (CSF-1, engl. *Colony stimulator factor 1*) koji su odgovorni za nakupljanje upalnih stanica kao i pokretanje mehanizma ključnih prilikom razvitka upale (8, 25, 26).

Dosad provedena istraživanja uvelika su pomogla oko shvaćanja patofizioloških mehanizama prilikom razvoja UK zbog čega je zabilježen rast broja pokusnih modela. No, kako to u praksi biva, istraživanja su pokazala kako se ne može osloniti samo na jedan model jer isti ne zadovoljava sve segmente istraživanja upalnih bolesti crijeva, već je potrebno modele birati ovisno o segmentu koji želimo istražiti. Onaj model, koji se najčešće koristi prilikom istraživanja UK, svakako je model izazvan primjenom DSS-a kako je prethodno opisano. DSS model ponajprije je dobro prihvaćen zbog velike sličnosti s humanim modelom, zatim zbog jednostavnosti induciranja bolesti te na koncu zbog dobro reproducibilnosti. Ovaj model primjenjuje se per os, na način da ga se otopi u vodi za piće. Također, koristi ga se u različitim koncentracijama (1-5%), ali i u različitim duljinama primjene (5-7 dana u slučaju akutnog kolitisa). Isto tako, valjalo bi spomenuti da se za aktivaciju UK koriste samo DSS molekularne mase 40-50 kDa. Kao odgovor na DSS model, u organizmu

dolazi do oštećenja sluznice crijeva, dok je aktivacija imunološkog odgovora sekundarni odgovor (13).

Za potrebe ovog diplomskog rada želio se istražiti mehanizam djelovanja luteolina na UK. Za vrijeme razvoja kolitisa, na sistemskoj razini, došlo je do razvoja simptoma koji se pojavljuju kako u životinjskom, tako i u humanom obliku bolesti. Za vrijeme napretka upalnog procesa, a prilikom primjene DSS otopine, došlo je do pada tjelesne mase u skupini životinja kod koje se primjenjivao samo DSS model. S druge strane, u skupini životinja kod kojih se uz DSS primjenjivao i luteolin u dozi od 100 mg/kg gubitak tjelesne mase bio je značajno niži. Što se tiče indeksa aktivnosti bolesti, on se pogoršavao povećanjem upale, ali kao što je slučaj i s gubitkom tjelesne mase, on se smanjio primjenom luteolina. Isto tako pokazalo se da je primjena luteolina smanjila ekspresiju TNF- $\alpha$  što je u skladu s našim prethodnim istraživanjima u kojima je pokazano da luteolin smanjuje nuklearnu translokaciju NF- $\kappa$ B. Kada se sve zajedno uzme u obzir, može se zaključiti kako luteolin zaista ima protuupalni učinak. Shodno tome, daje se na znanje da luteolin sprječava razvoj i napredovanje UK ukoliko ga se primjenjuje za vrijeme njegove indukcije.

MAPK signalni su najznačajniji mehanizmi regulacije različitih procesa u eukariotskim stanicama. U njihovoj aktivaciji sudjeluje velik broj podražaja i molekula, uključujući hormone i čimbenike rasta koji djeluju putem različitih obitelji receptora (27). Fosforilacijom na treoninu (Thr) i tirozinu (Tyr), MAPK se aktiviraju te koordiniraju aktivaciju transkripcije gena uključenih u staničnu proliferaciju, diferencijaciju, razvoj, upalni odgovor i apoptozu, zbog čega imaju važnu ulogu u fiziologiji stanice (28). No, osim u fiziološkim procesima, MAPK sudjeluju i u patološkim procesima, uključujući i UK. Najznačajniji članovi MAPK obitelji su ERK1/2, JNK i p38, a do sada je u UK-u najviše istražena uloga JNK-a i p38 (29). ERK signalni put odgovoran je za regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije, migracije i apoptoze (30). U razvoju upalnog procesa u crijevu, pretpostavlja se da ERK, pri čemu se prvenstveno misli na ERK1/2 izoformni

oblik, može imati dvojaku ulogu. S jedne strane, aktivacija ERK1/2 je uključena u proces narušavanja funkcije intestinalne barijere koji je potaknut povećanjem TNF- $\alpha$ , patogenog čimbenika značajnog za razvoj UBC-a. S druge strane, aktivacija ERK1/2 potiče preživljavanje stanica važnih za obnavljanje intestinalne barijere (31). Analizom stanica izoliranih iz humanih uzoraka nakon biopsije pokazan je pretjerani izražaj aktivnog ERK1/2 (32). U istraživanju Seidelina i sur. pokazano je da je u UK ERK signalni put uglavnom aktiviran u intestinalnim epitelnim stanicama u kojima sprječava apoptozu stanica potaknutu povećanjem proizvodnje TNF- $\alpha$  (33). Nadalje, Zimmerman i sur. su pokazali da aktivacija ERK signalnog puta u intestinalnim epitelnim stanicama u UK ima značajnu ulogu u obnovi epitela (34). Suprotno navedenom, ERK1/2 posreduje aktivnost signalnih puteva potaknutih citokinima u stanicama imunološkog sustava i kolonocitima te tako sudjeluje u razvoju i napredovanju UBC-a (32). Dakle, učinak aktivacije ERK signalnog puta u UK značajno ovisi o tipu stanica u kojima je ERK aktivan, ali i o stimulusima koji su odgovorni za njegovu aktivaciju.

Kako bi se utvrdilo je li aktivacija ERK1/2 mehanizam uz pomoć kojeg luteolin ublažava razvoj kolitisa u istraživanju je primjenjen MEK inhibitor, koji inaktivira protein koji se nalazi uzvodno od ERK-a i sudjeluje u njegovoj aktivaciji. Rezultati su potvrdili pretpostavku da je aktivacija ERK1/2 neophodan za zaštitni učinak luteolina kod DSS induciranog kolitisa. Nadalje, rezultati su pokazali da je pogoršanje upale, uslijed inhibicije ERK signalnog puta, nastaje kao posljedica povećanja apoptoze. Kako je ERK1/2 neophodan za zaštitni učinak luteolina kod DSS induciranog kolitisa, povećanje upale prethodilo je i povećanju ekspresije TNF- $\alpha$  koja pridonosi razvoju UK. Budući da ekspresija TNF- $\alpha$  kod miševa koji su tretirani DSS i inhibitorima ERK-a nije bila pod utjecajem dodatka luteolina, implicira se da je ERK1/2 nužan za protuupalni učinak luteolina u liječenju DSS induciranog kolitisa.



Nadalje, uloga ERK1/2 u razvoju i progresiji autofagije tijekom razvoja UK još nije dovoljno istražena. U svom istraživanju Miao i sur. (27) pokazali su da zaštitna uloga aktivacije autofagije u liječenju kolitisa apinetinom *in vitro* i *in vivo* nije bila povezana s putem ERK1/2. U ovom istraživanju pokazano je kako je posljedica autofagije inhibicija ERK1/2, te je ona bila više izražena u miševa s DSS induciranim kolitisom. Obzirom na pokazano, može se reći da je inhibicija ERK1/2 u ovom slučaju umanjila zaštitne učinke luteolina tijekom razvoja kolitisa pokazujući povećanje upalnog odgovora.

Budući da je pokazano da luteolin ima prooksidacijsko, antioksidacijsko i protuupalno djelovanje, te ga se može pronaći u raznim namirnicama koje pogoduju boljem razvitku čovjekova organizma, na temelju provednog istraživanja možemo pretpostaviti da bi luteolin mogao biti dostojan dodatak konvencionalnoj terapiji, ali i učinkovit terapijski kandidat za liječenje UK, no potrebno je provesti daljnja istraživanja.

## **6. ZAKLJUČAK**

1. Luteolin je ublažio kliničke simptome kolitisa, te ima protuupalni učinak
2. Luteolin tijekom razvoja DSS kolitisa potiče aktivaciju ERK proteina
3. Zaštitni učinak luteolina posredovan je ERK signalnim putem.

## 7. LITERATURA

1. Levine A, Griffi A, Markowitz J i sur.; Pediatric modification of Montreal classification for inflammatory: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(6):1314-21.
2. HUCUK – Ulcerozni kolitis; Hrvatsko udruženje za Chronovu bolest i ulcerozni kolitis, Zagreb 2015. Dostupno na: <https://hucuk.hr/ulcerozni-kolitis/>
3. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut.* 2006 ;55(6):749-53.
4. Baghaei A, Emami MH, Adibi P, Tavakkoli H, Daghaghzadeh H, Tamizifar B, i sur.; Inflammatory Bowel Disease Registry and Monitoring: Feasibility Study and Application (Isfahan Inflammatory Bowel Disease Surveillance Project). *Int J Prev Med.* 2019;10:190.
5. Dignass A, Eliakim R, Magro F i sur.; Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis Part 1: Definitions and diagnosis. *J Crohn's Colitis* 2012;6:965-90.
6. Truelove SC, Witts, LJ; Cortisone in ulcerative colitis; Final report on therapeutic trial, *Br Med J* 1955;2:1041-8.
7. D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG. i sur.; 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.
8. Abdulla M, Mohammed N. A Review on Inflammatory Bowel Diseases: Recent Molecular Pathophysiology Advances. *Biologics.* 2022;16:129-40.
9. B. Vucelić i sur.: *Gastroenterologija i hepatologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2002.
10. M. Katičić: Indeksi aktivnosti upalnih bolesti crijeva, *Acta Med Croatica*, 2013;67:93-110.

11. Š. Ozimec: Zdravstvena njega internističkih bolesnika, Visoka zdravstvena škola, Zagreb, 2003.
12. Vuković D; Zdravstvena njega oboljelih od ulceroznog kolitisa; završni rad 2015.
13. Derrick D, Eichele and KUsam K Kharbanda. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. World J Gastroenterol. 2017; 23(33):6016-29.
14. Katsandegwaza B, Horsnell W, Smith K. Inflammatory Bowel Disease: A Review of Pre-Clinical Murine Models of Human Disease. Int J Mol Sci. 2022;23(16):9344.
15. Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2015;1(2):154-70.
16. S. Caporali, A. De Steefano, C. Calabrese i sur.; Anti-Inflammatory and Active Biological Properties of the Plant-Derived Bioactive Compounds Luteolin and Luteolin 7-Glucoside. Nutrients 2022;14(6):1155.
17. Jeong SH, Kim HH, Ha SE, Park MY, Bhosale PB, Abusaliya A i sur.; Six Selected Flavones and Their Related Signaling Pathways That Induce Apoptosis in Cancer. Int J Mol Sci. 2022;23(18):10965
18. M. Ernješ; Određivanje polifenola i flavonola u propolisu UV-VIS spektrofotometrijom – završni rad 2017
19. Chen Z, Zhang B, Gao F, Shi R.; Modulation of G2/M cell cycle arrest and Apoptosis by luteolin in human colon cancer cells and xenografts. Oncol Lett 2018;15:1559-65.
20. Hayasaka N, Shimizu N, Komoda T, Mohri S. i sur.: Absorption and metabolism of luteolin in rats and humans in relation to *in vitro* anti-inflammatory effects. J Agric Food Chem 2018;66:11320-29.

21. Shimoi K, Okada H, Furugori M, Goda T, Takase S. *i sur.*; Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7 – O – beta – glucoside in rats and humans. *FEBS Lett* 1998;438:220-24.
22. Nishitani Y, Yamamoto K, Yoshida M, Azuma T, Kanazawa K, Hashimoto T, *i sur.*; Intestinal anti-inflammatory activity of luteolin: role of the aglycone in NFκB inactivation in macrophages co-cultured with intestinal epithelial cells. *Biofactors* 2013;39:522–33.
23. Karrasch T, Kim JS, Jang BI, Jobin C. The flavonoid luteolin worsens chemical-induced colitis in NF-κ<sup>BEGFP</sup> transgenic mice through blockade of NF-κB-dependent protective molecules. *PLoS One* 2007;2:e596
24. 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;97:486–96.
25. Medzhitov R, Origin and Physiological roles of inflammation; *Nature* 2008; 454:428-35.
26. Singh S, Anshita D, Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int Immunopharmacol.* 2021;101(Pt B):107598.
27. Miao, Y, Lv, Q, Qiao, S, Yang, L, Tao, Y, Yan, W. *i sur.*; Alpinetin improves intestinal barrier homeostasis via regulating AhR/suv39h1/TSC2/mTORC1/autophagy pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2019;384:114772.
28. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001;81:807–69.
29. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002;12:9–18.
30. Wei J, Feng J. Signaling pathways associated with inflammatory bowel disease. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2010;4:105–17.

31. Sun Y, Liu WZ, Liu T, Feng X, Yang N, et al.; Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct Res* 2015;35:600–604.
32. Broom OJ, Widjaya B, Troelsen J, Olsen J, Nielsen OH. Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease?. *Clin Exp Immunol* 2009;158:272–80.
33. Chen D, Xiong Y, Lin Y. Dual role of MAPK pathway in the regulation of intestinal barrier function. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:E16
34. Seidelin JB, Coskun M, Vainer B, Riis L, Soendergaard C, Nielsen OH. ERK controls epithelial cell death receptor signaling and cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP) in ulcerative colitis. *J Mol Med (Berl)* 2013;91:839–49.

## 8. PRILOZI

### POPIS SLIKA:

Slika 1. Ulcerozni kolitis

Slika 2. Prikaz zahvaćenosti debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa

Slika 3. Promjene sluznice tijekom razvoja ulceroznog kolitisa

Slika 4. Mehanizam djelovanja natrijevog dekstran sulfata (DSS) tijekom razvoja kolitisa

Slika 5. Kemijska struktura luteolina

Slika 6. Plan primjene natrijevog dekstran sulfata (DSS), ERK inhibitora (ERKi) i luteolina

Slika 7. Utjecaj luteolina na kliničke parametre tijekom razvoja kolitisa

Slika 8. Utjecaj luteolina na izražaj ERK1/2 proteina u debelom crijevu tijekom razvoja kolitisa

Slika 9. Utjecaj inhibicije ERK1/2 signalnog puta na razvoj kolitisa

Slika 10. Utjecaj inhibicije ERK1/2 signalnog puta na histopatološke promjene u tkivu debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa

Slika 11. Izražaj proteina tijekom razvoja kolitisa uslijed inhibicije ERK signalnog puta

### POPIS TABLICA:

Tablica 1. Montrealska klasifikacija aktivnosti bolesti u ulceroznom kolitisu

# ŽIVOTOPIS

## OSOBNJE INFORMACIJE

Sara Varda

Supetarska Draga 237, 51280 Rab (Hrvatska)

0989914433

[saravarda95@gmail.com](mailto:saravarda95@gmail.com)

## OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

05/10/2020-danas

Diplomski sveučilišni studij Sanitarnog inženjerstva

Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

06/10/2014-25/09/2019

Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarnog inženjerstva

Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

06/09/2010-16/05/2014

SSS- Jezična gimnazija

Prva Sušačka hrvatska gimnazija u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

10/09/2001-18/06/2010

Osnovna škola

Osnovna škola SEI-Belvedere, Rijeka (Hrvatska)

Osnovna škola Kozala, Rijeka (Hrvatska)

## OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik

hrvatski

Strani jezici

engleski  
talijanski

| RAZUMIJEVANJE |         | GOVOR               |                    | PISANJE |
|---------------|---------|---------------------|--------------------|---------|
| Slušanje      | Čitanje | Govorna interakcija | Govorna produkcija |         |
| B2            | B2      | B2                  | B2                 | B2      |
| B2            | B2      | B2                  | B2                 | B2      |

Stupnjevi:A1 i A2-Početak; 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