

IZRAZAJ BIOMARKERA APOPTOZE U AKUTNOM KOLITISU

Varda, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:090986>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Sara Varda

IZRAŽAJ BIOMARKERA APOPTOZE U AKUTNOM KOLITISU

Završni rad

Rijeka 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Sara Varda

IZRAŽAJ BIOMARKERA APOPTOZE U AKUTNOM KOLITISU

Završni rad

Rijeka 2019.

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

Završni rad obranjen je dana 25. rujna 2019. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci,
pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc.dr.sc. Lara Batičić
2. Doc.dr.sc. Slađana Bursać
3. Izv.prof.dr.sc. Dijana Detel

Rad ima _____ stranica, _____ slika, _____ tablica, _____ literaturnih navoda.

SAŽETAK

UVOD: Ulcerozni kolitis (UK) je idiopatska kronična upalna bolest gastrointestinalnog sustava praćena mnogim komplikacijama. Upala zahvaća sluznicu debelog crijeva i to najčešće završni dio debelog crijeva, a etiopatogeneza nije u potpunosti razjašnjena. Istraživanja ukazuju kako upala nastaje u interakciji niza čimbenika uključujući genetsku predispoziciju, imunološki sustav, mikroorganizme i okoliš. U organizmu, morfološki razlikujemo tri vrste stanične smrti, jedna od njih je apoptoza ili programirana stanična smrt. Apoptoza je proces koji sudjeluje u regulaciji održavanja tkivne homeostaze, a njezini poremećaj može dovesti razvoja mnogih oboljenja uključujući imunološke i degenerativne te tumora. Pokazano je da stupanj apoptoze, kako upalnih tako i epitelnih stanica, utječe na brzinu razvoja i intenzitet upalnog procesa. Brojna istraživanja ukazuju da hrana bogata klorogenim kiselinama pogoduje ljudskom zdravlju te da imaju antioksidativni i protuupalni učinak.

CILJ: Cilj predloženog istraživanja je ispitati izražaj pro- i protuapoptotskih molekula u kolitisu te utjecaj klorogenične kiseline (KGK) na razvoj upale i aktivaciju procesa apoptoze.

MATERIJALI I METODE: U sklopu provedbe istraživanja korišteni su C57BL/6 miševi u kojih je primjenom 2,5% otopine natrijevog dekstran sulfata (DSS) kroz sedam dana izazvan pokusni model kolitisa. Procjena uspostave i intenziteta kolitisa praćena je na dnevnoj bazi putem pojavnosti i intenziteta markera upalnog procesa te izračunom indeksom aktivnosti bolesti. Na proteinskoj razini, u tkivu debeloga crijeva, pratila se promjena izražaja pro- i protuapoptotskih molekula.

REZULTATI: Tijekom primjene DSS otopine zabilježen je pad tjelesne mase, porast indeksa aktivnosti bolesti te oštećenje sluznice kod svih ispitivanih skupina životinja. Međutim, u skupini miševa kod kojih se je uz DSS primijenila KGK gubitak tjelesne mase značajno je

manji, a također i indeks aktivnosti bolesti. U upalno promijenjenom tkivu životinja kod kojih je primjenjena samo DSS otopina, u odnosu na kontrolnu skupinu, pojačan je izražaj Bax, kaspaze 9, cijepane kaspaze 8, a smanjen izražaj Bcl-2 i kaspaze 8. Primjena KGK dovodi do obrata izražaj istih, a stupanj promjene ovisan je o primjenjenoj dozi.

ZAKLJUČAK: Primjena KGK značajno utječe na intenzitet kolitisa te na izražaj pro- i protuapoptotskih molekula. Stoga, rezultati studije ukazuju da bi se KGK mogla koristiti u terapiji upalom posredovanih bolesti.

Ključne riječi: Ulcerozni kolitis, apoptoza, klorogenična kiselina, animalni modeli.

SUMMARY

ROLE OF APOPTOSIS BIOMARKERS IN ACUTE COLITIS

INTRODUCTION: Ulcerative colitis (UC) is an idiopathic chronic inflammation of gastrointestinal system, accompanied with wide variety of extraintestinal manifestations. Inflammation affects colon's mucous, most often final portion of the large intestine and etiopathogenesis of inflammation is still not fully understood. There are 3 types of cell death in multicellular organism, one of them is being apoptosis well known as programmed cell death. Apoptosis plays a fundamental role in human development and tissue homeostasis. Aberrant regulation of apoptosis is linked with a various disease, including immunological and developmental disorders, and cancer. According to vast number of studies, food rich with chlorogenic acids favours human health and has antioxidative and anti-inflammatory impact.

AIM: The aim of the proposed study was to investigate the expression of pro- and anti-apoptotic molecules in DSS colitis and the influence of chlorogenic acid (CHA) on the development of inflammation and the activation of the apoptosis.

MATERIALS AND METHODS: In the current study male C57BL/6 mice were used. Colitis was induced by by administration of 2,5%. DSS in driking water for seven days. Evaluation of colitis development and severity was monitored daily through occurence and intensity of clinical markers and by calculation of disease activity index. Analysis of results established disease activity indeks. At the protein level, changes in the expression of pro- and anti-apoptotic proteins were observed in the colon tissue.

RESULTS: During the administration of the DSS solution, a decrease in body weight, and increase in the disease activity index, and mucosal damage in all groups of animals were observed. However, CHA supplementation attenuated weight loss significantly and conequently disese activity index was lower. A increased expression of Bax, caspase 9,

cleaved caspase 8 and decreased expression of Bcl-2 and caspase 8 was determined in mice treated only with DSS in comparison to the control group. Treatment with CHA dose-dependently influenced on the expression of proapoptotic and antiapoptotic molecules.

CONCLUSION: The appliance of KGK significantly affects colitis development as well as the expression of pro and antiapoptosis molecules. The results of the study suggest that CHA could be useful for the treatment of inflammation.

KEY WORDS: ulcerative colitis, apoptosis, chlorogenic acid, animal models

SADRŽAJ

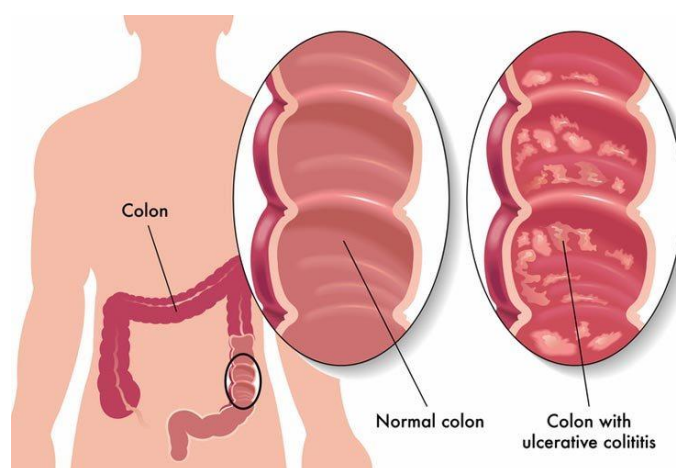
1. Uvod i pregled područja rada.....	1
1.1. Ulcerozni kolitis.....	1
1.1.1. Povijest.....	3
1.1.2. Epidemiologija.....	3
1.1.3. Patohistološke promjene tijekom razvoja UK.....	4
1.1.4. Klinička slika.....	4
1.1.5. Dijagnoza.....	5
1.1.6. Terapijski postupci.....	6
1.2. Animalni modeli.....	6
1.3. Apoptoza.....	8
1.3.1. Izvršitelji apoptoze.....	10
1.3.2. Mehanizmi pokretanja apoptoze.....	10
1.3.3. Određivanje i karakterizacija apoptoze.....	13
1.4. Klorogenična kiselina.....	16
1.4.1. Farmakokinetika klorogenične kiseline.....	18
1.4.2. Mehanizam djelovanja.....	19
1.4.3. Uloga klorogenične kiseline u modulaciji upalnog odgovora.....	19
2. Cilj istraživanja.....	21
3. Materijali i metode.....	22
3.1. Protokol izazivanja kolitisa i primjene KGK.....	22
3.2. Uspostava animalnog modela kolitisa.....	22
3.3. Hematoksilin-eozin bojanje tkivnih preparata.....	23
3.4. Homogenizacija tkiva i određivanje koncentracije proteina.....	24
3.5. Razdvajanje proteina i imunodetekcija.....	24

3.6. Etički aspekt istraživanja na eksperimentalnim životinjama.....	25
3.7. Statistička obrada podataka.....	26
4. Rezultati.....	27
4.1. Razvoj kolitisa – klinička manifestacija.....	27
4.2. Patohistološke promjene sluznica crijeva tijekom razvoja kolitisa.....	31
4.3. Promjene izražaja pro- i protuapoptotskih proteina u debelom crijevu u akutnoj fazi kolitisa.....	33
5. Rasprava.....	35
6. Zaključak.....	38
7. Literatura.....	39
8. Prilozi.....	42
9. Životopis.....	43

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA RADA

1.1. ULCEROZNI KOLITIS

Ulcerozni kolitis (UK) možemo okarakterizirati kao idiopatsku kroničnu upalu gastrointestinalnog sustava, a svrstavamo ga u upalne bolesti crijeva, zajedno s Chronovom bolesti. Iako između navedena dva patomorfološka oblika postoji mnoštvo različitosti, sličnost nalazimo u kliničkoj slici i epidemiologiji. U novije doba podjela upalnih bolesti crijeva proširila se na nedeterminirani/nediferencirani kolitis i pouchitis, odnosno upalu zdjeličnog ilealnog rezervoara napravljenog nakon proktokolektomije. Treći oblik bolesti – nedeterminirani kolitis, karakterističan je po tome što se na temelju kliničke slike, fizikalnog pregleda odnosno cjelokupne dijagnostičke obrade, ne može sa sigurnošću razlikovati ima li oboljeli Crohnovu bolest ili UK.

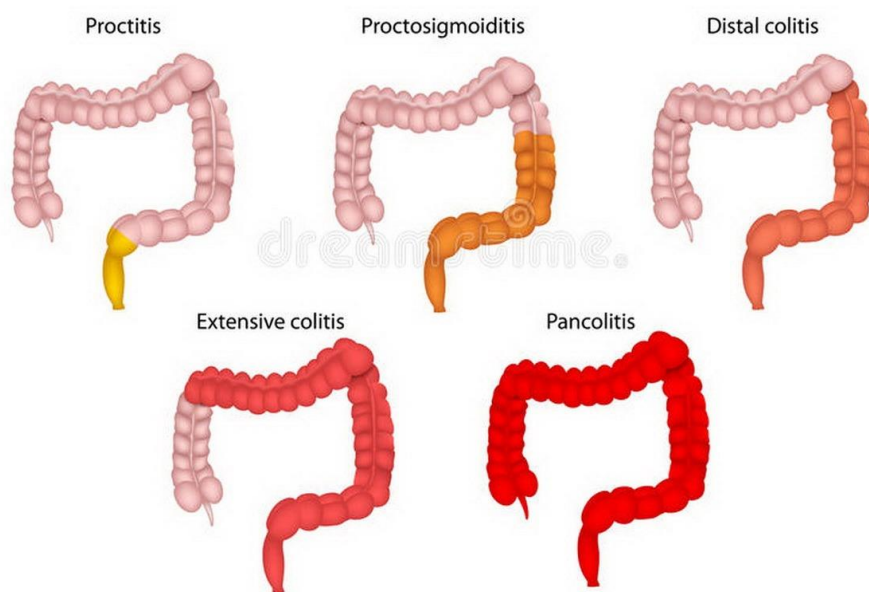


Slika 1. *Ulcerozni kolitis*

Preuzeto sa: https://www.mydr.com.au/wp-content/uploads/2019/04/ulcerative_colitis_750.jpg?w=750&h=500&crop=1

Prema Levine i sur. (1) UK zahvaća sluznicu debelog crijeva i to najčešće rektum, završni dio debelog crijeva. Prema Montrealskoj klasifikaciji iz 2005., odnosno stupnju zahvaćenosti debelog crijeva, razlikuju se (2):

- ulcerozni proktitis (zahvaćen samo rektum) i proktosigmoiditis
- lijevostrani ulcerozni kolitis (proširanje na kolon distalnije od lijenalne fleksure) ili distalni kolitis
- ekstenzivni (prošireni) kolitis (proširenje proksimalnije od lijenalne fleksure, uključujući i pankolitis)



Slika 2. *Stupnjevi zahvaćenosti debelog crijeva tijekom razvoja ulceroznog kolitisa*

Preuzeto sa: <https://prirodanadar.rs/wp-content/uploads/2018/04/Kolitis-i-alternativne-terapije-za-ulcerozni-kolitis-i-tipovi-ulceroznog-kolitisa.jpg>

U kliničkoj slici, a obzirom na aktivnost bolesti koja se određuje prema kliničkim kriterijima i procjeni endoskopske aktivnosti, bolest se može klasificirati kao remisija, blaga, umjerena i teška (3). Kao klinički kriterij za procjenu intenziteta bolesti koristi se Truelove Witts indeks (4), dok se Mayo kliničko-endoskopski indeks koristi za ukupnu procjenu, što uključuje aktivnost i proširenost bolesti (5).

1.1.1. POVIJEST

U 19. stoljeću otkriven je električni sigmoidoskop pomoću kojeg se omogućilo promatranje unutrašnjosti crijeva te je time ostvaren prvi napredak u prepoznavanju upalne bolesti crijeva. Zatim se u 20. stoljeću prepoznaju dvije najveće upalne bolesti crijeva – UK i Chronova bolest. Tako je 1895. godine Samuel Wilks prvi put opisao UK kao novi dijagnostički entitet, a 1939. godine tvrdnja da je bacilarna dizenterija uzrok UK u potpunosti je odbačena. Godine 1909. Hawkins opisuje detaljan tijek bolesti i pojavu mogućih simptoma (6).

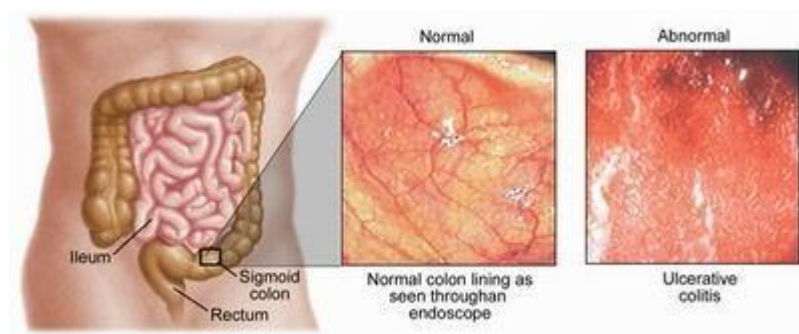
1.1.2. EPIDEMIOLOGIJA

Incidencija UK veća je u industrijaliziranim zemljama i kreće se od 0,6 – 24,5 na 100 000 stanovnika godišnje. Najveća pojavnost UK je u dobnoj skupini od 20 – 40 godina, a zabilježena je i veća pojavnosti u dobi od 60 do 80 godina. Najčešća je u muškaraca, a učestalo se javlja u Europljana, Židova i bijelaca. U povijesti bolesti može se naći pozitivna obiteljska anamneza. UK nastaje međudjelovanjem okolišnih i genetskih čimbenika što izaziva poremećaj imunološkog odgovora. Smatra se da je doprinos genetskih faktora u nastanku bolesti u odnosu prema faktorima okoliša oko 40%. Pušenje ima povoljno djelovanje kod razvoja UK, što se objašnjava povećanim izlučivanjem sluzi koja ima zaštitnu ulogu. Ulcerozni kolitis je poligenetska bolest (7).

1.1.3. PATOHISTOLOŠKE PROMJENE TIJEKOM RAZVOJA UK

Upalni proces počinje u rektumu te se zatim širi u proksimalnom smjeru. Upala zahvaća sluznicu i podsluznicu debelog crijeva. U blagom stupnju upale sluznica je granulirana, eritematozna i sklona spontanom krvarenju. Kod težih oblika ona je hemoragična, edematozna te često prožeta ulceracijama. Granica između upalom promijenjene i zdrave sluznice u

području dodira jasno se nazire. Kod aktivnog oblika mogu se javiti polipi, dok u fazama remisije sluznica može izgledati normalno, no ipak je blijeda i atrofična posebno tijekom dugotrajne bolesti.



Slika 3. Promjene na sluznici kod ulceroznog kolitisa

Preuzeto sa: [http://4.bp.blogspot.com/-](http://4.bp.blogspot.com/-zsy3EGcWYLA/UTVm5_ui6I/AAAAAAAAAFRQ/I9DEEJk42bg/s1600/ulc-2.JPG)

[zsy3EGcWYLA/UTVm5_ui6I/AAAAAAAAAFRQ/I9DEEJk42bg/s1600/ulc-2.JPG](http://4.bp.blogspot.com/-zsy3EGcWYLA/UTVm5_ui6I/AAAAAAAAAFRQ/I9DEEJk42bg/s1600/ulc-2.JPG)

1.1.4. KLINIČKA SLIKA

Klinička slika varira od bolesnika do bolesnika, čak i u istog bolesnika ovisno o stadiju bolesti. Glavni simptomi su: rektalno krvarenje¹, krvavo-sluzave-proljevaste stolice, tenezmi i urgencija² te abdominalna bol. Proljev biva popraćen velikom količinom sluzi te često krvlju i gnojem. Sistemni simptomi pak uključuju mučnine i anoreksiju te povremeno povraćanje, gubitak tjelesne mase, vrućicu kao i simptome anemije (umor i dispneja). Kod UK javljaju se intestinalne i ekstraintestinalne komplikacije. Neke od intestinalnih komplikacija su (7,8):

- Perianalna bolest (hemeroidi, perianalni apscesi, ..)
- Masivno krvarenje (u manje od 5% bolesnika)
- Pseudopolipi (rezultat hiperplastične regeneracije sluznice)

¹ Rektalno krvarenje – pojava krvi u stolici

² Urgencija – tj „lažni poziv“

- Toksični megakolon (akutna dilatacija kolona na više od 6-7cm u promjeru; najteža je komplikacija bolesti i javlja se u 2-10% bolesnika; smrtnost oko 30%)
- Karcinom kolona (najveći rizik kod bolesnika s pankolitisom i dugotrajnim trajanjem bolesti)

Ekstraintestinalne komplikacije (7, 8):

- Nutritivne i metaboličke (hiokalijemija, hipokalcemija, hipalbumijemija, anemija, deficit vitamina, željeza)
- Hepatobilijarne (česte; masna metamorfoza jetre)
- Hematološke (sideropenična anemija najčešća)
- Zglobne promjene (atralgije, periferni artritis, ankilozantni spondilitis)
- Očna bolest (uveitis)
- Kožne promjene (Erythema nodosum, Pyoderma gangrenosum³)

1.1.5. DIJAGNOZA

Dijagnoza UK postavlja se temeljem kliničkih simptoma te nalazom upaljene sluznice kao i pozitivnim laboratorijskim vrijednostima upalnih parametara. Važne dijagnostičke pretrage, pri postavljanju dijagnoze, su kolonoskopija ili irigografija crijeva te mikrobiološki pregled stolice. Rendgenskom snimkom abdomena moguće je uočiti stupanj zahvaćenosti debelog crijeva te otkriti promjene na hepatobilijarnom i uropoetskom traktu. Krvnom slikom dokazuje se prisutnost anemija ili poremećaj elektrolita (6).

³ Pyoderma gangrenosum – gnojna ulcerirajuća kožna lezija

1.1.6. TERAPIJSKI POSTUPCI

Osnovni cilj terapije je što brža kontrola simptoma, postizanje i održavanje stabilne remisije. Time se želi spriječiti progresivna destrukcija tkiva i razvoj komplikacija. Također, taj pristup poboljšava kvalitetu života bolesnika i prevenira invaliditet.

Farmakološka terapija

Kod blagih oblika koriste se toplički aminosalicilati u obliku klizme. Također, postoje i topički kortikosteroidi i oralni aminosalicilati (manje učinkoviti od topičkih). Uobičajena terapija traje 4-12 tjedana. Klizme i čepići mesalazina daju se svaku večer, a doza se smanjuje svaku drugu ili treću večer. Kronična bolest liječi se oralnim aminosalicilatima kao i odgovarajućom dijetom s dovoljnom količinom proteina i kalorija (9).

Kirurška terapija

Kirurška terapija dijeli se na hitnu, urgentnu i elektivnu. Pri masivnom nekontroliranom krvarenju kao i toksičnom megakolonu nužna je hitna operacija, a za vrijeme teškog kolitisa potrebna je urgentna operacija. U slučaju kada bolest ne reagira na terapiju potrebna je elektivna operacija (9).

1.2. ANIMALNI MODELI

Istraživanja na pokusnim modelima unaprijedila su shvaćanje patofizioloških mehanizama u razvoju bolesti, kako u ranom stadiju razvoja bolesti tako i tijekom same bolesti, te je stoga zabilježen porast broja pokusnih modela. Općenito pokusni modeli kolitisa se mogu podijeliti u nekoliko skupina, ovisno o načinu izazivanja oboljenja: i) spontani ii) potaknuti iii) geneska manipulacija iv) prijenos imunskih stanica. Razlikujemo nekoliko vrsta kemijski potaknutih modela kolitisa. Jedna od mogućnosti je da se nekroza sluznice crijeva te upala crijeva postiže primjenom odgovarajuće doze octene kiseline. Najčešće se koristi 4-5% octena kiselina jer pri većim koncentracijama može doći do perforacije crijeva. Osim octene kiseline kao iritant za induciranje upale gastrointestinalnog trakta koriste se još: jodoacetamid, indometacin, trinitrobenzensulfonska kiselina (TNBS), oksazonon, natrij dekstran sulfat i peptoglikan polisaharid (PG-PS). Endogeni sulfhidridi spojevi poput glutaciona služe kao zaštita crijevne sluznice na modelu jodoacetamida. Vrlo je zanimljiv i često se primjenjuje i prethodno spomenuti TNBS kolitis. Istraživanja su pokazala da niti jedan model ne može zadovoljiti sve aspekte istraživanja upalnih bolesti crijeva. Stoga, izbor pokusnog modela ovisi o segmentu bolesti koja se želi proučavati. Jedan, relativno dugo poznat i jedna od najčešće primjenjivanih pokusnih modela je model kolitisa izazvan primjenom natrijevog dekstran sulfata (engl. *dextran sodium sulfate*) poznatiji kao DSS model. Ovaj model je dobro prihvaćen zbog jednostavnosti induciranja kolitisa, velike sličnosti s humanim oblikom kolitisa te dobre reproducibilnosti. Kombiniranjem različitih koncentracija i dužine primjene DSS-a, na pokusnom modelu, može se izazvati razvoj akutnog i/ili kroničnog oblika bolesti. Osim što nam ovaj model služi za proučavanje kolitisa, vrlo je dobar i za proučavanje razvoja tumora debelog crijeva. DSS je u vodi topljivi, negativno nabijeni sulfatirani polisaharid čija molekularna masa varira od 5 do 1400 kDa. Samo DSS molekularne mase 40-50 kDa se koristi za izazivanje kolitisa. Primjenjuje se *per*

os, otopljen u vodi za piće, u različitom postotku (1-5%) i dužini primjene (5-7 dana u slučaju akutnog kolitisa). DSS oštećuje sluznicu crijeva, aktivacija imunološkog odgovora je sekundarni događaj u cjelokupnom razvoju kolitisa (10). Model je okarakteriziran gubitkom tjelesne težine, proljevom, rektalnim krvarenjem, skraćivanjem crijeva, pojavom čireva na crijevima i infiltracijom neutrofila (11).

1.3. APOPTOZA

U višestaničnim organizmima, stanična smrt je jedan od ključnih procesa. Morfološki razlikujemo tri vrste stanične smrti: apoptoza ili programirana stanična smrt, autofagija i nekroza. Navedeni oblici stanične smrti strogo su regulirani signalnim putevima i molekulama koje se aktiviraju kao odgovor na specifični signal.

Apoptoza, odnosno smrt stanice koju još nazivamo *programiranom smrti stanice* važna je za razvoj organizma i održavanje stanične ravnoteže, gubitka i stvaranja stanica tkiva. Nadalje, ona je temeljni proces u održavanju mase i funkcionalne sposobnosti pojedinih organa, aktivni proces koji zahtjeva trošenje energije i aktiviranje gena neophodnih za sintezu proteina (12). Godine 1972. Kerr i sur. (13) odvojili su apoptozu, na osnovi morfoloških karakteristika, od nekroze i potvrdili njezino postojanje u odraslom organizmu te njeno nastavljanje do smrti. Stanična smrt se aktivira uslijed različitih fizioloških promjena ili patoloških oštećenja, uzrokovanih vanjskim ili unutrašnjim čimbenicima (12). Ako u organizmu postoji poremećaj u pokretanju odnosno aktivaciji procesa apoptoza, to može rezultirati razvojem malignih oboljenja, smanjenoj otpornosti prema kemoterapiji, češćom pojavom virusnih infekcija ili izraženije pojavnosti autoimunih bolesti. S druge strane, prevelik broj apoptoza može izazvati deficijencije imuniteta, kao i razvoj degenerativnih stanja (14, 15).

Nekroza ili akutna patološka smrt je proces koji nastaje nakon opsežnih kemijskih, biokemijskih mehaničkih i sličnih oštećenja stanice. Dugi niz godina se smatralo da je nekroza neorganizirani proces, no danas su otkriveni signalni putevi koji sudjeluju u njezinom pokretanju i regulaciji. Karakteristično je bubrenje i puknuće stanične membrane i organela nakon čega dolazi do izlivanja staničnog sadržaja te na taj način onečišćenja i upalnih promjena okolnog tkiva. (16). Iako razni morfološki, biokemijski i molekularni čimbenici razlikuju apoptozu od nekroze (13), katkad isti uzrok može dovesti do istodobne pojave i nekroze i apoptoze (16). Određena smrt ovisi o koncentraciji nekog štetnog čimbenika ili dužini trajanja njegovog djelovanja, tipu oštećenja uzrokovan navedenim čimbenicima, kao i o vrsti stanica (16). Prema Petriku i suradnicima (17) stanice sklone apoptози podliježu nizu vidljivih promjena na putu do svoje smrti. Pojave koje karakteriziraju apoptozu jesu:

1. kondenzacija kromatina i stvaranje mjehurića na membranama
2. kidanje molekule DNA na ulomke veličine nukleosoma
3. razlaganje citoskeleta i formiranje apoptotičkih tjelešaca

Makrofazi i susjedne stanice odmah prepoznaju i fagocitiraju te apoptotične stanice i stanične fragmente te se na taj način stanice koje umiru apoptozom učinkovito uklanjaju iz organizma, bez izazivanja upalnog procesa. Prilikom apoptoze, fosfatidilserin se premješta na površinu stanice i tamo ga prepoznaju određeni receptori izraženi na fagocitima (12, 18, 19).

Prema Janković i Marković (20) u sisavaca su opisana dva glavna puta stanične smrti, a to su unutarnji i vanjski put, a oba rezultiraju aktivacijom izvršnih kaspaza. Apoptoza koja je pokrenuta putem tzv. „receptora smrti“ obično se naziva vanjskim putem dok je unutrašnji put ovisan o općem stanju stanice i signalima koji se prenose kroz mitohondrije.

Iako postoji poveznica, aktivacija ova dva puta je različita, a oba puta izazivaju karakteristične biokemijske i strukturne promjene stanice svojstvene za apoptozu (15).

1.3.1. IZVRŠITELJI APOPTOZE

Prema Cooperu i suradnicima (18) kaspaze su obitelj proteaze koje imaju cisteinske ostatke u svojim aktivnim mjestima i cijepaju proteinski supstrat na C-terminalnom kraju aminokiseline aspartata. Do sada je poznato 14 enzima, a dijele se na one koje su potrebne za dozrijevanje citokina (kaspaze 1, 4 i 5) koje sudjeluju u upalnim i ostalim procesima u organizmu te one koje su izravno uključene u apoptozu. Kaspaze koje su uključene u proces apoptoze dijele se u dvije skupine:

1. inicijacijske kaspaze (kaspaze 8, 9 i 10)

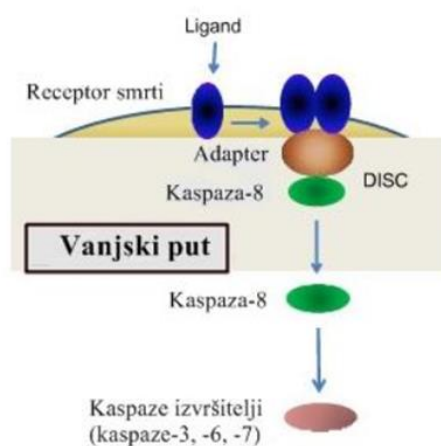
2. izvršne kaspaze (3, 6 i 7)

Kaspaze, uzrokuju apoptozu cijepanjem više od stotinu različitih ciljanih proteina u stanici te ih stoga svrstavamo u konačne izvršitelje programirane stanične smrti. Jedna od najvažnijih meta kaspaza je inhibitor Dnane koji je u svom aktivnom obliku odgovoran za fragmentaciju jezgrine DNA. Sve kaspaze su inaktivne, a postaju aktivne pretvaranjem u aktivni oblik proteolitičkim kidanjem koje kataliziraju druge kaspaze. Inicijatorske kaspaze aktiviraju se kao izravni odgovor na signale koji uzrokuju apoptozu te tada kidaju i aktiviraju efektorske kaspaze koje su odgovorne za razgradnju ciljanih staničnih proteina koji posreduju u događajima apoptoze (18).

1.3.2. MEHANIZMI POKRETANJA APOPTOZE

Kao što je prethodno navedeno razlikuju su dva mehanizma pokretanja apoptoze: vanjski i unutarnji.

Vanjski mehanizam pokretanja apoptoze provodi se vanjskim putem, a aktiviraju ga ligandi⁴ vezanjem za receptore smrti koji pripadaju receptorskoj obitelji tumorskih nekortizirajućih faktora (TNF). Navedenu skupinu čine membranski proteini koji se protežu od unutarnje do vanjske površine membrana stanica. Vezivanje liganada na pripadajući receptor smrti dovodi do trimerizacije receptora i regrutacije adaptorskih proteina te stvaranja signalnog kompleksa koji inducira smrt (DISC⁵). Citoplazmatski dijelovi receptora zovu se *domene smrti*. Pozicioniranjem prokaspaze 8 i 10, ili samo jedne od njih, proksimalno u DISC-u putem efektorske domene smrti doći će do aktivacije kaspaza. Ukoliko je razina aktivacije kaspaze 8 (upravlja daljnjim slijedom događaja) dovoljna aktivirat će se kaspaze 3 te smrt stanice. Ukoliko je razina aktivacije nedovoljna apoptoza će se nastaviti amplifikacijom kroz mitohondrije (12, 20). Gledajući širu sliku, nakon vezanja liganada na receptore doći će do vezivanja molekula prilagodbe i inicijacijske kaspaze na taj kompleks. To će u konačnici dovesti do aktivacije prokaspaza, kidanja izvršnih kaspaza 3 i 7, kidanja jezgrine DNA u fragmente (tzv. „ljestve“) te na kraju do strukturnih promjena (16).



Slika 4. *Vanjski put pokretanja apoptoze*

Preuzeto sa: repozitorij.kemija.unios.hr

⁴ Ligand - molekula ili ion karakterističan po vezivanju u kompleks središnjim metalnim ionom. Mogu imati slobodne elektronske parove.

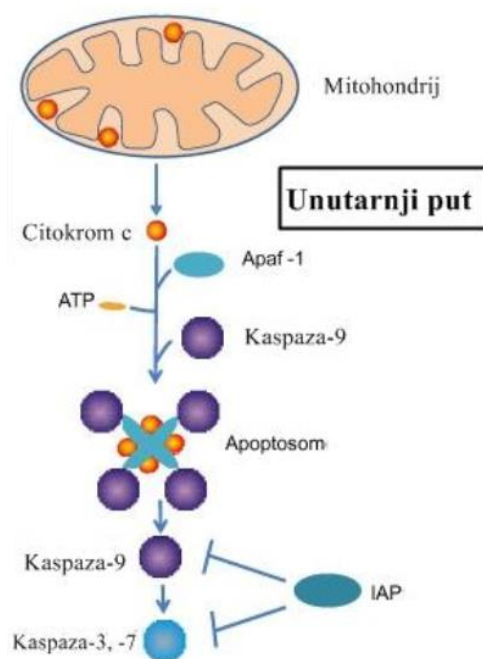
⁵ DISC – engl. *death inducing signaling complex*

Unutarnji mehanizam pokretanja apoptoze ili mitohondrijski put apoptoze najčešći je mehanizam aktivacije, a može biti aktiviran različitim čimbenicima uključujući toksične tvari, virusne infekcije, izlaganju zračenju. Prema Žlender i sur. (12) u unutarnjem putu ključan je protein p53 koji je prisutan u inaktivnom obliku u normalnim stanicama. Njegova funkcija tumorskog supresora daje mu mogućnost da zaustavi proliferaciju stanica. Mnoge tumorske stanice imaju mutiran gen za sintezu tog proteina. Oštećenja DNA potiču nakupljanje proteina p53 u stanici što dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa u G1 fazi te popravljavanja DNA ili pak do pokretanja apoptoze stanice, ukoliko su oštećenja nepopravljiva (12). Prema Janković i Markotić (20) unutarnji put može aktivirati „oštećenje DNA, nedostatak hormona rasta, prisutnost dvolančane RNA, kemoterapijski agensi ili virusna infekcija“. Unutarnji put počinje otvaranjem pora na mitohondrijskoj membrani, zatim otpuštanjem citokroma c iz mitohondrija, stvaranjem Apaf-1⁶ kao i stvaranjem apoptosoma⁷ (16). Apoptosom aktivira prokaspazu 9 i pokreće izvršne kaspaze. Unutarnji apoptotski put ovisan je o ATP-u (adenozin trifosfat) (20). U regulaciji apoptoze ključni su proteini B limfoma tipa 2 (Bcl-2). Oni obuhvaćaju velik broj proapoptotskih i protuapoptotskih proteina (16). Bcl-2 obitelj se može podijeliti u tri podobitelji ovisno o stupnju homologije i funkciji u organizmu: i) podobitelj A uključuje Bcl-2, Bcl-x i Bcl-w koji imaju protuapoptotsku ulogu ii) podobitelj kojoj pripadaju Bax i Bak, a koji imaju proapoptotsku aktivnost; iii) podobitelj kojoj pripadaju Bik i Bid. Prema Žlender i sur. (12) omjer proapoptotskih i antiapoptotskih čimbenika će odrediti osjetljivost svake stanice na apoptozu. Konkretnije, proteini Bcl-2 kontroliraju propustnost mitohondrija oblikovanjem pora na vanjskoj membrani ili reguliranjem mehanizama otvaranja i zatvaranja pora za propusnost (16). U fiziološkim uvjetima proteini Bcl-2, Bcl-xL i Mcl-1, koji pripadaju protuapoptotskoj grupi proteina, tvore heterodimere s proteinima Bax i Bak iz proapoptotske skupine te na taj način blokiraju

⁶ Apaf-1 – *engl.* apoptotic protease activating factor

⁷ Apoptosom – sastavljen od citokroma c, kaspaze-9 i Apaf-1 čimbenika

njihovo djelovanje. Potonje opisano predstavlja mehanizam kojim se održava integritet membrane mitohondrija i sprječava apoptoza.



Slika 5. *Unutarnji put pokretanja apoptoze*
Preuzeto sa: repozitorij.kemija.unios.hr

1.3.3. ODREĐIVANJE I KARAKTERIZACIJA APOPTOZE

Prema Živković i sur. (16) metode koje se koriste za otkrivanje prisutnosti apoptoze mogu se podijeliti na:

1. Morfološke tehnike
2. Imunohistokemijske tehnike
3. Biokemijske tehnike
4. Imunološke tehnike
5. Tehnike molekularne biologije

Morfološke tehnike podrazumijevaju korištenje svjetlosnog mikroskopa pomoću kojeg se može otkriti većina strukturnih promjena. Prilikom otkrivanja apoptoze na kulturama stanica u *in vitro* uvjetima često se uvode i dodatni testovi boje s ciljem olakšavanja diferencijacije živih stanica u odnosu na one u kojima je započela apoptoza (21,22). Prvi homogeni test vijabilnosti stanica je MMT. Žive stanice s aktivnim metabolizmom će konvertirati MMT u ljubičasti formazan. Kada stanice umiru, one gube mogućnost konverzije MMT-a u formazan. Na taj način se promjenom boje raspoznaju žive stanice. Postupkom bojenja stanica tripanским plavičkom razlikuju se nekrotične od apoptičnih stanica⁸ (22). Prema Ulukaya i sur. (22) i Žlender i sur. (21) razlika između živih i mrtvih stanica bolje se uočava pomoću fluorescentne mikroskopije. Pri navedenoj mikroskopiji koriste se Hoechst, propidijev jodid i akridin oranž kao boje. Međutim, kod detekcije apoptoze zlatnim standardom se smatra elektronski mikroskop (22). Morfološke promjene tada su najuočljivije te je to specifična i osjetljiva tehnika, ali također samo kvalitativna metoda zbog zahtjevne pripreme materijala i ograničenog broja stanica koje se mogu istraživati (17).

Imunohistokemijske tehnike odnose se na aneksin V⁹ sa fluorescentnom bojom poput fluorescein izocijanat otkriva fosfatidilserin koji se translocira na vanjsku stranu membrane (17,21,22). Jedna od istaknutijih metoda je TUNEL¹⁰ koja se koristi za označavanje jednostrukih i dvostrukih prekida lanaca uz terminalnu deoksiribonukleotidil-transferazu (12). Ta metoda omogućava otkrivanje apoptoze na razini jedne stanice (16). TUNEL se odnosi na obilježavanje 3'-OH krajeva uz pomoć nukleotida označenog fluorescein-izotiocijanatom te stvaranjem kompleksa fluorescein-deoksiuridin-trifosfat (dUTP) (21). Osjetljivost TUNEL metode ograničena je otkrivanjem kasne apoptoze kada se događa intranukleosomna

⁸ Žive stanice ostaju neobojane, mrtve se oboje plavo (22)

⁹ Aneksin V – protein iz skupine aneksina koji označen fluorescentnim bojama veže fosfatidilserin (16)

¹⁰ TUNEL – engl. *terminal deoxynucleotidyl transferase Mediated dUTP nick and labeling*

degradacija DNA. Tada se obojaju i neke nekrotične stanice, ne samo apoptotične te je može doći do pogrešnog zaključka (16).

Biokemijske tehnike odnose se na proučavanje raznim tehnikama gel-elektroforeze poput konvencionalne gel-elektroforeze i elektroforeze u pulsirajućem polju. Tehnike se zasnivaju na proučavanju fragmentiranih DNA u stanicama. Tijekom apoptoze aktivirane endonukleaze kidaju DNA u ulomke. Nakon provedene konvencionalne elektroforeze na agaroznom gelu fragmenti DNA izgledat će poput ljestvi. Ograničavajući faktor te metode je potreba relativno velikog broja stanica u apoptozi kako bi se degradacijski produkti mogli zapaziti (17). Metoda izbora za proučavanje apoptotične kaskade u vezi sa staničnim tipom, poticajem i trajanjem apoptoze je protočna citometrija (15). Ona omogućava analizu većeg broja stanica u kratkom vremenu (17).

Imunokemijske tehnike ističu M30 antigen, to jest degradiran citokeratin 18, kao novi biopokazatelj apoptoze. Kvantitativno se može odrediti imunoenzimskim ELISA¹¹ testom (22). Pomoću ELISA metode mogu se također detektirati i citoplazmatski fragmenti DNA, a koriste se monoklonska protutijela za DNA i histone. Za detekciju apoptoze koristi se aktivnost efektorskih kaspaza koje kidaju vitalne dijelove stanice, a najveću primjenu i pouzdanost ima lamin B¹². Pomoću antitijela za lamin B može se imunohistokemijski odrediti pozitivan signal, odnosno prstenasto obojenje stanica koje nisu u apoptozi i negativan signal stanica koje su u kasnijoj fazi apoptoze (21). Prema Ulukayai sur. (22) fluorometrijskom metodom određuje se aktivnost kaspaza u kulturi stanica. Intenzitet fluorescencije ovisit će o aktivnosti kaspaze u uzorku.

Tehnike molekularne biologije odnose se na DNA miccroarray kao novu metodologiju kojom se u samo jednoj reakciji može otkriti mnogo gena vezanih za apoptozu. Primjerice,

¹¹ ELISA – engl. *enzyme-linkedimmunosorbent assay* (22)

¹² Lamin A, B, C glavni su strukturni proteini jezgrine ovojnice, a nalaze se na njenoj unutrašnjoj strani (21)

može se analizirati 84 gena ili dijelova gena u jednoj reakciji koristeći mikrotitarsku pločicu od 96 jažica uz pomoć RT-PCR-a (22).

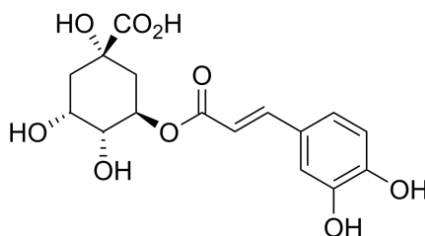
1.4. KLOROGENIČNA KISELINA

Klorogene kiseline svrstavaju se u grupu polifenolnih spojeva. One su esteri kiničnih i hidroksicimetnih kiselina, i to najčešće kafeinske, ferulinske i *p*-kumarinske kiseline. Klorogene kiseline se mogu podijeliti prema:

- 1) vrsti esterskog supstituenta,
- 2) broju esterskog supstituenta
- 3) položaju acilnog ostatka

Mogu se pronaći u hrani i piću biljnog podrijetla poput: zelene kave, čajeva, jabuka, artičoka, mrkve, rajčice.

Klorogenična kiselina (KGK) ester je kafeinske i kinične kiseline, koji djeluje kao intermedijar u biosintezi lignina (23). Polifenolna skupina estera odnosi se na „klorogenu kiselinu“ kao i na hidroksicinaminsku kiselinu (kafeinsku, ferulinsku i *p*-kumarinsku kiselinu) s kininskom kiselinom (24).



Slika 6. Strukturna formula klorogenične kiseline

Velikim brojem istraživanja dokazano je da hrana bogata klorogenim kiselinama pogoduje ljudskom zdravlju. Ustanovljeno je da klorogene kiseline imaju izražen antioksidativni učinak te pozitivan učinak na bolesti poput: dijabetesa tipa 2, karcinoma, neurodegenerativnih bolesti (Parkinsonova i Alzheimerova bolest) i kardiovaskularnih bolesti.

Prema Tomac i sur. (23) kava je glavni izvor hranjivih klorogenih kiselina, pa tako i klorogenične kiseline kod ljudi. Umjereno konzumiranje ima blagotvoran učinak na zdravlje, a dokazano je i da kava ima najveću koncentraciju polifenola među analiziranim napitcima. Međutim, dokazalo se da je konzumacija čaja, vina te raznih biljnih infuzija kao i voćnih sokova povezana s smanjenjem razvoja kroničnih bolesti, a osim toga sadrže i klorogene kiseline u različitim koncentracijama. KGK ublažava oksidativni stres te neželjene učinke povezane s neravnotežom unutarstaničnog redoksa. Također, prema Liang i sur. (24) KGK aktivacijom različitih metaboličkih i signalnih putova pokazuje i protuupalno djelovanje. Također KGK je važan sekundarni metabolit s raznim ulogama u biljkama. Primjerice, poboljšava zaštitu od UV zračenja i povećava otpornost na mikroorganizme. Prema Loungo de Matos (25) KGK svoj antioksidativni učinak, kao i svi polifenoli, ostvaruje putem slijedećih mehanizama:

- prijenos vodikovog atoma
- sekvencijski proton gubitak elektrona
- jedan elektronski prijenos-proton prijenos
- protonski povezni prijenos elektrona
- stvaranje radikalnih produkata
- pojedinačni prijenos elektrona
- sekvencijalni proton gubitak vodikovog atoma

Navodi se nekoliko izomernih oblika KGK te svaki izomer ima svoje podgrupe. Drugi izomer KGK je kriptoklorogeninska kiselina (3 - CQA) te neoklormenska kiselina (5 - CQA). IUPAC

1976. godine mijenja redoslijed numeriranja na kiselom kininskom prstenu te je stoga predložena da klorogen mijenja 3 – CQA u 5 – CQA. Ipak, u današnje vrijeme većina kemijski dobavljača koristi prijašnji naziv IUPAC nomenklature KGK kao 3 – CQA. Osim što, kao što je prethodno navedeno, KGK djeluje antiinflamatorni i antioksidacijski, KGK ima i važnu ulogu pri utjecaju na lipide i metabolizam glukoze. Dokazano je da primjena KGK dovodi do smanjenja koncentracija lipoproteina visoke gustoće u plazmi te povećanja ukupnog kolesterola i koncentracije lipoproteina male gustoće u plazmi. Također, KGK izolirana iz ekstrakta zelene kave najučinkovitiji je agens u snižavanju krvnog tlaka u pacijanta s blagom hipertenzijom. Nadalje, KGK ima bakteriocidni učinak posebno prema: *Helibacteru*, *Stenotrophomonas maltophilije*, *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* (26).

1.4.1. FARMAKOKINETIKA KLOOROGENIČNE KISELINE

Prisutstvo KGK pokazano je u krvi zajedno sa svim metabolitima (ferulna, kafeinska i izoferulska kiselina) prilikom istraživanjima na ljudima i životinjama. Primjerice, nakon svakodnevne konzumacije kave kafeinsku kiselinu moguće je pronaći u cirkulaciji. Prilikom konzumacije određenih pića i hrane unosi se i KGK, međutim ona se ne hidrolizira u želudcu nego se u intaktnoj formi apsorbira – jednom trećinom u tankom crijevu. Podrobnije, 30% klorogenih kiselina apsorbirat će se u tankom crijevu dok će 70% unesene klorogenične kiseline prolazi kroz tanko crijevo do debelog crijeva. U debelom crijevu podliježu djelovanju mikrobiote debelog crijeva, točnije fenolna kiselina metabolizira se uz pomoć gastrointestinalne mikroflore te se nakon toga apsorbira. Količina koja se apsorbirala u tankom crijevu vrlo brzo, već nakon 30 minuta, ulazi u krvotok te se dalje metabolizira u jetri. Brzim ulaskom u krvotok te razgradnjom u jetri smanjuje se bioraspoloživost klorogenične kiseline. Pri fiziološkim koncentracijama bioraspoloživost klorogenične kiseline je oko 1% što stvara ograničavajući faktor u kliničkoj primjeni.

Cijepanje kinične kiseline iz FQA¹³ i CQA vrši se u tankom crijevu, a biokemijskim se putem oslobađa ferulna kiselina. Pretvorbu KK i ferulinske kiseline u dihidroferulinske kiseline te mehanizam apsorpcije odvija se u debelom crijevu (26).

1.4.2. MEHANIZAM DJELOVANJA

Točan mehanizam djelovanja još uvijek nije poznat. Pretpostavka je da KGK svoje pozitivne učinke na organizam ostvaruje putem nekoliko mehanizama. Prema dosadašnjim istraživanjima dobro su proučeni antioksidativni i antiinflamatorni učinak. Prema istraživanju Ma i sur. (27) dokazano je da primjena KGK smanjuje izražaj biljeg makrofaga (F4/80, CD68, Cd11b, i Cd11c) u masnom tkivu i protuupalnih medijatora, uključujući TNF- α i monocitni kemotaktički protein 1 (MCP-1)¹⁴. Osim toga, dokazno je da KGK inhibira aktivaciju PPAR γ koji potiče ulazak masnih kiselina u jetru. Stoga se izvodi zaključak da KGK svoj antioksidativni učinak ostvaruje supresijom upalnog procesa i sprječavanjem akumulacije masti u masnom tkivu (27).

1.4.3. ULOGA KLOROGENIČNE KISELINE U MODULACIJI UPALNOG ODGOVORA

Upala je fiziološki te strogo kontrolirani odgovor na ozljedu tkiva. Može biti rezultat egzogenih te najčešće endogenih čimbenika. U egzogene čimbenike pripadaju bakterije, virusi, alergeni, strano tijelo ili toksična tvar. Endogeni čimbenici s druge strane se razvijaju te uzrokuju upalu kao posljedicu poremećaja u funkciji određenog tkiva ili organskog sustava.

Upalni proces omogućuje brzo uspostavljanje homeostaze tkiva. Međutim, u određenim uvjetima upala može biti nekontrolirani proces koji posljedično dovodi do razvoja

¹³ FQA – feruloilna kininska kiselina

¹⁴ MCP-1 – engl. *Monocyte chemotactic protein – 1*

akutnih i kroničnih bolesti. Protuupalni lijekovi moduliraju ili inaktiviraju signalne molekule ili upalne medijatore koji posreduju u aktivaciji nekontroliranog upalnog procesa te time imaju svrhu spriječiti ili kontrolirati upalni proces. (28). Prema Lawrence i sur. (29) nuklearni transkripcijski čimbenik-kappa B (NF- κ B) ključna je molekula u aktivaciji protuupalnih citokina, kemokina i adhezijskih molekula. Važnu ulogu ima i ciklooksigenazni put kojim se proizvode velika skupina protuupalnih molekula.

Kako je ranije navedeno, KGK pokazuje protuupalno djelovanje. Prema Shan i sur. (30) na Caco-2 stanicama pokazano je da svoje protuupalno djelovanje KGK postiže kroz regulaciju lučenja citokina, uključujući interleukin (IL)-8, IL-6 nakon stimulacije s TNF- α i IL-1 β . Također, KGK smanjuje lučenje IL-1 β , TNF- α i IL-6 u lipoproteinom stimuliranim RAW264.7 makrofazima i BV2 mikroglia stanicama, te to čini kroz regulaciju aktivacije NF- κ B i JNK/AP1 signalnog puta.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj predloženog istraživanja je ispitati utjecaj KGK na razvoj kolitisa i izražaj pro- i protuapoptotskih molekula.

Kako bismo testirali postavljenu hipotezu specifični ciljevi jesu:

1. 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 pro- i protuapoptotskih molekula 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 KGK

U sklopu provedbe istraživanja korišteni su C57BL/6 miševi uzgojeni u uzgojnom centru Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Primjenom 2,5% otopine DDS kroz sedam dana izazvan je pokusni model kolitisa. Klorogenična kiselina primjenjivala se *per os* u dozi od 100 mg/kg ili 200 mg/kg, i to jednom dnevno od trećeg dana pokusnog perioda do žrtvovanja. Tijekom pokusnog perioda kontrolne skupine životinja konzumirale su tekuću vodu *ad libitum*.

3.2. USPOSTAVA ANIMALNOG MODELA KOLITISA

Procjena uspostave kolitisa određivala se na dnevnoj bazi praćenjem pojavnosti i intenziteta markera upalnog procesa: konzistencije stolice, tjelesne težine, općeg stanja životinja i pojave krvi u stolici, to jest vidljivog krvarenja u području rektuma. Prisutstvo krvi u stolici dokazano je uz pomoć Hemocult II SENSE testa (Beckman Coulter, USA). Svi parametri pojedinačno su bodovani prema kriterijima navedenim u tablici 1. 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 određena masa i dužina te je, nakon što je isprano u fiziološkoj otopini, podijeljeno 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.

Tablica 1. Kriteriji za izračun indeksa aktivnosti bolesti

Bodovi	Gubitak tjelesne mase (%)	Konzistencija stolice	Rektalno krvarenje
0	<5%*	Normalna stolica	Nije prisutno
1	5-10%		
2	10-15%	Mekana stolica (ljepljiva i poluformirana)	Blago krvarenje
3	15-20%		
4	>20	Dijareja (tekuća stolica)	Jako krvarenje

3.3. HEMATOKSILIN-EOZIN BOJANJE TKIVNIH PREPARATA

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 hematoksilin-eozin (HE) bojanja tkivni preparati se moraju deparafinirati te se rezovi tkiva, adherirani na predmetnim stakalcima, uranjaju u otopinu ksilola 3 puta po 5 minuta. Nakon deparafinizacije slijedi rehidracija, a u tu svrhu preparati se uranjaju u otopinu etanola opadajuće koncentracije (dva puta po 100 %, 90 %, 70 % te 50 %) kroz 4 minute. Nakon rehidracije preparati se ispiru u destiliranoj vodi kroz 4 minute, a zatim slijedi postupak bojanja. 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 u trajanju od pet minuta, a

postupak se ponavlja tri puta. Potom se predmetna stakalca s obojenim preparatima suše na sobnoj temperaturi, a na kraju postupka se obojani preparat prekrije pokrovnim stakalcem.

3.4. HOMOGENIZACIJA TKIVA I ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA

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

3.5. RAZDVAJANJE PROTEINA I IMUNODETEKCIJA

Nakon određivanja koncentracije proteina pripremljeno je 50 μg 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 te u prisutnosti detergenta. Nakon završene elektroforeze, proteini su preneseni 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 provjerena je bojanjem membrane bojom Ponceau S. Nakon prijenosa proteina s gela na membranu, membrana 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, pripremljena su primarna protutijela u odgovarajućim razrjeđenjima i inkubirana membrana s primarnim protutijelom (Bcl2, razrjeđenje 1:100, Abcam 7973; Bax, razrjeđenje, 1:200, Santa Cruz 526; kaspaza-9, razrjeđenje 1:1000, Abcam 185719), kaspaza-8 p18, razrjeđenje, 1:500, Santa Cruz 5263) 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije s primarnim protutijelima membrana se ispirala 3 puta po 5 min otopinom za ispiranje nakon čega je uslijedila inkubacija s otopinom sekundarnog protutijela koje je pripremljeno u razrjeđenju 1:2000. Membrana se inkubirala sa sekundarnim protutijelom u trajanju od 1 sat na tresetici na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije membrane sa sekundarnim protutijelom membrana se, još jednom, ispirala tri puta otopinom za ispiranje - svako pranje u trajanju od 5 minuta. Detekcija signala provela se uz pomoć SignalFire Elite ECL Reagent i skenera (Allianze 4.0, Cambridge, UK). U postupku je korišteno i kontrolno protutijelo β -actin (1:10000, ab8226).

3.6. ETIČKI ASPEKT ISTRAŽIVANJA NA EKSPERIMENTALNIM ŽIVOTINJAMA

Istraživanja koja su 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.

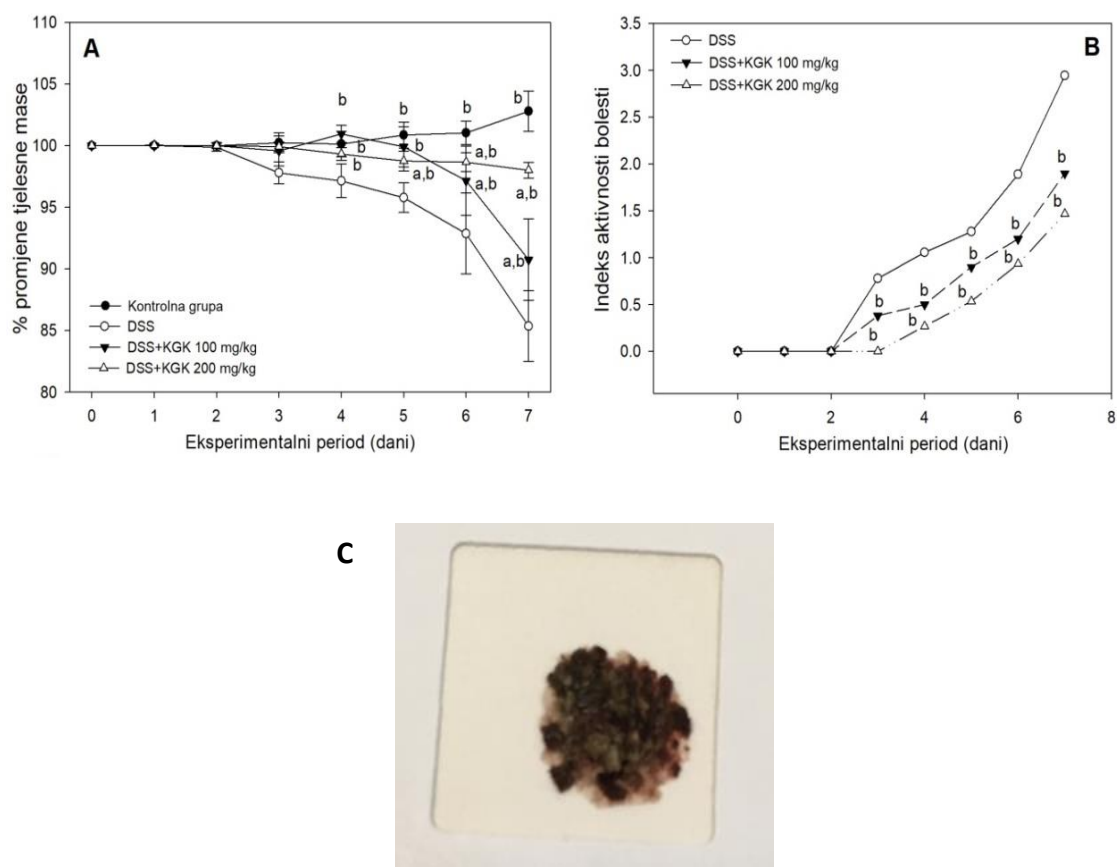
3.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Brojčani podatci pohranjeni su u bazu podataka koristeći program Microsoft Excell. 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.

4. REZULTATI

4.1. RAZVOJ KOLITISA – KLINIČKA MANIFESTACIJA

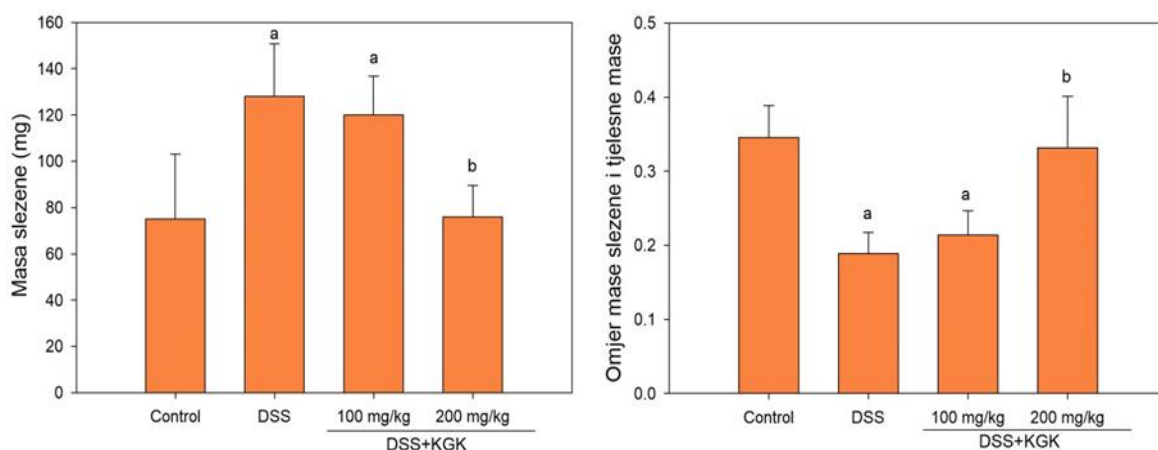
Tijekom razvoja kolitisa došlo je, na sistemskoj razini, do razvoja kliničkih simptoma koji su vrlo slični kliničkim simptomima koji se pojavljuju u humanom obliku bolesti. Također, zabilježene su makroskopske i mikroskopske promijene koje upućuju na razvoj oboljenja. Kao što je prikazano, tijekom primjene DSS otopine, odnosno napredovanjem upalnog procesa zabilježen je pad tjelesne mase kod svih ispitivanih skupina životinja, osim kod kontrolne skupine. U skupini miševa kod kojih je primijenjena samo otopina DSS uočen je značajano veći pad tjelesne mase u odnosu na sve ispitivane skupine miševa (slika 7A). 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 većoj dozi odnosno u dozi od 200 mg/kg. U miševa kod kojih je primijenjena samo otopina DSS te u skupini miševa kod kojih je DSS otopina primijenjena u kombinaciji s KGK u akutnoj fazi kolitisa, zabilježena je pojava krvi u stolici (slika 7C) te promjena konzistencije stolice. Promjena konzistencije stolice odvijala se postepeno od mekane stolice koja se pojavljuje četvrtog i/ili petog dana pokusnog perioda, do proljeva. Sedmog dana pokusnog perioda stolica proljev je bio prisutan u gotovo svih 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 7. Utjecaj kolitisa i klorogenične kiseline (KGK) na dužinu crijeva i aktivnost bolesti

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) Pozitivan nalaz krvi u stolici u akutnoj fazi kolitisa. a-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu b- statistički značajna razlika u odnosu na skupinu miševa kod kojih je primjenjena samo DSS otopina. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD izuzev promjene tjelesne mase. n = 6-7 miševa/skupina.

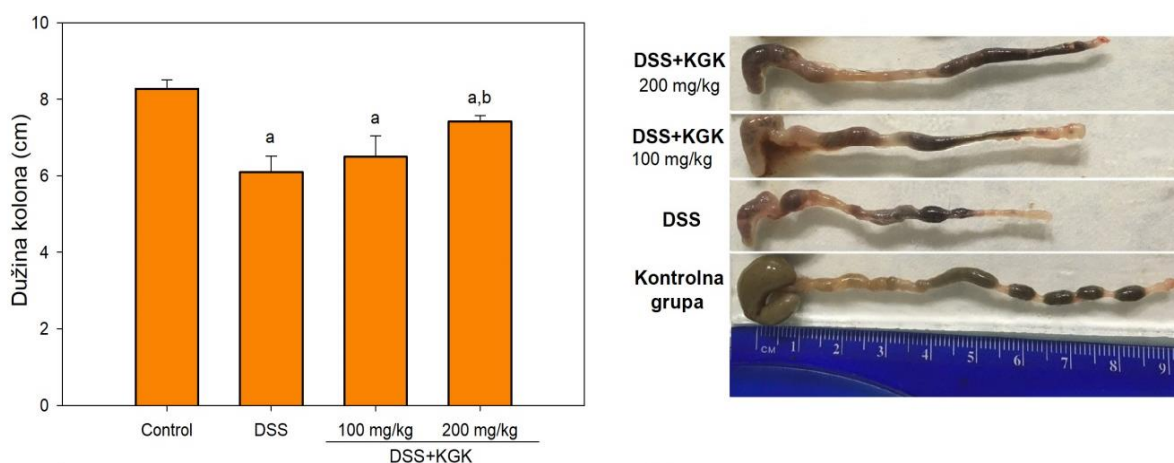
Od sistemskih promjena prisutna je i promjene mase slezene (slika 8). Uočeno je da se razvojem kolitisa povećava masa slezene. Porast mase slezene je najjače izražen u skupini miševa u kojoj je primjenjena samo otopina DSS. Iako je u skupini miševa koji su uz DSS primali i KGK zabilježen porast mase slezene, taj porast je bio značajno manji nego u skupini miševa koji su uz DSS otopini primili KGK u dozi od 100 mg/kg odnosno 200 mg/kg. Obzirom da su miševi izgubili na tjelesnoj masi i da je gubitak najveći u skupini miševa koji su primili samo DSS otopinu omjer mase islezene i tjelesne mase najmanji je upravo u navedenoj skupini miševa, a dobivene vrijednosti su značajne u usporedbi s kontrolnom skupinom.



Slika 8. Utjecaj klorogenične kiseline (KGK) na masu slezene tijekom kolitisa izazvanog primjenom natrijevog dekstran sulfata (DSS).

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.

Prilikom žrtvovanja izdvojilo se debelo crijevo od cekuma do anusa te je tom segmentu izmjerena dužina i težina. Dužina debelog crijeva predstavlja lokalni klinički parametar koji nam indirektno govori o intenzitetu upalnog procesa te se u odnosu na upalni proces odnosi obrnuto proporcionalno. Promjene na razini debelog crijeva prikazane su grafički i slikovno (slika 9). Kako je vidljivo na slici u skupini miševa kod kojih je primijenjena samo DSS otopina došlo je do značajnog skraćenja debelog crijeva dok je u skupinama kod kojih je primijenjena KGK u kombinaciji s otopinom DSS skraćenje prisutno ali je manje nego u DSS otopini i ovisno je o primijenjenoj dozi. U skladu s navedenim, najmanje skraćenje zabilježeno je u skupini miševa koji su primili KGK u dozi od 200 mg/kg.

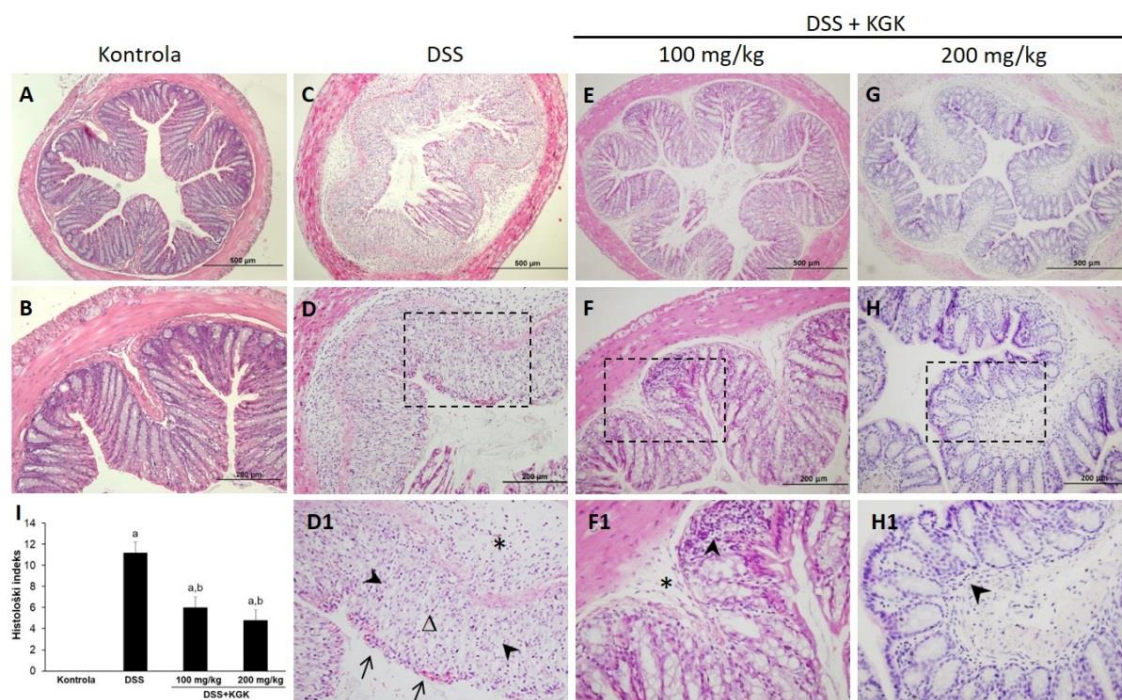


Slika 9. Utjecaj kolitisa i klorogenične kiseline (KGK) na lokalne i sistemske promjene tijekom razvoja kolitisa.

A) Prikaz promjene dužine debelog crijeva tijekom razvoja kolitisa i primjena KGK B) Reprezentativne makroskopske slike kolona kontrolne skupine i tretiranih životinja u akutnoj fazi upale. a-statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu miševa, b-statistički značajno 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 RAZVOJA KOLITISA

Patohistološka analiza tkivnih rezova debelog crijeva potvrdila je postojanje upalnog procesa (Slika 10). Oštećenje debelog crijeva, sedmog dana pokusnog perioda, okarakterizirano je infiltracijom mononuklearnih upalnih stanica. Također, na pojedinim dijelovima sluznice vidljiv je potpuni gubitak sluznice. U oštećenom tkivu može se vidjeti krvarenje. Edem je prisutan u *lamini propri* te u submukoznim djelovima sluznice. U životinja kod kojih je primijenjen tretman s KGK prisutno je oštećenje ali je ono manjeg intenziteta. kao što se može vidjeti iz slike 10F prisutan je edem u lamini propri, te nakupljanje upalnih stanica (10H). Međutim, promjene su lokalizirane na manje dijelove sluznice te nisu prisutna područja s potpunim gubitkom arhitekture sluznice debelog crijeva kao što je to vidljivo kod životinja kod kojih je primijenjena samo otopina DSS. U prilog patohistološkom nalazu idu i rezultati izračuna mikroskopskog indeksa oštećenja. Mikroskopski indeks oštećenja u životinja koje su tretirane samo s DSS otopinom iznosi $11,2 \pm 1,3$. U skupini koja je tretirana s DSS otopinom i klorogeničnom kiselinom u dozi od 100 mg/kg je $6,0 \pm 0,8$, a u životinja koje su tretirane s dozom od 200 mg/kg $4,8 \pm 1$. U kontrolnoj skupini životinja promjene na sluznici uzoraka debelog crijeva nije vidljiva (10A i 10B).

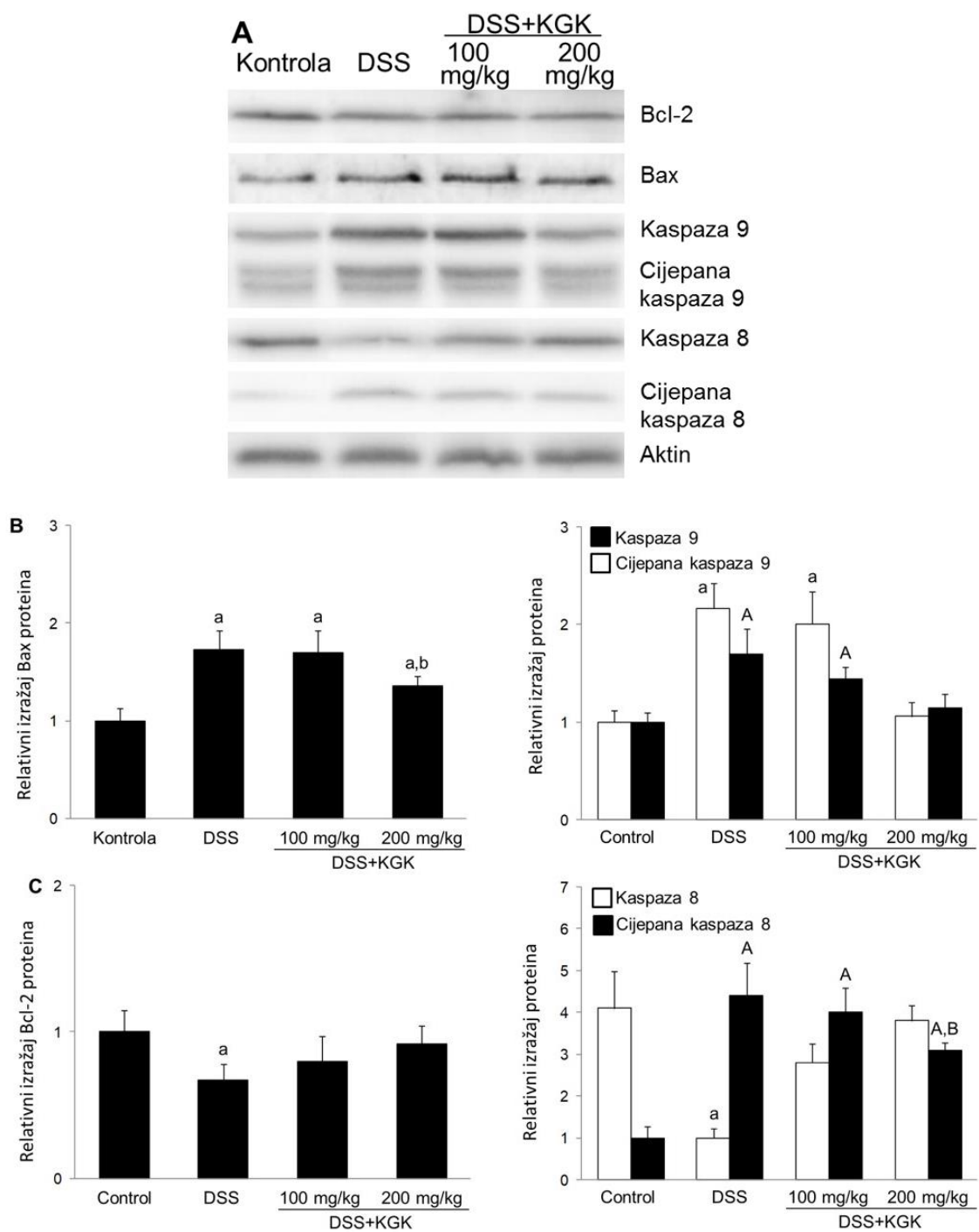


Slika 10. Utjecaj kolitisa i klorogenične kiseline (KGK) na patohistološke promjene sluznice debelog crijeva.

Prikazanu su reprezentativne slike A) i B) kontrolne skupine životinja kod kojih se vidi potpuno očuvana struktura sluznice debelog crijeva, C) i D) miševa kod kojih je primijenjen samo DSS otopina s jakim oštećenjem sluznice, E) i F) miševa tretiranih s 100 mg/kg KGK G) i H) miševi tretirani s 200 mg/kg KGK, I) mikroskopski indeks oštećenja. D1, F1, H1 su uvećana slika označenog dijela. Na uvećanim slikama vidljiv je edem sluznice (*), nakupljanje upalnih stanica, uništenje epitelnih stanica (Δ), krvarenje ($\rightarrow$). Vrijednosti mikroskopskog oštećenja prikazane su kao srednja vrijednost $\pm$ SD. $n=6-7$ miševa. Reprezentativne slike su obojane hemalaun-eozinom. a-statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu, b-statistički značajno u odnosu na skupinu miševa tretiranih samo s DSS otopinom. Povećanje x100 (slike A,C, E, G) i x200 (slike B, D, F, H).

4.3. PROMJENE IZRAŽAJA PRO- I PROTUAPOPTOTSKIH PROTEINA U DEBELOM CRIJEVU U AKUTNOJ FAZI KOLITISA

S ciljem procjene procesa apoptoze, analiziran je izražaj proteina proapoptotskih i protuapoptotskih molekula. Analize izražaja ukazala su na povećanje izražaja Bax u svim ispitivanim skupinama, a u odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim, povećanje izražaja proteina Bax je najmanje izražen u životinja kod kojih je primijenjena KGK u dozi od 200 mg/kg. Kaspaza 9 i cijepana kaspaza 9 pokazuju sličan obrazac proteinskog izražaja. U akutnoj fazi kolitisa izražaj kaspaze 9 i cijepane kaspaze 9 je veći u odnosu na kontrolnu skupinu, a primjena KGK uzrokuje smanjenje izražaja koji je najizraženiji kod doze od 200 mg/kg. Shodno tome, u usporedbi s drugim grupama izražaj Bcl-2 u životinjama tretiranim samo s DDS-om je najmanji. Izražaj kaspaze 8, u odnosu na kontrolnu skupinu, smanjuje se u DSS skupini miševa te u skupinama miševa kod kojih je primijenjena KGK. Vidljivo je da primjena KGK ima pozitivan učinak na izražaj kaspaze 8 jer izražaj raste prema vrijednostima kontrolne skupine nakon primjene KGK. Porast izražaja pokazuje ovisnosti o dozi te je značajno veći u životinjama tretiranim s 200 mg/kg KGK. Nadalje, izražaj cijepane kaspaze 8 je obrnuto proporcionalno povezan s izražajem kaspaze 8 i doze KGK.



Slika 11. Utjecaj kolitisa i klorogenične kiseline (KGK) na izražaj pro- i protuapoptotskih molekula u debelom crijevu.

$n=6-7$ miševa/skupini, a, A- značajno, $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu, B-značajno u odnosu na skupinu tretiranu samo s DSS otopinom.

5. RASPRAVA

Ulcerozni kolitis je idiopatska kronična upalna bolest gastrointestinalnog trakta. Zahvaća sluznicu debelog crijeva, najčešće završni dio debelog crijeva. Tijekom razvoja upale dolazi do privlačenja upalnih stanica poput monocita koji u tkivu dozrijevaju do aktivnih makrofaga i mastocita. Obje vrste stanica proizvode te otpuštaju upalne posrednike poput histamina, citokinina i sličnih koji privlače druge upalne stanice. U upalnom se mikrookolišu osim makrofaga može pronaći i dendritičke stanice, NK stanice, leukocite, neutrofile, euzinofile i limfocite. Najbitniji upalni čimbenici su MCP-1, čimbenik rasta krvožilja (VEGF, engl. *Vascular endothelial growth factor*), čimbenici stimulacije rasta kolonija (CSF-1, engl. *Colony stimulator factor 1*). Oni dovode do nakupljanja upalnih stanica i pokretanja mehanizama ključnih u razvoju upale (6, 28).

Istraživanja na pokusnim modelima unaprijedila su shvaćanje patofizioloških mehanizama u razvoju bolesti te je stoga zabilježen porast broja pokusnih modela. Istraživanja su pokazala da niti jedan model ne može zadovoljiti sve aspekte istraživanja upalnih bolesti crijeva. Stoga, izbor pokusnog modela ovisi o segmentu bolesti koja se želi proučavati. Jedan od najčešće primjenjivanih pokusnih modela je model kolitisa izazvan primjenom natrijevog dekstran sulfata (engl. *dextran sodium sulfate*, DSS) - *DSS model*. Potonji model je dobro prihvaćen zbog jednostavnosti induciranja, velike sličnosti s humanim oblikom bolesti te dobre reproducibilnosti. Samo DSS molekularne mase 40-50 kDa se koristi za izazivanje kolitisa. Primjenjuje se *per os*, otopljen u vodi za piće, u različitom postotku (1-5%) i dužini primjene (5-7 dana u slučaju akutnog kolitisa). DSS oštećuje sluznicu crijeva, a aktivacija imunološkog odgovora je sekundarni događaj u cjelokupnom razvoju kolitisa (10).

Apoptoza ili programirana stanična smrt jedna je od tri vrste stanične smrti koje se razlikuju u višestaničnim organizmima. Važna je za razvoj organizma i održavanje stanične

ravnoteže, odnosno gubitka i stvaranja stanica tkiva. Primjerice, ako u organizmu postoji premali broj apoptoza može doći do razvoja malignih bolesti, povećane otpornosti prema kemoterapiji, učestalih virusnih infekcija ili izraženije pojavnosti autoimunih bolesti. S druge strane, prevelik broj apoptoza može izazvati deficijencije imuniteta, kao i razvoj degenerativnih stanja. U kolitisu, apoptoza je važna jer sudjeluje u regulaciji životnog ciklusa odnosno vijeka upalnih stanica koje se aktiviraju i nakupljaju u zahvaćenom tkivu odnosno na mjestu upale. Nadalje, pokazano je da povećan intenzitet apoptoze može dovesti do uništenja velikog broja epitelnih stanica i narušavanja integriteta mukozne barijere što vodi ka bržem razvoju kolitisa i pojačanom upalnom odgovoru. Pretpostavlja se da je pojačan stupanj apoptoze epitelnih stanica rezultat povećane proizvodnje citokina kao što je TNF- α , IL i drugih proupalnih medijatora. S ciljem procjene procesa apoptoze u našem DSS modelu kolitisa analiziran je izražaj pro- i protuapoptotskih proteina. Analize izražaja ukazala su na povećanje izražaja Bax u svim ispitivanim skupinama, a u odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim, povećanje izražaja proteina Bax je najmanje izraženo u životinja kod kojih je primijenjena KGK u dozi od 200 mg/kg. U akutnoj fazi kolitisa izražaj kaspaze 9 i cijepane kaspaze 9 je veći u odnosu na kontrolnu skupinu, a primjena KGK uzrokuje smanjenje izražaja koji je značajan kod doze od 200 mg/kg. Shodno tome, u usporedbi s drugim grupama izražaj Bcl-2 u životinjama tretiranim samo s DDS-om je najmanji. Izražaj kaspaze 8, u odnosu na kontrolnu skupinu, smanjuje se u DSS skupini miševa te u skupinama miševa kod kojih je primijenjena KGK. Temeljem dobivenih rezultata vidljivo je da primjena KGK ima utjecaj na izražaj pro- i protuapoptotskih molekula, a može se sugerirati da KGK ima protuapoptotski učinak.

Budući da su istraživanja pokazala da hrana bogata klorogenim kiselinama pogoduje ljudskom zdravlju te imaju izražen antioksidativni i antiinflamatorni učinak specifični ciljevi ovog istraživanja bili su usporediti razvoj i intenzitet kolitisa u dvije skupine miševa. Prve,

kod koje je kolitis izazvan primjenom DDS-a te druge, gdje je uz DDS primjenjena i KGK. Tijekom razvoja kolitisa došlo je, na sistemskej razini, do razvoja kliničkih simptoma koji su vrlo slični kliničkim simptomima koji se pojavljuju u humanom obliku bolesti. Također, tijekom primjene DSS otopine, odnosno napredovanjem upalnog procesa zabilježen je pad tjelesne mase. 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 većoj dozi odnosno u dozi od 200 mg/kg. Nadalje, indeks aktivnosti bolesti se povećavao pogoršanjem kliničke slike odnosno jačanjem upale. 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. Temeljem dobivenih rezultata možemo zaključiti da KGK smanjuje intezitet kolitisa, a dobiveni rezultati su u korelaciji s prethodnim istraživanjima. Naša prethodna istraživanja su pokazala da smanjenje izražaja JNK uslijed tretmana s KGK, a s druge strane je pokazano da JNK inhibicija vodi ka smanjenoj proizvodnji proupalnih citokina i infiltracije upalnih stanica. Nadalje, prema Shan i sur. (30) na Caco-2 stanicama pokazano je da svoje protuupalno djelovanje KGK postiže kroz regulaciju lučenja citokina, uključujući interleukin (IL)-8, IL-6 nakon stimulacije s $\text{TNF-}\alpha$ i $\text{IL-1}\beta$. Također, KGK smanjuje lučenje $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ i IL-6 u lipoproteinom stimuliranim RAW264.7 makrofazima i BV2 mikroglia stanicama, te to čini kroz regulaciju aktivacije $\text{NF-}\kappa\text{B}$ i JNK/AP1 signalnog puta. Budući da smo pokazali smanjen stupanj apoptoze, uslijed primjene KGK, potonje se može povezati s pretpostavkom da stupanj apoptoze ovisi o izražaju proupalnih citokina.

Na karaju možemo zaključiti da KGK ima zaštitnu ulogu u razvoju kolitisa te da su daljna istraživanja mehanizama djelovanja KGK neophodna.

6. ZAKLJUČAK

1. Primjena KGK utjecala je na razvoj i na intenzitet kolitisa te se stoga može zaključiti da KGK ima zaštitnu ulogu
2. U tkivu zahvaćenim upalnim procesom dolazi do aktivacije apoptoze, postojanje izraženih proapoptotskih procesa u tkivu koje je aktivno.
3. KGK sudjeluje u modulaciji izražaja molekula uključenih u mehanizme aktivacije programirane stanične smrti
4. Rezultati ukazuju da bi se KGK mogla koristiti u terapiji upalom posredovanih bolesti.

7. LITERATURA

1. Levine A, Griffi A, Markowitz J i dr.; Pediatric modification of Montreal classification for inflammatory
2. M. Katičić: Indeksi aktivnosti upalnih bolesti crijeva, *Acta Medica Croatia*, br.2, studeni 2013;2:93–109.
3. 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;6:965-90.
4. Truelove SC, Witts, LJ; Cortisone in ulcerative colitis; Final report on therapeutic trial, *Br Med J* 1955; 2:1041-8.
5. 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.
6. Vragović J; Upalne bolesti crijeva; završni rad 2015.
7. B.Vucelić i sur.: *Gastroenterologija i hepatologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2002.
8. Š.Ozimec: *Zdravstvena njega internističkih bolesnika*, Visoka zdravstvena škola, Zagreb, 2003.
9. Vuković D; *Zdravstvena njega oboljelih od ulceroznog kolitisa*; završni rad 2015.
10. Derrick D, Eichele and KUsun 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.

11. Derežić I; Inducirani animalni modeli u fiziologiji i imunologiji – seminarski rad 2015.
12. Žlender V., Apoptosis – programmed cell death; Arh Hig Rada Toksikol 2003; 54:267-74.
13. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26:239-57.
14. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol, 2007; 35(4):495-516.
15. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. J Immunol Methods, 2000;243:169-90.
16. Živković D. Učinak DMAG-a i utišavanja Hsp90 na varijabilnost THP-1 stanica, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
17. Petrik J, Rumora L, Juretić D, Čepelak I. Apoptoza – detekcija i kvatifikacija, Biochemia medica, 2003;13:109-17.
18. Cooper GM, Hausman RE. Stanica, Molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2010. Str.143-146; 693-705;330-332.
19. Kujundžić M. i sur. Klinička patofiziologija. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2003.,str 5-7.
20. Janković M., Markotić.A Virusi i apoptoza. Infektološki glasnik. 2007;27(2):63-70.
21. Žlender V., Detection of Apoptosis. Arh Hig Rada Toksikol. 2006;57(7):229-36.
22. Uluykaya E, Acialn C. Ari F., Iktimur E, Yilmaz Y. Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively, Turkish J Biochem, 2011; 36(3):261-9.

23. Tomac I, Šeruga M; Electrochemical properties of Chlorogenic Acids and determination of their content in coffee using differential pulse voltammetry; *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2016;11:2854 – 76.
24. Liang N, Kitts D; Role of Chlorogenic Acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients*. 2015;25;8.
25. Luongo de Matos L, Truffelli DC, Luongo de Matos MG i AParecida da Silva Pinhal M; Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark Insights*. 2010;5:9-20.
26. Naved M, Hejazi V, Abbas M i dr. Chlorogenic acid (CGA): a pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018;67-74.
27. 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.
28. Medzhitov R, Origin and physiological roles of inflammation; *Nature* 2008;454: 428-35.
29. Lawrence T; The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation; *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2009.
30. Shan J, Fu J, Zhao Z, Kong X, Huanf H, Luo L, Yin Z; Chlorogenic acid inhibits lipopoly saccharide – induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation; *Int. Immunopharmacol.* 2003;9:1042-48.

8. PRILOZI

Slika 1. Ulcerozni kolitis

Slika 2. Stupnjevi zahvaćenosti debelog crijeva tijekom razvoja ulceroznog kolitisa

Slika 3. Promjene na sluznici kod ulceroznog kolitisa

Slika 4. Vanjski put pokretanja apoptoze

Slika 5. Unutarnji put pokretanja apoptoze

Slika 6. Strukturna formula klorogenične kiseline

Slika 7. Utjecaj kolitisa i klorogenične kiseline (KGK) na dužinu crijeva i aktivnost bolesti

Slika 8. Utjecaj kolitisa i klorogenične kiseline (KGK) na lokalne i sistemske promjene

Slika 9. Utjecaj klorogenične kiseline (KGK) na masu slezene tijekom kolitisa izazvanog primjenom natrijevog dekstran sulfata (DDS)

Slika 10. Utjecaj kolitisa i klorogenične kiseline (KGK) na patohistološke promjene sluznice debelog crijeva

Slika 11. Utjecaj kolitisa i klorogenične kiseline (KGK) na izražaj pro- i protuapoptotskih molekula u debelom crijevu

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE

Sara Varda

Supetarska Draga 237, 51280 Rab (Hrvatska)

0989914433

saravarda95@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- 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-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