

Protuupalna snaga kombinacije omega-3 masnih kiselina i flavonoida i perspektiva u ublažavanju simptoma umora i sindroma kroničnog umora

Cvejić, Jelena Helen

Professional thesis / Završni specijalistički

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:039459>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-15**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Jelena Helene Cvejić

**PROTUUPALNA SNAGA KOMBINACIJE OMEGA-3 MASNIH KISELINA I
FLAVONOIDA I PERSPEKTIVA U UBLAŽAVANJU SIMPTOMA UMORA I
SINDROMA KRONIČNOG UMORA**

SPECIJALISTIČKI RAD

Osijek, 09. 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

SPECIJALISTIČKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za ispitivanje hrane i prehrane
Katedra za prehranu
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Poslijediplomski specijalistički studij Nutricionizam

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

Nastavni predmet: Integrativna fiziologija i prehrambena biokemija

Tema rada je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2020./2021. održanoj 29. travnja 2021.

Mentor: prof. dr. sc. Tomislav Klapeč

Pomoć pri izradi: prof. dr. sc. Ivana Beara, PMF Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet Novi Sad

Protuupalna snaga kombinacije omega-3 masnih kiselina i flavonoida i perspektiva u ublažavanju simptoma umora i sindroma kroničnog umora

Jelena Helene Cvejić, 85596677515/2019

Sažetak:

Dugotrajni nakupljeni umor utječe na tjelesno i mentalno zdravlje ljudi, istodobno uzrokujući razne bolesti, uključujući sindrom kroničnog umora (CFS). Gotovo 40% cjelokupne populacije pati od značajnog stepena umora. Istraživanja ukazuju na vezu između proupalnog statusa i oksidacijskog stresa s pojavom kroničnog umora, dok sve veći broj studija ukazuje na terapijski potencijal protuupalnih i antioksidativnih sastojaka hrane. Cilj ovog rada je procjena utjecaja odabranih flavonoida i metabolita (apigenin, apigenin-7-O-glukozid, luteolin, luteolin-7-O-glukozid, apigenin-7-O-glukuronid, luteolin-7-O-glukuronid) te omega-3 masnih kiselina (dokosaheksaenska kiselina i eikosapentaenska kiselina) na proizvodnju upalnih medijatora (PLA2, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES, TXAS) na modelu rane upale, kao i ispitivanje ekspresije mRNA enzima cPLA2 α , COX-1/2, mPGES-1/2, cPGES i TXAS uključenih u njihovu proizvodnju uz RT-qPCR. Smjese flavonoida s omega-3 masnim kiselinama, ovisno o primijenjenim koncentracijama i kombinacijama, inhibiraju ili potenciraju stvaranje PGE2 i TXA2 (kvantificiranih ELISA testom) u monocitima U937 stimuliranim lipopolisaharidom (LPS). Iste smjese, osim onih s luteolinom i luteolin-7-O-glukuronidom, povećavaju ekspresiju TXAS mRNA, ali bez izravne povezanosti s količinom proizvedenog TXA2. Najprominentniji protuupalni potencijal pokazuje kombinacija masnih kiselina s luteolinom, odnosno njegovim metabolitom, što ukazuje na racionalnu osnovu za njihovo uključivanje u daljnje faze istraživanja i testiranje terapijskog učinka u ublažavanju simptoma umora i CFS-a.

Ključne riječi: flavonoidi, omega-3 masne kiseline, protuupalni učinak, sindrom kroničnog umora

Rad sadrži: 41 stranica
11 slika
6 tablica
63 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu specijalističkog rada:

- | | | |
|----|---------------------------------|---------------|
| 1. | izv. prof. dr. sc. Marina Tišma | predsjednica |
| 2. | prof. dr. sc. Tomislav Klapeč | član-mentor |
| 3. | izv. prof. dr. sc. Ines Banjari | članica |
| 4. | doc. dr. sc. Ivana Tomac | zamjena člana |

Datum obrane: 21. rujna 2021.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

POSTGRADUATE SPECIALIST THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Faculty of Food Technology Osijek

Department of Food and Nutrition Research

Subdepartment of Nutrition

Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Postgraduate specialist study Nutrition

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Nutrition science

Course title: Integrative physiology and food biochemistry

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VII. held on April 29, 2021.

Mentor: Tomislav Klavec, PhD, prof.

Technical assistance: Ivana Beara, PhD, prof., Faculty of Science, University of Novi Sad

The anti-inflammatory power of the combination of omega-3 fatty acids and flavonoids and perspectives in relieving fatigue symptoms and chronic fatigue syndrome

Jelena Helene Cvejić, 85596677515/2019

Summary:

Prolonged accumulated fatigue threatens people's physical and mental health, while causing various illnesses, including chronic fatigue syndrome (CFS). Almost 40% of the total population suffers from pathological fatigue. A link between pro-inflammatory status and oxidative stress with the onset of chronic fatigue, and diet significance are indicated. The aim of this study was to evaluate the influence of selected flavonoids and metabolites (apigenin, apigenin-7-O-glucoside, luteolin, luteolin-7-O-glucoside, apigenin-7-O-glucuronide, luteolin-7-O-glucuronide), and omega-3 fatty acids on the inflammatory mediators (PLA2, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES, TXAS) production in an early inflammation model and to examine the expression of corresponding mRNA enzymes cPLA2 α , COX-1/2, mPGES-1/2, cPGES i TXAS (RT-qPCR). Mixtures of flavonoids with omega-3 fatty acids, depending on the applied concentrations and combinations, inhibit or potentiate the production of PGE2 and TXA2 (quantified by ELISA test) in LPS-stimulated U937 monocytes. The same mixtures, excluding the ones with luteolin and luteolin-7-O-glucuronide, increase the expression of TXAS mRNA without a direct relationship to the amount of TXA2 produced. The most prominent anti-inflammatory potential is shown by the combinations of fatty acids with luteolin and its metabolite, indicating a rational basis for their inclusion in further research and for testing their therapeutic effect in relieving symptoms of fatigue and CFS.

Key words: flavonoids, omega-3 fatty acids, anti-inflammatory effect, chronic fatigue syndrome

Thesis contains: 41 pages
11 figures
6 tables
63 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | | |
|----|------------------------------------|--------------|
| 1. | Marina Tišma, PhD, associate prof. | chair person |
| 2. | Tomislav Klavec, PhD, prof. | supervisor |
| 3. | Ines Banjari, PhD, associate prof. | member |
| 4. | Ivana Tomac, PhD, assistant prof. | stand-in |

Defense date: September 21, 2021

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr. sc. Tomislavu Klapac zbog razumevanja, motivacije, vremena i znanja koje mi je pružio i time omogućio izradu ovog rada.

Srdačno zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Ines Banjari na ukazanoj podršci, vremenu, i pomoći tokom specijalističkog studija kao i tokom pisanja ovog rada.

Neizmerno zahvaljujem mojoj kolegini prof. dr. sc. Ivani Beara na vremenu, znanju kao i izuzetnom doprinosu realizaciji eksperimentalne studije i ovog rada.

Posebno zahvaljujem mojoj kolegini ass. Dariji Sazdanić na pruženoj pomoći u pisanju rada.

Toplo zahvaljujem svojoj studentkinji, prijateljici i kolegini mr. pharm. Milani Josić na bezrezervnoj podršci i motivaciji u toku ovih studija.

Zahvaljujem porodici i prijateljima na безусловnoj ljubavi i podršci koju mi pružaju.

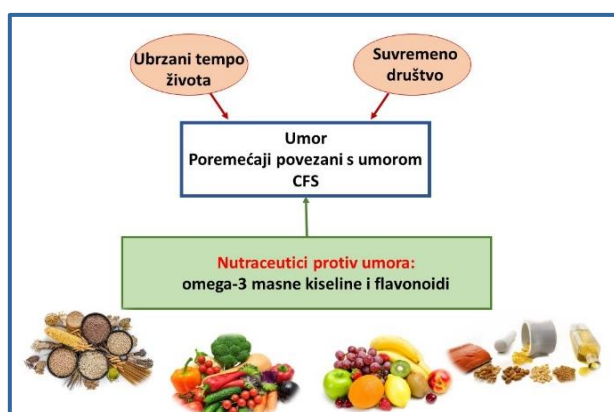
Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	3
2.1. UMOR I SINDROM KRONIČNOG UMORA	4
2.1.1. Uvod	4
2.1.2. Dijagnostika	5
2.1.3. Etiologija	5
2.1.4. Terapija.....	6
2.2. UPALA I UPALNI PROCES	7
2.2.1. Eikosanoidi.....	7
2.2.2. Sinteza i uloga PGE2 i TX2 u upali.....	9
2.3. NUTRIJENTI I SINDROM KRONIČNOG UMORA	11
2.3.1. Omega-3 masne kiseline.....	11
2.3.2. Flavonoidi	14
3. Eksperimentalni dio	17
3.1. ZADATAK	18
3.2. MATERIJAL I METODE	18
3.2.1. Uzgoj stanica U937	18
3.2.2. Analiza citotoksičnosti	18
3.2.3. Tretman stanica s ciljem inhibicije stvaranja PGE2 i TXA2	19
3.2.4. Kvantifikacija PGE2 i TXA2 pomoću ELISA testa.....	20
3.2.5. Određivanje ekspresije mRNA enzima koji sudjeluju u sintezi PGE2 i TXA2 uz RT-qPCR.....	20
3.2.6. Statistička obrada podataka	21
4. Rezultati i rasprava	22
4.1. CITOTOKSIČNOST ISPITIVANIH SPOJEVA I SMJESA	23
4.2. UTJECAJ ISPITIVANIH SPOJEVA I SMJESA NA PROIZVODNJU PGE2 I TXA2	24
4.3. UČINCI ISPITIVANIH SPOJEVA I SMJESA NA EKSPRESIJU mRNA	28
5. Zaključci	33
6. Literatura	35

1. UVOD

Ubrzano tempo života i socijalno nadmetanje u suvremenom društvu uzrok su umora i poremećaja povezanih s umorom od kojih pate milijuni ljudi. Umor se opisuje kao neuobičajen osjećaj prožimajuće iscrpljenosti koja nije slična onoj nakon fizičkog ili mentalnog napora i koja se ne može oporaviti odmorom. Dugotrajni nakupljeni umor prijeti tjelesnom i mentalnom zdravlju ljudi, istodobno uzrokujući razne bolesti, uključujući sindrom kroničnog umora (CFS). Procjenjuje se da skoro 40% cjelokupne populacije (od čega žene i do 3 puta češće od muškaraca) ima značajan patološki umor (Haß i sur., 2019; Finsterer i Mahjoub, 2014).

Trenutno liječenje umora nije zadovoljavajuće. Farmakološke terapije se najčešće koriste, ali dugotrajno liječenje može proizvesti ozbiljne nuspojave. Zato je potrebno i važno razviti učinkovite i sigurne lijekove protiv umora ili režime liječenja. Istraživanja ukazuju na vezu



između proupalnog statusa i pojave kroničnog umora, kao i uključenost oksidacijskog stresa. Stoga sve veći broj studija (Tolkien i sur., 2019; Ricker i Haas, 2017; Comert i Gokmen, 2018) ukazuje na potencijal sastojaka hrane protuupalnog i antioksidativnog učinka (**Slika 1**).

Slika 1 Utjecaji na razvoj umora

Koncept "dijete za smanjenje umora" uključuje cjelovite žitarice, povrće, voće i omega-3 masne kiseline, a smatra se da mediteranska prehrana poboljšava umor povezan s bolestima smanjenjem upalnog opterećenja i uravnoteženjem crijevne mikrobiote (Bailey i Holscher, 2018; Tosti i sur., 2018). Dodatak omega-3 masnih kiselina obećava s obzirom na njihovo protuupalno djelovanje. Međutim, najbolji rezultati u ublažavanju umora vjerojatno će se postići sinergijom s flavonoidima antioksidativnog i protuupalnog učinka. Stoga je ova studija procijenila utjecaj odabranih flavonoida i metabolita (apigenin, apigenin-7-O-glukozid, luteolin, luteolin-7-O-glukozid, apigenin-7-O-glukuronid, luteolin-7-O-glukuronid) te omega-3 masnih kiselina (dokosaheksaenska kiselina (DHA, C22:6n-3) i eikosapentaenska kiselina (EPA, C20:5n-3)), samostalno i u kombinaciji, na proizvodnju eikosanoida PGE2 i TXA2 u ljudskim leukemijskim monocitima U937 uz upalu izazvanu lipopolisaharidom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. UMOR I SINDROM KRONIČNOG UMORA

2.1.1. Uvod

Ubrzani tempo života i socijalna konkurencija u modernom su društvu uzrok umora i poremećaja povezanih s umorom od kojih pate milijuni ljudi. Umor se definira kao neobičan nesavladivi umor koji nije usporediv s fiziološkom iscrpljenošću nakon fizičkog ili mentalnog napora i koji se ne može umanjiti odmorom. Dugotrajni nagomilani umor utječe na fizičko i mentalno zdravlje ljudi, istodobno uzrokujući razne bolesti, uključujući sindrom kroničnog umora (CFS). Iako se umor povezan s bolestima obično javlja u populaciji bolesnih ljudi, procjenjuje se da gotovo 40 % ukupne populacije, od čega su 70 % žene, ima znatan patološki umor (Finsterer i Mahjoub, 2014).

CFS predstavlja stanje koje karakterizira trajni i onesposobljavajući umor koji traje 6 mjeseci ili duže, uzrokujući poteškoće kako u fizičkim, tako i u kognitivnim zadacima. Ovo je stanje obično poznato kao mijalgijski encefalomijelitis (ME) ili ME/CFS. Ima karakterističan obrazac dugotrajnog pogoršanja nakon aktivnosti. U bolesnika s CFS-om zadaci koji su prethodno postignuti s lakoćom pokreću sate ili čak dane pogoršanih simptoma, ponekad nazvanih i malaksalost nakon napora. Većina bolesnika s CFS-om nisu sposobni raditi ili studirati, a razine invalidnosti čak su usporedive s onima koje se pripisuju multiploj sklerozi. Pacijenti također izvještavaju da naoko dovoljan san ne pruža odmor. Uobičajeni opisi CFS-a koje daju pacijenti uključuju iscrpljenost, umor, nedostatak energije, težinu u udovima i maglovitost u glavi (Wan i sur., 2017; Sandler i Lloyd, 2020).

Neuroinflamacija je uobičajena značajka ME/CFS-a koja pogađa 85% - 90% svih pacijenata, no osnovni mehanizam ili mehanizmi odgovorni za pokretanje i/ili promicanje ovog procesa uglavnom su nepoznati (Williams i sur., 2019). Primjećuju se manji objektivni deficiti u održivim mišićnim performansama na neurofiziološkim testovima, dok formalna procjena kognitivnih performansi otkriva samo suptilne objektivne deficite. Stoga se fenomen umora kod CFS-a smatra subjektivnim (kao kronična bol), ali je očito patološki jer se ne rješava odmorom, spavanjem ili smanjenim fizičkim ili kognitivnim zahtjevima (Sandler i Lloyd, 2020).

2.1.2. Dijagnostika

CFS se smatra stanjem s nepreciznim dijagnostičkim granicama, jer mnogi pacijenti s CFS-om također zadovoljavaju dijagnostičke kriterije za druge sindrome, uključujući fibromijalgiju, sindrom iritabilnog crijeva i sindrom posturalne ortostatske tahikardije. Također, manifestacije bolesti uglavnom su subjektivne i teško ih je pouzdano zabilježiti. Dijagnostički su kriteriji u prošlosti kritizirani zbog pretjerane inkluzije pacijenata s lakšim bolestima i nisu bili dobro validirani u širokoj populaciji (Haney i sur., 2015). Štoviše, nedostatak dijagnostičkog testa ili biomarkera neće povećati preciznost dijagnostičkih kriterija. Svi dijagnostički skupovi kriterija uključuju simptome kao što su fizički i kognitivni umor s produljenim pogoršanjem nakon aktivnosti i odsutnost jasnih objašnjenja nakon uzimanja u obzir povijesti bolesti, pregleda i ispitivanja (Ross i sur., 2004).

Trenutne smjernice kliničke prakse preporučuju da se dijagnoza CFS-a postavlja u primarnoj zdravstvenoj zaštiti, jer obično ne zahtijeva procjenu liječnika specijalista ili psihijatra ili složene laboratorijske pretrage. S druge strane, potrebna je pažljiva anamneza, pregled mentalnog zdravlja, temeljit fizički pregled i nekoliko dodatnih pretraga kako bi se isključila eventualna druga stanja, poput hipotireoze. Potrebni testovi uključuju kompletnu krvnu sliku, koncentraciju ureje, elektrolita i kreatinina, testove funkcije jetre i štitnjače, razinu C-reaktivnog proteina, brzinu sedimentacije eritrocita, kao i testove razine glukoze u krvi natašte (Wilson i sur., 2014).

Prema sustavnom pregledu 26 studija, prevalencija osnovnih tjelesnih bolesti u bolesnika koji pohađaju odjel primarne zdravstvene zaštite sa CFS je niska (anemija 2,8%, malignost 0,6% i druga ozbiljna zdravstvena stanja 4,3%), dok je depresija dijagnosticirana u 18,5% bolesnika (Stadje i sur., 2016). Nakon dijagnoze važno je priznati pacijentima da su, unatoč nedostatku sveobuhvatnog razumijevanja stanja i preciznih dijagnostičkih kriterija, simptomi prisutni, a borba s invaliditetom stvarna (Sandler i Lloyd, 2020).

2.1.3. Etiologija

Točna etiologija CFS-a trenutno je nejasna iako postoje razne hipoteze. Potencijalni okidači i mehanizmi bolesti uključuju virusne i druge oblike infekcije, mitohondrijsku disfunkciju i neurološke abnormalnosti. Dugo se pretpostavljalo da je osnovni uzrok CFS-a virusnog podrijetla, a postoje i dokazi da enterovirusi i herpesvirusi mogu biti uključeni u ovu bolest

(Richman i sur., 2019). Konkretno, virus Epstein-Barr mogao bi imati ulogu u CFS-u. Štoviše, nalazi ukazuju da bi protein Epstein-Barr virusa deoksiuridin trifosfat nukleotidohidrolaza (dUTPaza) mogao pokrenuti neuroinflamatornu reakciju, što pridonosi umoru, prekomjernoj boli i kognitivnim oštećenjima uočenim u bolesnika s CFS-om (Williams i sur., 2019). Nadalje, kako bi se razjasnili uzroci CFS-a, istraživanje je bilo usmjereno i prema osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda, kao najvažnijoj osi u regulaciji reakcija na stres (Marina i sur., 2008).

Do danas, istraživanje mehanizama bolesti nije rezultiralo konačnim zaključcima oko specifičnih ili konzistentnih markera etiologije ili patofiziologije. Jedno od glavnih objašnjenja može biti heterogenost populacije bolesti. Rezultati nedavnih studija pokazuju da bi upala niskog stupnja mogla igrati izuzetno značajnu ulogu (Jonsjö i sur., 2019). Budući da je umor često povezan sa stanjima koja karakterizira imunološki nedostatak i/ili upala (Borren i sur., 2018), smatra se da kronični proupalni status ovih pacijenata uzrokuje ili pogoršava simptome umora (Maes i sur., 2012). Vjerojatno ne postoji samo jedan temeljni uzrok ove bolesti (Richman i sur., 2019).

2.1.4. Terapija

Raznolikost potencijalnih etiologija i očitovani simptomi povezani s CFS-om čine liječenje ove bolesti izazovnim. Štoviše, tretmani učinkoviti za neke pacijente možda neće biti učinkoviti za druge. Neizvjesnost u vezi s osnovnim mehanizmima CFS-a usmjerila je farmakološki tretman prema ublažavanju specifičnih simptoma. Lijekovi koji uključuju sredstva za ublažavanje boli (specifični i nespecifični nesteroidni protuupalni lijekovi, NSAID), antidepresivi (inhibitori monoaminoooksidaze, selektivni inhibitori ponovnog unosa serotonina i noradrenalina i selektivni inhibitori ponovnog unosa serotonina), antivirusna sredstva i antihistaminici identificirani su kao vjerojatno korisni u liječenju CFS-a (Richman i sur., 2019).

Tijekom posljednja tri desetljeća obavljeno je značajno istraživanje učinkovitosti antivirusnih lijekova u liječenju CFS-a. Ovi tretmani obično uključuju analoge gvanozina, poput aciklovira i valaciklovira ili imunomodulatora rintatolimoda u kliničkim su ispitivanjima postigli različitu razinu uspjeha. Ublaživači boli, bez recepta i samo na recept, često se koriste za ublažavanje generaliziranih tjelesnih bolova i bolova povezanih s CFS-om i prijavljeni su kao najčešće korišteni lijekovi u liječenju CFS-a (Richman i sur., 2019).

Minimiziranje nuspojava liječenja posebno je važno u bolesnika s CFS-om, jer oni već imaju široku lepezu popratnih bolesti, često uključujući gastrointestinalne poremećaje poput sindroma iritabilnog crijeva (Richman i sur., 2019). S druge strane, studije koje procjenjuju učinkovitost kognitivne bihevioralne terapije pokazale su obećavajuće rezultate. Štoviše, kod mnogih pacijenata simptomi CFS-a fluktuiraju na nepredvidiv način bez obzira na razinu aktivnosti. Stoga bi pomak fokusa s ublažavanja simptoma na kvalitetu života mogao biti koristan u učinkovitijem upravljanju tim simptomima kako bi se održalo ili poboljšalo funkcioniranje (Jonsjö i sur., 2019).

Na kraju, farmakološki i biološki tretmani umora nisu pružili značajnije dokaze o učinkovitosti u poboljšanju simptoma, funkcioniranja ili kvalitete života. Farmakološke terapije glavne su opcije, dok dugotrajno uzimanje lijekova može rezultirati ozbiljnim nuspojavama. Stoga je potrebno i važno razviti učinkovite i sigurne lijekove protiv umora ili režime liječenja (Wan i sur., 2017).

2.2. UPALA I UPALNI PROCES

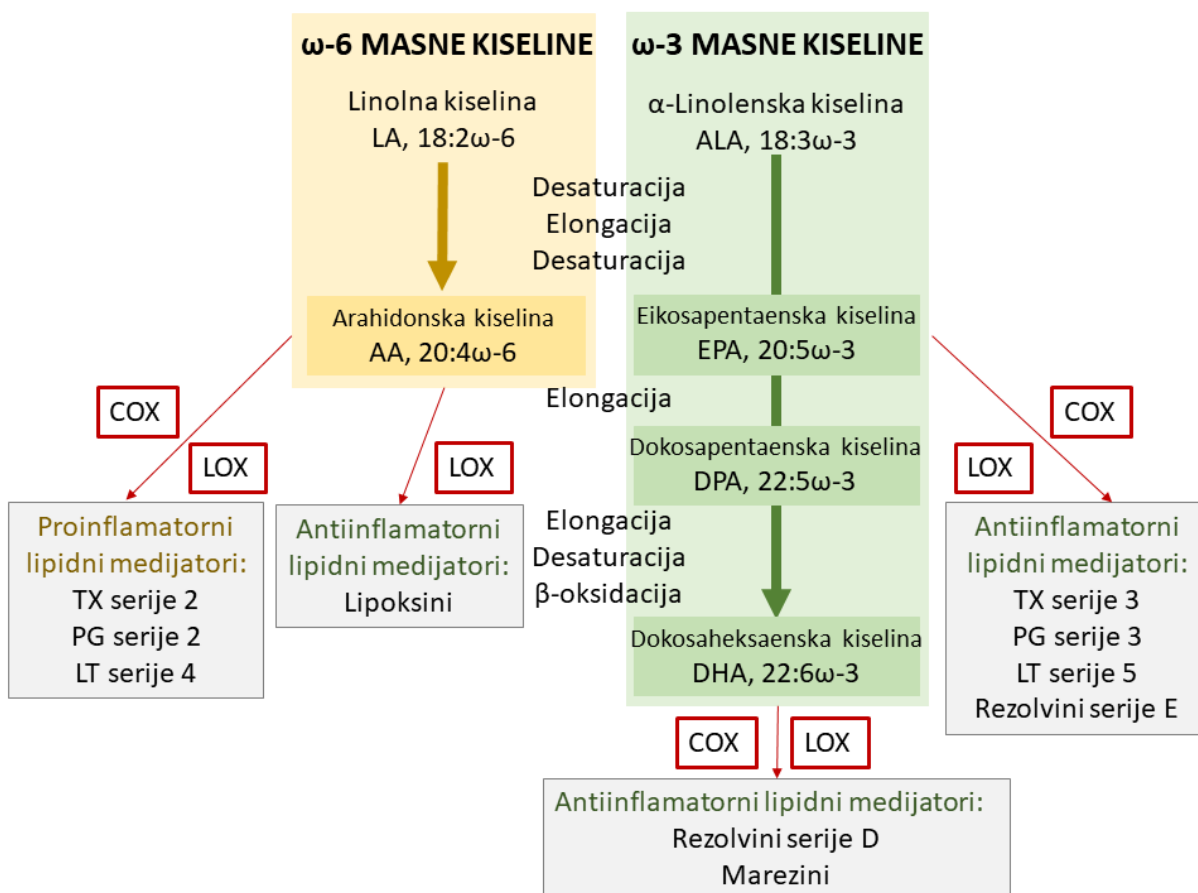
Upala je normalna, biološka reakcija tkiva na patogene, nadražujuće tvari ili ozljede. U zdravim uvjetima, upala je normalan, samoograničavajući i dobro kontrolirani odgovor na infekcije, te ne šteti već pomaže u zaštiti organizma. Međutim, nekontrolirana upala pridonosi razvoju različitih bolesti, uključujući dijabetes, aterosklerozu, rak itd. Budući da je umor često povezan sa stanjima koja karakteriziraju imunološki nedostatak ili pretjeranu aktivaciju upale, kronični proupalni status tih pacijenata može uzrokovati ili pogoršati simptome umora (Haß i sur., 2019). Kao što je prethodno spomenuto, upala se smatra važnom točkom uključenom u mehanizme razvoja umora i CFS-a (Jonsjö i sur., 2019).

2.2.1. Eikosanoidi

Eikosanoidi su signalne molekule nastale enzimatskom ili neenzimatskom oksidacijom arahidonske kiseline ili drugih polinezasićenih masnih kiselina. Ovi bioaktivni regulatori se proizvode iz omega 3 i omega 6 masnih kiselina (**Slika 2**).

Ti su spojevi snažni biološki aktivni lipidi i autokrini i parakrini medijatori koji djeluju u različitim fiziološkim sustavima i patološkim procesima kao što su: pokretanje upalnog odgovora,

izazivanje vrućice, kontrola reproduktivnih procesa i rasta tkiva, regulacija krvnog tlaka, zgrušavanje krvi i regulacija ciklusa spavanje/buđenje. Izvedeci ove uloge, eikosanoidi najčešće djeluju kao autokrini signalni agensi koji utječu na njihove stanice podrijetla ili kao parakrini signalni agensi koji utječu na stanice u blizini njihovih izvornih stanica, ali mogu djelovati i kao endokrini agensi koji kontroliraju funkciju udaljenih stanica (Khanapure i sur., 2007).



Slika 2 Proizvodnja bioaktivnih regulatora iz omega 3 i omega 6 masnih kiselina

LOX – lipoksigenaza, COX – ciklooksigenaza, PG – prostaglandini, TX – tromboksani, LT – leukotrieni, AA – arahidonska kiselina, LA – linolna kiselina. ALA – α-linolenska kiselina, EPA – eikosapentaenska kiselina, DPA – dokosapentaenska kiselina, DHA – dokosaheksaenska kiselina

Osim u upalama i patološkim stanjima, uključujući bol, kardiovaskularne bolesti i rak, ti lipidi manifestiraju različite biološke aktivnosti u normalnoj fiziologiji - vazodilatacija, vazokonstrikcija, ovulacija, funkcija trombocita i bubrega itd. (Smith, 1989; Morita, 2002).

Eikosanoidi se sastoje od nekoliko skupina spojeva, uključujući najistaknutije prostaglandine, tromboksane, leukotriene, lipoksine, resolvine i eoksine. Za svaku podgrupu postoji

potencijalno stvaranje najmanje četiri odvojene serije metabolita, dvije serije proizvedene iz ω -6 PUFA (arahidonska i dihomogama-linolenska kiselina), jedna serija izvedene iz ω -3 PUFA (eikosapentaenska kiselina) i jedna serija izvedena iz ω -9 PUFA (Calder, 2017).

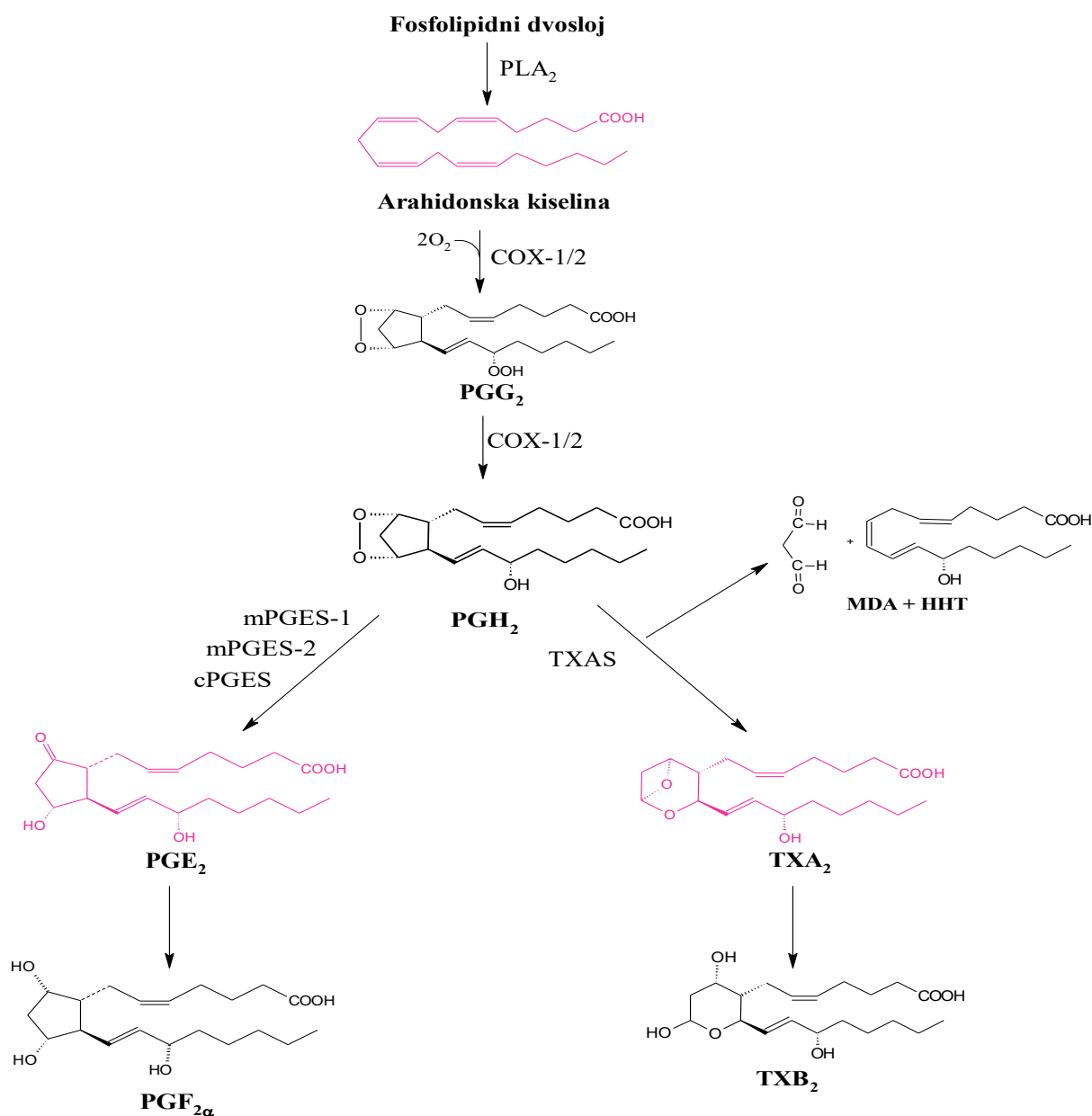
2.2.2. Sinteza i uloga PGE2 i TX2 u upali

Odgovor organizma na upalne podražaje uključuje aktivaciju fosfolipaze A2 (PLA2) različitim, što rezultira oslobađanjem arahidonske kiseline (AA) iz fosfolipida stanične membrane. AA se potom može pretvoriti u strukturno različite eikosanoide u tri odvojena smjera, katalizirane sljedećim enzimima: ciklooksigenaze (COX), lipoksigenaze (LOX) i citokrom P450 epoksigenaze (Smith, 1989). Ključni eikosanoidi poput prostaglandina (PG), leukotriena (LT) i lipoksina (LX) nastaju katalitičkim djelovanjem COX i LOX enzima, pri čemu COX put uključuje aktivnosti COX-1 i COX-2 (**Slika 3**).

Oba pomenuta enzima, i COX-1 i COX-2 su takozvani bifunkcionalni enzimi, što znači da posjeduju dvije različite aktivnosti - kao ciklooksigenaza i peroksidaza. Ciklooksigenazna aktivnost ovih enzima podrazumeva katalizu oksidacije AA do prostaglandina G2 (PGG2), dok druga, peroksidazna aktivnost, obuhvata konverziju PGG2 u prostaglandin H2 (PGH2). Iako je za pokretanje puta AA potrebna aktivnost PLA2, ukupna regulacija vrste i količine medijatora upale u određenoj stanici uglavnom ovisi o razini ekspresije COX-1, COX-2 i terminalnih sintaza.

Prvi korak reakcije kataliziran COX-om je transformacija AA u ciklički endoperoksid prostaglandin G2 (PGG2), koji se potom reducira u PGH2, a ovaj nadalje metabolizira u terminalne prostaglandine PGE2, PGI2 (prostaciklin), PGD2, PGF2 α , kao i tromboksane A2 (TXA2) i B2 odgovarajućim sintazama prostaglandina i tromboksana (Smith, 1989).

Ti se prostaglandini mogu naći u različitim stanicama i tkivima koji vrše različite aktivnosti: uloga PGE2 u upali i bolovima u zglobovima, gastrična zaštita od strane PGE2 i PGI2 u želučanoj sluznici, regulacija izlučivanja soli i vode preko PGE2 i PGI2 u bubrezima, uloga PGI2 u inhibiciji trombocita i vazodilataciji, uključenost PGE2 u osjet boli i vrućicu u središnjem živčanom sustavu, aktivacija trombocita i vazokonstrikcija uz TXA2 i drugo (Cairns, 2007).



Slika 3 Sinteza PGE₂ i TXA₂ ciklooksigenazama

COX – ciklooksigenaza, HHT – hidroksiheptadekatrienoat, MDA – malonildialdehid, PG - prostaglandin, PGDS - PGD₂ sintaza, PGES - PGE₂ sintaza, PGFS - PGF_{2α} sintaza, PGIS -PGI₂ sintaza, TX - tromboksan, TXAS - TXA₂ sintaza

COX-1 i COX-2 su enzimi sličnih struktura i kataliziraju iste reakcije. Kristalne strukture ljudskog COX-1 i COX-2 dobro su poznate. Ti su enzimi homodimeri koji se sastoje od 576 (COX-1) i 581 (COX-2) aminokiselina. Razlike u tri aminokiseline između primarne sekvence COX-1 i COX-2 glavni su razlog njihovih različitih aktivnosti. Vjeruje se da ove manje razlike uzrokuju značajno drukčiju farmakološku i biološku aktivnost (Gierse i sur., 1996).

Međutim, ti enzimi imaju različite funkcije i kodirani su različitim genima čija se ekspresija regulira odvojenim mehanizmima. Iako se COX-1 konstitutivno eksprimira u gotovo svim stanicama i odgovoran je za agregaciju trombocita, želučanu citoprotekciju i ravnotežu vode u bubrezima, COX-2 je tijekom upale snažno reguliran u makrofazima, monocitima, fibroblastima i endotelnim stanicama (Smith, 1989; Morita, 2002). Otkako je prepoznato uključivanje COX-2 u brojne patološke procese, postao je značajna terapijska meta u borbi protiv upale.

2.3. NUTRIJENTI I SINDROM KRONIČNOG UMORA

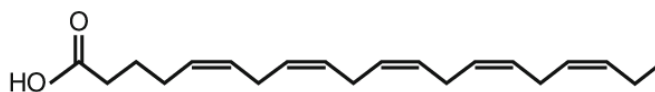
Istraživanja ukazuju na vezu između proupalnog statusa i pojave kroničnog umora, kao i uključenosti oksidacijskog stresa u pojavu umora i upala (Wan i sur., 2017). Poznato je da brojne tvari iz hrane djeluju protuupalno i antioksidativno (Mimica-Dukić i sur., 2021). Stoga sve veći broj studija ukazuje na potencijal aktivnih komponenata hrane kao sredstava za prevenciju zamora i CFS-a (Luo i sur., 2019). Koncept "prehrane za smanjenje umora" uključuje cjelovite žitarice, povrće, voće i omega-3 masne kiseline, dok se vjeruje da mediteranska prehrana poboljšava stanje zamora povezano s bolestima, smanjenjem upalnog opterećenja i istovremenim uravnoteženjem crijevne mikrobiote (**Slika 1**).

Mogućnost prevencije i/ili potpore farmakološkoj terapiji, kroz odgovarajuću prehranu i uporabu nutraceutika, može biti koristan pristup za suočavanje sa simptomom umora (Haß i sur., 2019). Nutraceutici, u skladu s definicijom Europskog udruženja za prehranu, su prehrambeni proizvodi koji pružaju zdravstvene i medicinske koristi, uključujući prevenciju i liječenje bolesti (European Nutraceutical Association, 2021).

2.3.1. Omega-3 masne kiseline

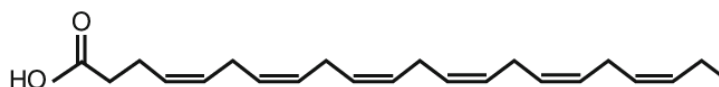
Omega-3 polinezasićene masne kiseline (ω -3 LC PUFA) imaju širok raspon važnih strukturnih i regulatornih funkcija u ljudskom tijelu i širok spektar bioloških djelovanja (Bannenberg i sur., 2017).

Korištenje omega-3 masnih kiselina u upravljanju CFS-om izgleda obećavajuće u smislu protuupalnog djelovanja. Učinci PUFA posredovani su bioaktivnim lipidnim medijatorima koje proizvode oksigenaze masnih kiselina, poput COX, LOX i CYP.



Slika 4 Kemijska struktura eikosapentaenske kiseline

Postoje mnogi dokazi o protuupalnom djelovanju EPA i DHA (Haß i sur., 2019).



Slika 5 Kemijska struktura dokosaheksaenske kiseline

Smatra se da je protuupalni učinak omega-3 PUFA posljedica nadmetanja u sintezi eikosanoida iz AA, kao i nastanku alternativnih metabolita slabijeg djelovanja od medijatora izvedenih iz AA (Ishihara i sur., 2019). Naime, omega-3 polinezasićene masne kiseline EPA i DHA (**Slika 4** i **5**) natječu se s AA za reakcije koje kataliziraju COX i LOX. Stoga visok unos EPA i DHA hranom omogućuje djelomičnu zamjenu AA, što dovodi do smanjenja dostupne količine za stvaranje proupalnih metabolita (Labuschagne i Blaauw, 2018).

Omega-3 PUFA dostupne su na mjestima upale i mogu se enzimski pretvoriti u bioaktivne posrednike. Identificirani su razni bioaktivni medijatori izvedeni iz omega-3 PUFA, poznati kao posrednici u rješavanju upale (**Slika 2**). Tu su uključeni rezolvini dobiveni iz EPA (rezolvini E-serije), rezolvini izvedeni iz DHA (rezolvini D-serije), protektini i marezini (**Slika 2**). Biološko djelovanje takvih metabolita posredovano je različitim tipovima stanica kao što su polimorfonuklearni leukociti, makrofagi, dendritske stanice, eozinofili, urođene limfoidne stanice, CD4+ T stanice, CD8+ T stanice, $\gamma\delta$ T stanice i B stanice. Štoviše, specifični posrednici

u rješavanju upala mogu poslužiti širokom rasponu korisnih učinaka ne samo kod akutne upale, već i kod kronične upale (Ishihara i sur., 2019).

Kako sisavci, uključujući i ljude, nisu u stanju pretvoriti ω -6 u ω -3 masne kiseline, razina tih spojeva i odgovarajućih eikosanoidnih metabolita u tkivima izravno ovisi o količini unosa ω -6 u odnosu na ω -3 PUFA (Edwards i O'Flaherty, 2008; Grúz, 2016).

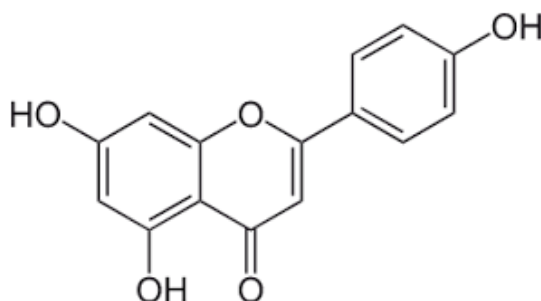
Zapravo, neki od metabolita serije ω -6 i ω -3 PUFA imaju gotovo suprotne patofiziološke aktivnosti, pa štetne posljedice povezane s velikim unosom ω -6 masne kiseline odražavaju dominantnu proizvodnju eikosanoida izvedenih iz ω -6 masnih kiselina, dok blagotvorni učinci povezani s konzumacijom hrane bogate ω -3 masnim kiselinama odražavaju istaknute aktivnosti eikosanoida izvedenih iz ove vrste masnih kiselina. Ovaj aspekt djelovanja eikosanoida na ključne ciljne stanice povezuje štetne i blagotvorne učinke prehrane bogate ω -6 i ω -3 na različita stanja kao što su upale i alergijske reakcije, ateroskleroza, hipertenzija, razvoj umora, CFS i drugi procesi (Soberman i Božić, 2003; Ishihara i sur., 2019; Haß i sur., 2019; Hoppenbrouwers i sur., 2019).

Ujedno je poznato je da konzumacija omega-3 masnih kiselina ima povoljne zdravstvene učinke na brojne biološke procese kao što su poboljšani imunološki profil, poboljšane kognitivne funkcije, održavanje mentalnog zdravlja i optimizirana živčano-mišićna funkcija. Nedavno su se pojavili podaci koji pokazuju pozitivan utjecaj unosa omega-3 masnih kiselina na koštane mišiće. Povećan unos nezasićenih masnih kiselina i omega-3 masnih kiselina kroz prehranu i suplementaciju uključen je u preporuke za nefarmakološki pristup ublažavanju simptoma CFS-a (Sitzia i sur., 2019; Nacul i sur., 2020).

Ulja morskih organizama bogata su omega-3 masnim kiselinama, posebno DHA i EPA te se smatraju jednim od najboljih omega-3 LCPUFA izvora, a pretežno potječu od ribe, krila, školjaka, kalamara, inćuna i jetre bakalara. Uz to, mikroalge, perspektivni alternativni izvor zdravih PUFA dugog lanca, imaju sve veću važnost za rješavanje prehrambenih nedostataka raširenih u svijetu (Cvejić Hogervorst i sur., 2019; Arab-Teherani i sur., 2012; Bannenberg i sur., 2017). Stoga je potrošačima dostupan širok raspon različitih dodataka prehrani bogatih EPA i DHA masnim kiselinama (De Boer i sur., 2018).

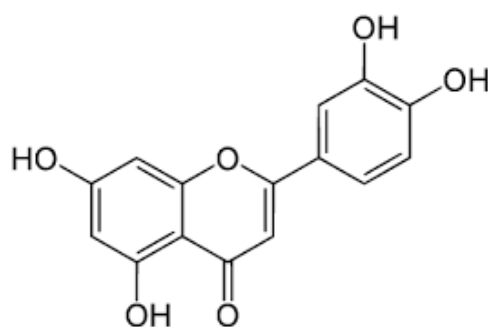
2.3.2. Flavonoidi

Ljekoviti biljni pripravci koji sadrže fitokemikalije poput flavonoida koriste se stoljećima, a protuupalno djelovanje flavonoida ima zaštitni potencijal koji je potvrđen za različite kronične bolesti poput raka, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti i neuroinflamacije (Cvejić Hogervorst i sur., 2017.; Cvejić Hogervorst i sur., 2018; Luo i sur., 2019). Utvrđeno je da antioksidativne fitokemikalije i flavonoidi posjeduju izvanredan učinak protiv umora (Peng i sur., 2021). Stoga je zamislivo da bi povećan unos prirodnih antioksidativnih sastojaka hranom mogao dovesti do smanjenog oksidativnog oštećenja, a time i umora.



Slika 6 Kemijska struktura apigenina

Čini se da apigenin (4',5,7-trihidroksiflavon) (**Slika 6**), slabo toksični i nemutageni flavonoid s izvanrednom farmakodinamikom, predstavlja obećavajući sastojak zaštitnog nutraceutika. Postojeće epidemiološke i predkliničke studije govore u prilog razvoju apigenina kao prirodne alternativne terapije protiv kroničnih upalnih stanja (Ginwala i sur., 2019).



Slika 7 Kemijska struktura luteolina

Luteolin (3',4',5,7-tetrahidroksiflavon) (**Slika 7**) je flavonoid koji se obično nalazi u biljkama. Biljke bogate luteolinom tradicionalno se koriste za liječenje simptoma povezanih s upalom. Čisti luteolin i ekstrakti iz biljaka s visokim sadržajem luteolina široko su proučavani u smislu protuupalnog djelovanja (Aziz i sur., 2018).

Studije provedene *in vitro* i *in vivo* pokazale su snažno protuupalno djelovanje luteolina, kao i njegovog derivata luteolin-7-O-glukozida. Kliničko ispitivanje s formulacijom koja sadrži luteolin također je pokazalo izvrstan terapijski učinak protiv bolesti povezanih s upalom. Stoga *in silico*, *in vitro*, *in vivo* i kliničke studije snažno sugeriraju da je glavni farmakološki mehanizam luteolina njegovo protuupalno djelovanje koje proizlazi iz njegove regulacije specifičnih transkripcijskih čimbenika (STAT3, NF- κ B i AP-1 itd.) (Aziz i sur., 2018). Štoviše, luteolin također djeluje snažno antioksidativno (Tian i sur., 2021).

Kao što je ranije spomenuto, među širokim spektrom bioloških aktivnosti, uključujući antioksidativne, imunomodulatorne, antimikrobne, antivirusne, antikancerogene i druge, također se ističu protuupalna svojstva polifenola. Jedan od mehanizama koji objašnjava protuupalno djelovanje polifenola je modulacija aktivnosti enzima uključenih u metabolizam AA, PLA2, COX i LOX, kako na transkripcijskoj tako i na enzimskoj razini (Ribeiro i sur., 2015). U istraživanju koje je ispitalo protuupalni potencijal metanolnih ekstrakata *Plantago lanceolata* i *Plantago major* preko modulacije proizvodnje PGE2 i TXA2, utvrđena je pozitivna korelacija između koncentracija apigenina i ursolne kiseline, suzbijanja proizvodnje PGE2 i TXA2, i vezane ekspresije (Majkić i sur., 2020). Stupanj inhibicije PGE2 i TXA2 u ekstraktima bila je usporediva s utjecajem aspirina i indometacina, kao i nešto niža od celekoksiba, selektivnog inhibitora COX-2 (Majkić i sur., 2020).

Proizvod koji sadrži kombinaciju omega-3 masnih kiselina i biljnih flavonoida pokazao je obećavajuće rezultate u regulaciji regrutacije upalnih stanica u mišićnim tkivima *in vitro* i kao pomoćna terapija kod distrofičara (Sitzia i sur., 2019).

Iz svega iznesenog, pretpostavlja se kako bi nutritivni lijekovi protiv umora, uključujući omega-3 masne kiseline i odabrane flavonoide - apigenin i luteolin, mogli imati potencijal u terapijskim strategijama kod umora.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

U sklopu opsežnijih istraživanja biološke aktivnosti masnih kiselina i polifenolnih spojeva, cilj rada je bio ispitati protuupalni potencijal kombinacije omega-3 masnih kiselina – DHA i EPA s odabranim fenolnim spojevima - apigenin, apigenin-7-*O*-glukozid, apigenin-7-*O*-glukuronid, luteolin, luteolin-7-*O*-glukozid, luteolin-7-*O*-glukuronid.

Provedena je procjena inhibicije stvaranja PGE2 i TXA2 kao medijatora upale u monocitima U937 stimuliranih LPS-om, koji predstavljaju modelni sustav u ranoj fazi upale.

Hipoteze istraživanja uključuju sljedeće:

- Kombinacije DHA i EPA s fenolnim spojevima utječu na njihov protuupalni potencijal ;
- Postoji sinergistički učinak kombinacije masnih kiselina i flavonoida;
- Pojedine kombinacije DHA, EPA s fenolnim spojevima imaju potencijal za uključivanje u daljnje faze istraživanja, kao i za testiranje ublažavanja simptoma umora i CFS-a.

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. Uzgoj stanica U937

Ljudski leukemijski monociti U937 uzgajani su u mediju RPMI-1640, koji je sadržavao 10 % (v/v) fetalnog goveđeg seruma (fetal bovine serum, FBS), 2,05 mmol/L L-glutamina, 25,0 mmol/L HEPES (4-(2-hidroksietil) piperazin-1-etansulfonska kiselina), 100 U/ml penicilina, 0,10 mg/ml streptomicina i 0,25 µg/ml amfotericina B, na 37°C, u vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂. Stanice su uzgajane u suspenziji i gustoća se održavala između 2×10^5 i 2×10^6 stanica/ml. Za eksperimente su korištene stanice do 15 prolaza, bez promjene morfoloških karakteristika.

3.2.2. Analiza citotoksičnosti

U svaku jažicu mikrotitarske pločice sa 6 jažica dodane su 2×10^6 stanica u 2 ml RPMI-1640 medija bez FBS-a. Nakon 1 sata inkubacije (37°C, vlažna atmosfera, 5 % CO₂), dodan je 1 µL ispitivanog uzorka. Isti volumen (1 µL) otapala - DMSO u kojem je uzorak otopljen dodan je kontroli. Sve su probe odrađene u tri ponavljanja. Nakon 22 sata inkubacije (37°C, vlažna atmosfera, 5 % CO₂), utvrđena je održivost stanica.

Postotak vijabilnih/održivih stanica u uzorku izračunat je formulom:

$$\% \text{ vijabilnih stanica} = (\text{broj živih stanica} / \text{ukupan broj stanica}) \times 100$$

Rezultat se izražava kao postotak živih stanica u radnim uzorcima u odnosu na kontrolu. Ako je rezultat veći od 95 %, smatralo se da ispitivani uzorak nije pokazivao citotoksične učinke.

Citotoksičnost standardnih spojeva apigenin, apigenin-7-O-glukozid, apigenin-7-O-glukuronid, luteolin, luteolin-7-O-glukozid, luteolin-7-O-glukuronid ispitivana je u koncentraciji od 2,5 $\mu\text{mol/L}$, dok su koncentracije DHA i EPA bile 100, 50, 25 i 12,5 $\mu\text{mol/L}$. Također je ispitana citotoksičnost smjesa koje sadrže standardne spojeve u koncentraciji od 2,5 $\mu\text{mol/L}$, 12,5 $\mu\text{mol/L}$ DHA i 25 $\mu\text{mol/L}$ EPA.

3.2.3. Tretman stanica s ciljem inhibicije stvaranja PGE2 i TXA2

Određivanje aktivnosti ispitivanih ekstrakata i standardnih spojeva provedeno je prema modificiranim metodama Wong i sur. (1997), Penglis i sur. (2000) i Jiang i sur. (2003), kao što je opisano u članku Majkić i sur. (2020). Metoda se temelji na određivanju sposobnosti inhibicije stvaranja metabolita ciklooksigenaznog puta metabolizma AA, TXA2 i PGE2, u ljudskim leukemijskim monocitima - stanična linija U937.

Nakon dodatka LPS-a, poticaja upalnih procesa, dolazi do ekspresije COX-2 u monocitima, što je popraćeno povećanom proizvodnjom PGE2 i TXA2 (Demasi i sur., 2000). I COX-1 i COX-2 odgovorni su za stvaranje proizvoda ciklooksigenaze u ovom slučaju. Ovaj modelni sustav može se koristiti za ispitivanje sposobnosti uzoraka da inhibiraju proizvodnju PGE2 i TXA2 u monocitima, tj. u upalnim procesima gdje se stimuliraju monociti u krvi (monociti koji nisu na mjestu upale, tj. nisu transformirani u makrofage u tkivu u kojem se odvija upalni proces) (Majkić i sur., 2020) i koje se može smatrati modelom ranog stadija upale.

U svaku jažicu mikrotitarske pločice sa 6 jažica dodaju se 2×10^6 monocita resuspendiranih u 2 ml RPMI-1640 medija bez seruma. Nakon 1 sata inkubacije dodan je 1 μL testnih uzoraka. Nakon sljedeća 2 sata inkubacije, u stanicama je izazvana upala dodatkom LPS-a (1 μL , 1,00 mg/mL). Nakon 20 sati, stanice su odvojene od supernatanta centrifugiranjem i pohranjene

na -80 °C do analize. U kontrolama su testirani uzorci zamijenjeni odgovarajućim otapalom - 1 µL DMSO. Sva ispitivanja izvedena su u tri ponavljanja, a kontrole u šest ponavljanja.

Tijekom svih inkubacija mikrotitarske pločice s reakcijskim smjesama nalazile su se u inkubatoru (37° C, vlažna atmosfera, 5 % CO₂).

Standardni spojevi apigenin, apigenin-7-*O*-glukozid, apigenin-7-*O*-glukuronid, luteolin, luteolin-7-*O*-glukozid, luteolin-7-*O*-glukuronid ispitivani su u koncentraciji od 2,5 µmol/L, dok su primijenjene koncentracije DHA i EPA bile su 12,5, odnosno 25 µmol/L. Smjese su sadržavale standardne spojeve u koncentraciji od 2,5 µmol/L, 12,5 µmol/L DHA i 25 µmol/L EPA.

3.2.4. Kvantifikacija PGE2 i TXA2 pomoću ELISA testa

U radnom supernatantu za ispitivanje, količina proizvedenih PGE2 i TXA2 određena je pomoću ELISA testa prema proizvođačevom postupku (Elabscience Biotechnology, SAD). Rezultat je izražen u postocima i predstavlja normaliziranu (relativnu) količinu produkta u radnim uzorcima (monociti tretirani LPS-om u prisutnosti testnog spoja/smjese) u usporedbi s kontrolom (monociti tretirani LPS-om u prisutnosti ekvivalenta otapala - DMSO).

3.2.5. Određivanje ekspresije mRNA enzima koji sudjeluju u sintezi PGE2 i TXA2 uz RT-qPCR

Nakon odvajanja supernatanta, ekspresija mRNA enzima koji sudjeluju u stvaranju PGE2 i TXA2: cPLA2α, COX-1/2, mPGES-1/2, cPGES i TXAS određena je u tretiranim stanicama tehnikom RT-qPCR (Majkić i sur., 2020).

Ribonukleinske kiseline (RNA) ekstrahirane su smjesom TRIzol®/kloroform i istaložene izopropilnim alkoholom, a zatim je koncentracija RNA određena fluorometrijski, koristeći komercijalno dostupan komplet (Qubit RNA BR Assay Kit; Invitrogen, Thermo Fisher, SAD). Nakon tretmana s kompletom deoksiribonukleaze (Dnase I (bez RNase); Ambion, Thermo Fisher, SAD), sintetizirana je komplementarna DNA (cDNA) na temelju mRNA sekvence korištenjem komercijalno dostupnog kompleta (Reverse Transcription Kit s velikim kapacitetom; Applied Biosystems, Thermo Fisher, SAD).

Komercijalno dostupan komplet (Power SYBR Green PCR Master Mix; Applied Biosystems, Thermo Fisher, SAD) koji koristi odgovarajuće ljudske primere za cPLA2α (PLA2G4A), COX-1/2

(PTGS1/PTGS2), mPGES-1 korišten je za kvantitativnu analizu ekspresija (PTGES), mPGES-2 (PTGES2), cPGES (PTGES3) i TXAS (TBXAS1) gena. Ekspresija mRNA normalizirana je na referentnu mRNA gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) i izražena je kao ΔCt . Za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost ΔCt . Relativna ekspresija gena normalizirana je u odnosu na kontrolu (100 %).

3.2.6. Statistička obrada podataka

Aritmetička sredina korištena je kao mjera središnje tendencije skupine, a kao mjera varijacije podataka izražena je standardna devijacija (Excel 2007, Microsoft). Statistička značajnost razlika u određenim skupinama ispitivana je analizom varijance (ANOVA), nakon čega slijedi post-hoc Tukey HSD test, pomoću softvera Statistica 12.2. (StatSoft). Statističke hipoteze testirane su na razini statističke značajnosti 0,05, odnosno razlike na razini značajnosti (pouzdanosti) $p \leq 0,05$ smatrane su statistički značajnima.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. CITOTOKSIČNOST ISPITIVANIH SPOJEVA I SMJESA

Apigenin i luteolin, kao i drugi flavoni, prisutni su u hrani uglavnom u obliku O-glikozida. Posebno bogati izvori ovih derivata su čajevi, kao i začini poput lišća jaglaca, ružmarina, origana i drugih (Hostetler i sur., 2017). Brojne studije *in vitro* i *in vivo* ispitivale su bioraspoloživost, metabolizam i biološke aktivnosti fenolnih spojeva, ali malo je istraživanja usredotočeno na karakterizaciju njihove interakcije s drugim razredima spojeva. Primjerice, mediteranska prehrana, bogata začинима i ribom, vrlo često može sadržavati navedene flavonoide i masne kiseline DHA/EPA, a čiji potencijalni sinergijski/antagonistički učinci nisu poznati. U sklopu opsežnijih istraživanja biološke aktivnosti masnih kiselina i polifenolnih spojeva, ovaj rad predstavlja rezultate ispitivanja povezanih s procjenom protuupalnog potencijala kombinacija DHA, EPA i šest fenolnih spojeva (apigenin, apigenin-7-O-glukozid, apigenin-7-O-glukuronid, luteolin, luteolin-7-O-glukozid, luteolin-7-O-glukuronid) u smislu inhibicije stvaranja moćnih medijatora upale - PGE2 i TXA2 u modelnom sustavu ranih upala faze (monociti U937 stimulirani LPS-om).

Prva faza studije obuhvaćala je ispitivanje citotoksičnosti čistih spojeva i smjesa. Iako je u prethodnim radovima (Saw i sur., 2010; Jaudszus i sur., 2013) primijenjena koncentracija DHA i EPA bila 100 μM u RAW 264,7 stanicama ili primarnim monocitima, u ovom modelnom sustavu subtoksične koncentracije DHA i EPA su bile ispod 50 μM . Imajući na umu da su prethodne studije sugerirale da je omjer DHA i EPA 1 : 2 povoljan za smanjenje rizika od upale (Shang i sur., 2017), odabrane su netoksične koncentracije smjese ove dvije masne kiseline: 12,5 $\mu\text{mol/L}$ DHA i 25 $\mu\text{mol/L}$ EPA. Konačna smjesa, osim DHA i EPA, sadržavala je i flavonoid u koncentraciji od 2,5 $\mu\text{mol/L}$ (**Tablica 1, 2 i 3**).

Tablica 1 Udio vijabilnih stanica (odnos proba/kontrola) nakon tretmana U937 stanica ispitivanim flavonidima

	Fenol					
	Apigenin	Apigenin-7-O-glukozid	Apigenin-7-O-glukuronid	Luteolin	Luteolin-7-O-glukozid	Luteolin-7-O-glukuronid
Koncentracija (μM)	2,5					
Vijabilne stanice (%)	98,0 \pm 1,8	98,0 \pm 1,1	98,4 \pm 1,2	101 \pm 1,8	98,0 \pm 1,1	97,4 \pm 2,2

Tablica 2 Udio vijabilnih stanica (odnos proba/kontrola) nakon tretmana U937 stanica s EPA i DHA pri različitim koncentracijama

	EPA						
Koncentracija (μM)	150	100	50	25	12,5	6,25	3,12
Vijabilne stanice (%)	0	0	5 \pm 1	96,1 \pm 1,2	96,2 \pm 1,8	97,1 \pm 1,1	97,1 \pm 1,2
	DHA						
Koncentracija (μM)	150	100	50	25	12,5	6,25	3,12
Vijabilne stanice (%)	0	0	7 \pm 1	97,2 \pm 1,9	97,2 \pm 2,1	99,1 \pm 0,1	98,1 \pm 0,4

Tablica 3 Udio vijabilnih stanica (odnos proba/kontrola) nakon tretmana U937 stanica smjesama ispitivanih spojeva

	EPA i DHA					
Koncentracije (μM)	25 (EPA) 12,5 (DHA)	12,5 (EPA) 6,25 (DHA)	6,25 (EPA) 3,25 (DHA)			
Vijabilne stanice (%)	96,7 \pm 1,1	96,1 \pm 1,2	97,2 \pm 1,6			
	EPA, DHA i fenol					
Koncentracije (μM)	25 (EPA) 12,5 (DHA) 2,5 (apigenin)	25 (EPA) 12,5 (DHA) 2,5 (apigenin-7-O-glukozid)	25 (EPA) 12,5 (DHA) 2,5 (apigenin-7-O-glukuronid)	25 (EPA) 12,5 (DHA) 2,5 (luteolin)	25 (EPA) 12,5 (DHA) 2,5 (luteolin-7-O-glukozid)	25 (EPA) 12,5 (DHA) 2,5 (luteolin-7-O-glukuronid)
Vijabilne stanice (%)	97,7 \pm 1,5	98,1 \pm 1,4	97,0 \pm 1,0	95,7 \pm 1,2	96,1 \pm 0,2	98,2 \pm 0,6

4.2. UTJECAJ ISPITIVANIH SPOJEVA I SMJESA NA PROIZVODNJU PGE2 I TXA2

Jedan od mogućih načina suzbijanja upale je inhibiranje sinteze medijatora upale, eikosanoida PGE2 i TXA2, ili sprečavanje djelovanja enzima (prvenstveno inducibilnog COX-2) koji su uključeni u njihovu sintezu, što je zapravo djelovanje najpoznatijeg protuupalnog lijeka, aspirina. S druge strane, poznato je da su DHA i EPA jaka konkurencija AA na mjestu supstrata COX, tj. da mogu modulirati ekspresiju COX-2, koja je značajno povećana u upalnom procesu (Jaudszus i sur., 2013; Lee i sur., 2009).

Međutim, vrlo je malo studija proučavalo učinak kombinacija DHA, EPA i fenolnih spojeva u upalnim procesima. Na primjer, Saw i suradnici (2010) ispitali su protuupalno djelovanje

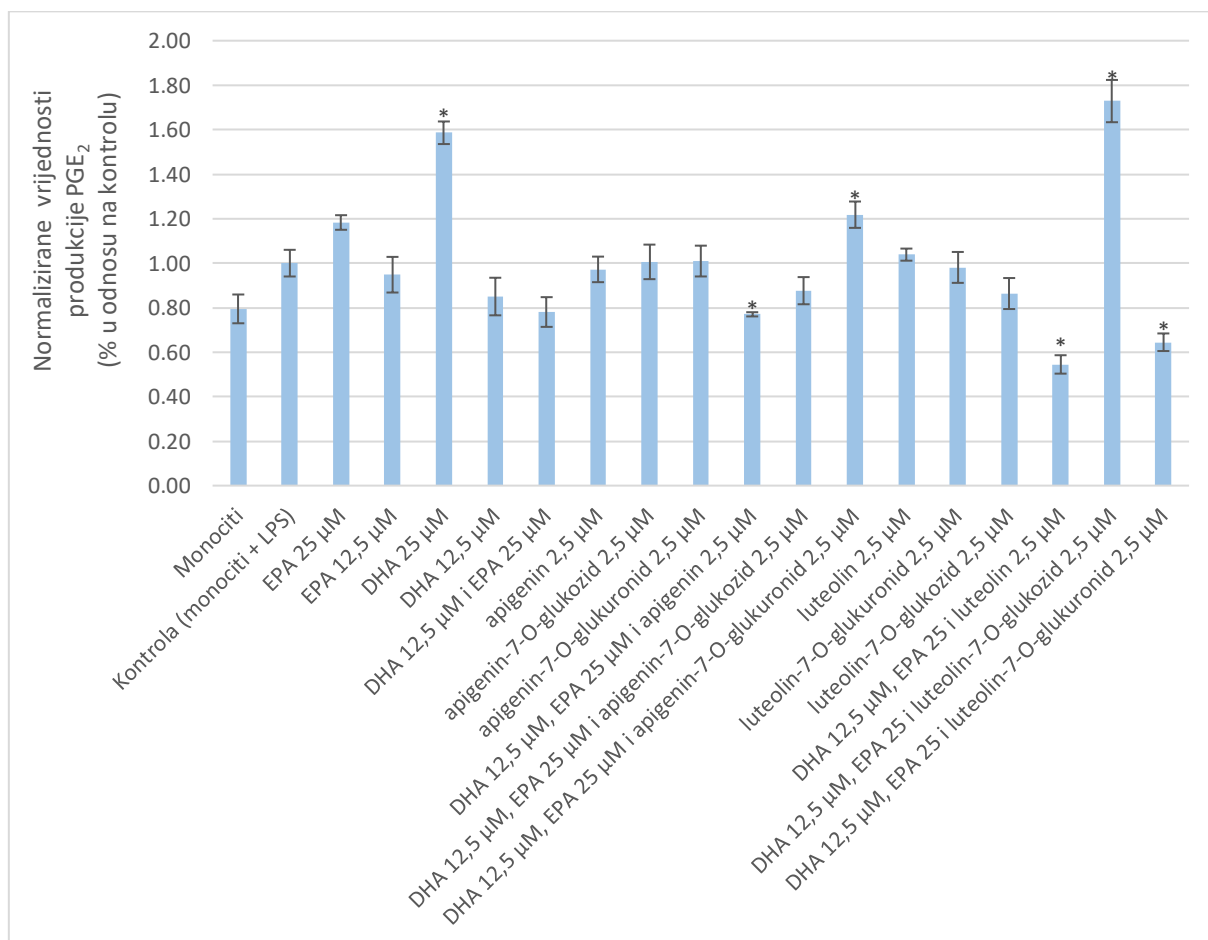
kurkumina u malim dozama u kombinaciji s DHA i EPA, Hadad i Levy (2017) ispitivali su učinak EPA, karotenoida i polifenola na transformaciju mikroglije, dok su Pallarès i suradnici (2012) otkrili da kombinacija resveratrola i EPA pojačava protuupalno djelovanje. Također, zasad nema podataka o utjecaju mješavina DHA, EPA i fenolnih spojeva testiranih u ovom radu na proizvodnju PGE2 i TXA2.

Tablica 4, kao i **Slike 8 i 9**, prikazuju normalizirane vrijednosti otkrivenih količina PGE2 i TXA2 u neobrađenim monocitima, kontroli (monociti stimulirani LPS-om) i monocitima stimuliranim LPS-om u prisutnosti ispitnih spojeva ili odgovarajućih smjesa (radni uzorci).

Tablica 4 Normalizirane vrijednosti produkcije PGE2 i TXA2 (% u odnosu na kontrolu), standardne devijacije (SD) i statistička značajnost (*p*)

Tip uzorka	PGE ₂	SD	p	TXA ₂	SD	p
Monociti	0,79	0,13	0,08	1,02	0,19	0,87
Kontrola (monociti + LPS)	1,00	0,12		1,00	0,17	
EPA 25 μM	1,18	0,07	0,10	1,19	0,07	0,27
EPA 12,5 μM	0,95	0,16	0,61	0,78	0,09	0,07
DHA 25 μM	1,39	0,14	0,07	0,84	0,16	0,26
DHA 12,5 μM	0,85	0,17	0,27	1,04	0,15	0,76
DHA 12,5 μM i EPA 25 μM	0,78	0,13	0,07	1,12	0,19	0,38
Apigenin 2,5 μM	0,97	0,11	0,79	0,84	0,09	0,15
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid 2,5 μM	1,01	0,16	0,96	1,07	0,19	0,74
Apigenin-7- <i>O</i> -glukuronid 2,5 μM	1,01	0,14	0,93	1,13	0,11	0,46
DHA 12,5 μM, EPA 25 μM i apigenin 2,5 μM	0,77	0,02	0,02	0,90	0,15	0,44
DHA 12,5 μM, EPA 25 μM i apigenin-7- <i>O</i> -glukozid 2,5 μM	0,88	0,12	0,21	0,88	0,12	0,26
DHA 12,5 μM, EPA 25 μM i apigenin-7- <i>O</i> -glukuronid 2,5 μM	1,22	0,12	0,04	1,01	0,16	0,95
Luteolin 2,5 μM	1,04	0,05	0,67	1,23	0,15	0,14
Luteolin-7- <i>O</i> -glukuronid 2,5 μM	0,98	0,14	0,87	1,23	0,17	0,14
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid 2,5 μM	0,86	0,14	0,23	1,09	0,03	0,38
DHA 12,5 μM, EPA 25 μM i luteolin 2,5 μM	0,54	0,08	0,01	1,36	0,09	0,01
DHA 12,5 μM, EPA 25 μM i luteolin-7- <i>O</i> -glukozid 2,5 μM	1,73	0,19	0,00	1,48	0,17	0,012
DHA 12,5 μM, EPA 25 μM i luteolin-7- <i>O</i> -glukuronid 2,5 μM	0,64	0,08	0,01	0,67	0,08	0,04

U primijenjenim koncentracijama, DHA, EPA i njihova smjesa nisu imale statistički značajan učinak na smanjenje proizvodnje PGE₂ niti TXA₂, što nije u skladu s prethodno dostupnim podacima (Jaudszus i sur., 2013.). Međutim, iako je osnovni *in vitro* biološki sustav bio gotovo isti (monociti U937 i primarni monociti), primijenjene koncentracije DHA i EPA u istraživanjima Jaudszusa i suradnika (2013) bile su znatno veće (100 μM), što je najvjerojatniji razlog aktivnosti u njihovom sustavu.

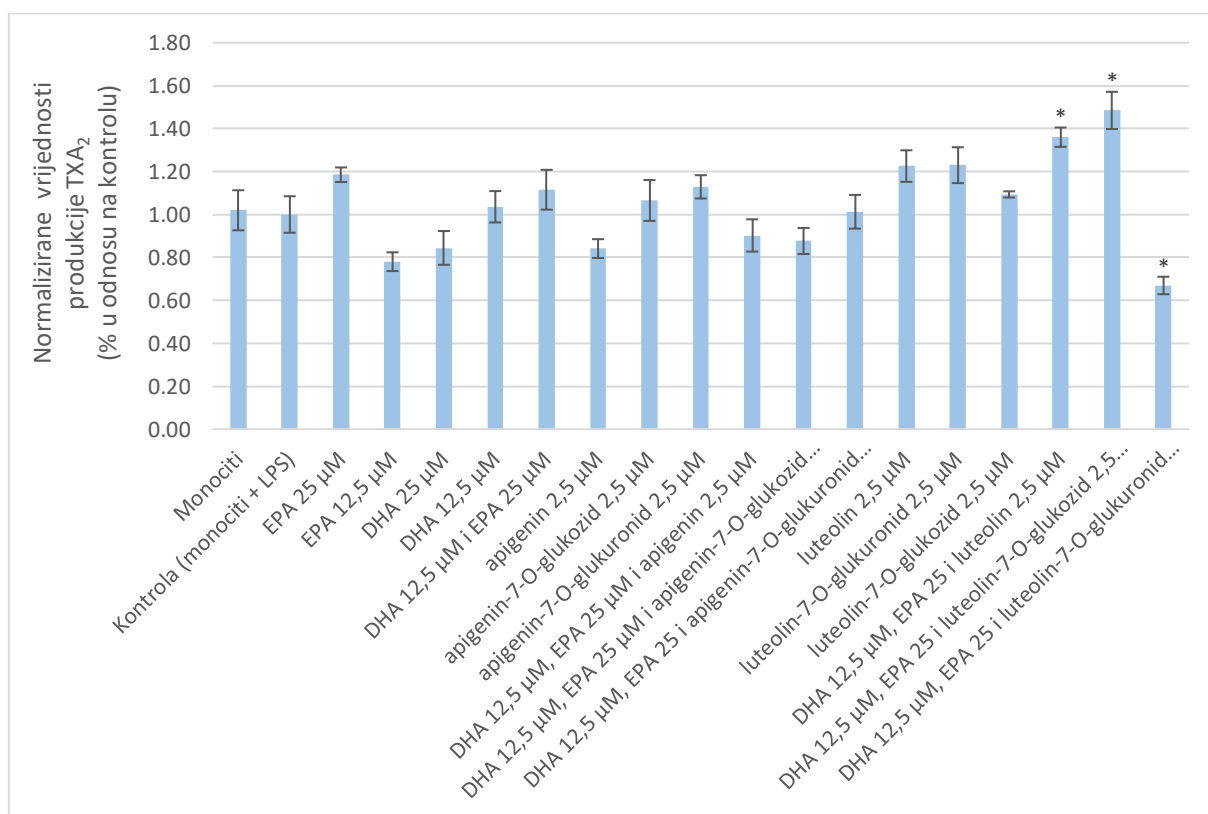


Slika 8 Utjecaj ispitivanih spojeva i smjesa na proizvodnju PGE₂

Također, pojedinačni fenolni spojevi nisu uzrokovali značajno smanjenje proizvodnje PGE₂ i TXA₂ tj., u primijenjenim koncentracijama, ispitivani spojevi nisu utjecali na metabolizam endogene arahidonske kiseline, što je rezultiralo proizvodnjom PGE₂ i TXA₂. Rezultati prethodnih istraživanja (Majkić i sur., 2020) pokazuju da apigenin, luteolin i njihovi 7-O-glukozidi imaju sposobnost modulacije metabolizma egzogene AA (proizvodnja PGE₂ i TXA₂),

što ukazuje na potrebu za daljnjim, detaljnijim studijama protuupalnih mehanizama koji uključuju i endogenu i egzogenu AA.

Iako pojedinačne komponente nisu bile aktivne, značajnu inhibiciju stvaranja PGE2 pokazale su smjese DHA, EPA i apigenina; DHA, EPA i luteolina te DHA, EPA i luteolin-7-*O*-glukuronida. S druge strane, smjese DHA, EPA i apigenin-7-*O*-glukuronida te DHA, EPA i luteolin-7-*O*-glukozida povećale su proizvodnju PGE2. Učinci pojedinih spojeva i smjesa na proizvodnju TXA2 vrlo su slični: u primijenjenim koncentracijama, samo smjesa DHA, EPA i luteolin-7-*O*-glukuronida smanjila je količinu TXA2, dok su smjese DHA, EPA i luteolin-7-*O*-glukozida kao i DHA, EPA i luteolina utjecale na povećanje. Moguće je da pojedini analizirani spojevi u određenim uvjetima imaju prooksidativno djelovanje, što nadalje može potaknuti lučenje medijatora upale (Yen i sur., 2003; Ding i sur., 2017).



Slika 9 Utjecaj ispitivanih spojeva i smjesa na proizvodnju TXA2

Na temelju dobivenih rezultata inhibicijskog potencijala na proizvodnju PGE2 i TXA2 koji pokazuju testni spojevi i smjese, može se zaključiti da niske koncentracije pojedinih spojeva mogu biti ograničavajući faktor, ali i da procjena biološkog potencijala nekog spoja mora

obuhvatiti i određivanje razina prekursora, ali i metabolita, jer njihove aktivnosti nisu nužno povezane. Također, prikazani rezultati ukazuju na protuupalni potencijal mješavina DHA, EPA i luteolina, odnosno njegovog metabolita i racionalnu osnovu za njihovo uključivanje u daljnje faze istraživanja.

4.3. UČINCI ISPITIVANIH SPOJEVA I SMJESA NA EKSPRESIJU mRNA

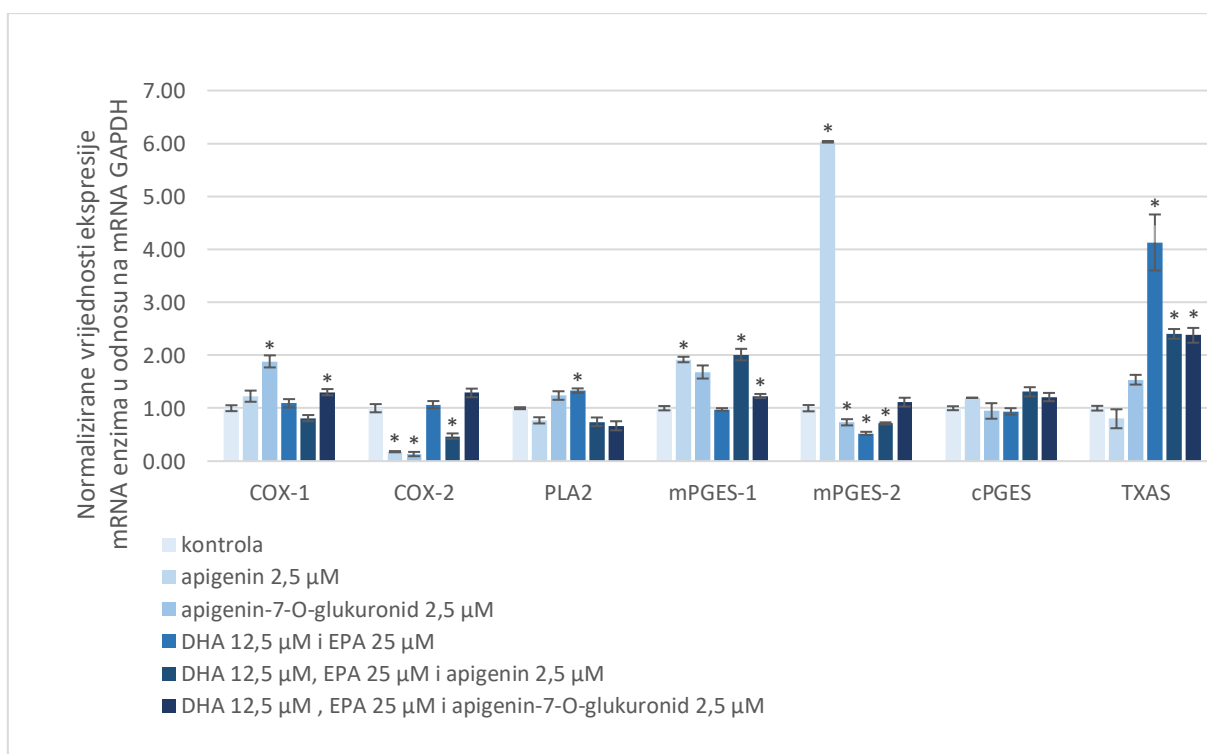
Općenito, proizvodnja PGE2 i TXA2 iz oslobođene arahidonske kiseline može se sa genetskog aspekta regulirati na nekoliko različitih razina:

- na transkripcijskoj razini (ekspresija mRNA enzima koji sudjeluju u sintezi PGE2 i TXA2),
- na translacijskoj razini (ekspresija enzima koji sudjeluju u sintezi PGE2 i TXA2),
- na razini samih enzima (inhibicija enzima koji sintetiziraju PGE2 i TXA2).

Kako bi se barem djelomično razjasnio mehanizam djelovanja, ispitan je učinak dijela tvari i smjesa na ekspresiju mRNA enzima koji sudjeluju u proizvodnji PGE2 i TXA2: cPLA2, COX-1/2, mPGES-1, mPGES -2, cPGES i TXAS.

Odabrane smjese prvenstveno su sadržavale glukuronide, jer predstavljaju oblike (metabolite) koji se također mogu pronaći *in vivo*, a koji, koliko je poznato, nikada nisu testirani u ovom sustavu te njihovim biološkim prethodnicima - apigeninu i luteolinu. Rezultati su prikazani na **Slikama 10 i 11**, kao i u **Tablici 5**.

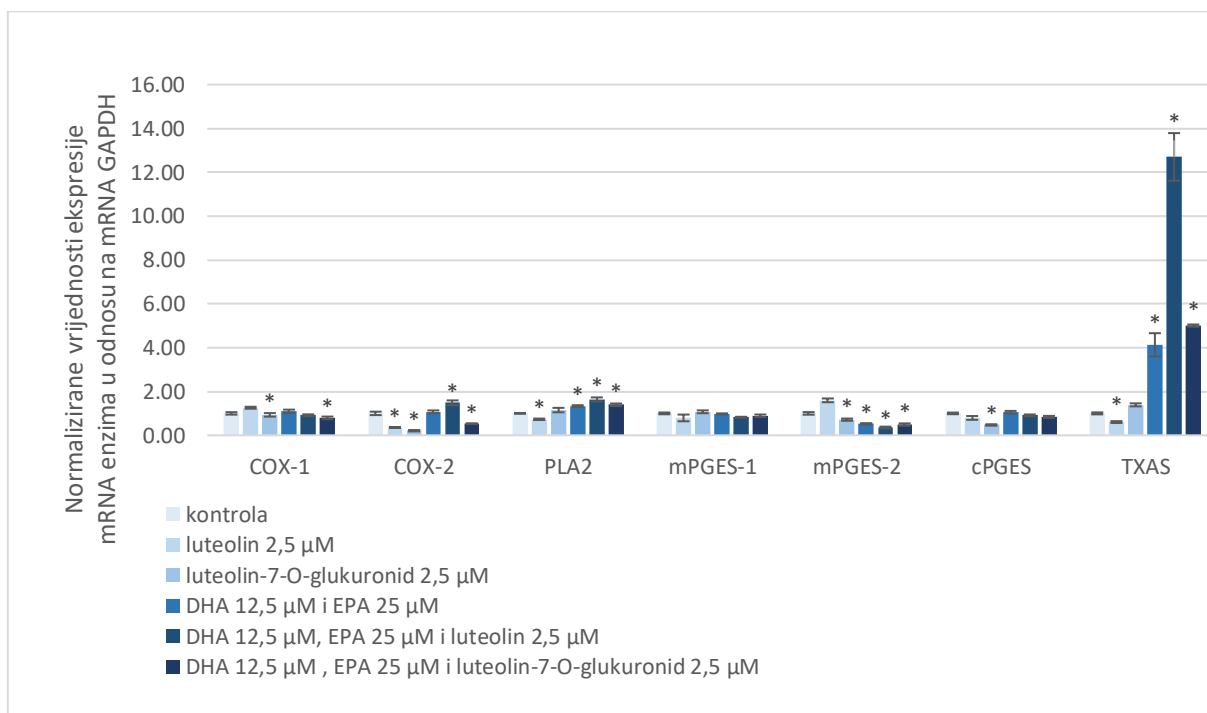
S obzirom na put ciklooksigenaze u metabolizmu arahidonske kiseline i glavne faze sinteze PGE2 i TXA2 (**Slika 2**), inhibicija ekspresije mRNA PLA2 (PLA2 - oslobađanje arahidonske kiseline) i inhibicija ekspresije mRNA COX-2 (COX-2 - stvaranje ključnog prekursora) mogu se smatrati najvažnijim fazama u kojima se može dogoditi regulacija (na genetskoj razini) proizvodnje PGE2 i TXA2. U terminalnim fazama sinteze PGE2, mPGES-1 se može označiti kao najvažniji, jer je povezan s COX-2, dok je TXAS ključni terminalni enzim za sintezu TXA2.



Slika 10 Utjecaj apigenina, apigenin-7-*O*-glukuronida i njihovih smjesa s DHA i EPA na ekspresiju mRNA enzima uključenih u proizvodnju PGE2 i TXA2

Na temelju rezultata prikazanih na **Slikama 10 i 11**, može se primijetiti da su apigenin i luteolin pokazivali modulacijski učinak koji je bio u skladu s prethodnim rezultatima (Majkić i sur., 2020). Zanimljivo je da su i apigenin- i luteolin-7-*O*-glukuronid snažno inhibirali ekspresiju COX-2 mRNA. Ekspresija mRNA COX-2 pri tretmanu apigenin-7-*O*-glukuronidom smanjena je oko sedam puta, a luteolin-7-*O*-glukuronidom oko pet puta u odnosu na kontrolu (monociti tretirani LPS-om) (**Tablica 5**). Međutim, 7-*O*-glukuronidi, u smjesi s DHA i EPA, imali su slabiju aktivnost: smjesa DHA, EPA i apigenin-7-*O*-glukuronida nije značajno utjecala na ekspresiju, dok je smjesa DHA, EPA i luteolin-7-*O*-glukuronida prepolovila ekspresiju COX-2 mRNA. Sukladno prethodnim rezultatima (Majkić i sur., 2020), ekspresija mPGES-1 mRNA povećala se tijekom supresije COX-2 mRNA. Naime, mPGES-1 se smatra enzimom povezanim s COX-2, za razliku od COX-1 koji ima veći afinitet za spajanje s TXAS-om, prostaglandin F sintazom (PGFS) i citosolnim PGES-om (Rouzer i Marnet, 2009; Ricciotti i Fitzgerald, 2011). Kako utvrđena ekspresija gena nije u direktnoj korelaciji s proizvodnjom PGE2 i TXA2, mogući su utjecaji apliciranih komponenata na razini samih enzima koji sintetiziraju PGE2 i TXA2, što u ovoj studiji

nije praćeno. Sudjelovanje više mehanizama i kompleksnost spomenutih interakcija zahtijevaju dodatne eksperimente za jasniji uvid.



Slika 11 Utjecaj luteolina, luteolin-7-*O*-glukuronida i njihovih smjesa s DHA i EPA na ekspresiju mRNA enzima ukljućenih u proizvodnju PGE2 i TXA2

Iako je poznato da DHA i EPA mogu modulirati ekspresiju COX-2 (Lee i sur., 2009), u ovom istraživanju sama mješavina DHA i EPA nije značajno utjecala na ekspresiju mRNA većine enzima (najvjerojatnije zbog niske koncentracija), osim dvostrukog smanjenja ekspresije mPGES-2 mRNA i četverostruke indukcije TXAS mRNA. Međutim, uočeno je da uzorci koji sadrže smjese omega-3 masnih kiselina i flavonoida (osim dva uzorka - s luteolinom i luteolin 7-*O*-glukuronidom) povećavaju ekspresiju TXAS mRNA (**Slike 10 i 11**), i to povećanje nije izravno povezano s količinom proizvedenog TXA2.

Tablica 5 Normalizirane vrijednosti mRNA enzima u odnosu na mRNA GAPDH, standardne devijacije (SD) i statistička značajnost (p).

Uzorak	COX-1			COX-2			PLA ₂			mPGES-1			mPGES-2			ePGES			TXAS		
	AV Norm.	SD	p	AV Norm.	SD	p	AV Norm.	SD	p	AV Norm.	SD	p	AV Norm.	SD	p	AV Norm.	SD	p	AV Norm.	SD	p
apigenin 2,5 uM	1,23	0,21	0,20	0,18	0,02	0,00	0,77	0,12	0,17	1,92	0,10	0,05	6,03	0,03	0,00	1,20	0,00	0,06	0,80	0,06	0,08
apigenin-7-O-glukuronid 2,5 uM	1,88	0,23	0,01	0,13	0,08	0,02	1,24	0,16	0,34	1,68	0,25	0,06	0,73	0,12	0,04	0,95	0,29	0,79	1,54	0,36	0,14
DHA 25 uM, EPA 12,5 uM i apigenin 2,5 uM	0,81	0,12	0,11	0,47	0,10	0,01	0,74	0,16	0,11	2,01	0,22	0,01	0,71	0,04	0,04	1,31	0,17	0,07	2,40	0,18	0,00
DHA 25 uM, EPA 12,5 uM i apigenin-7-O-glukuronid 2,5 uM	1,30	0,12	0,03	1,29	0,16	0,09	0,67	0,17	0,07	1,23	0,08	0,02	1,11	0,17	0,37	1,21	0,16	0,13	2,38	0,28	0,01
DHA 25 uM i EPA 12,5 uM	1,09	0,16	0,53	1,07	0,13	0,51	1,33	0,08	0,04	0,98	0,05	0,77	0,52	0,06	0,02	0,94	0,12	0,59	4,13	1,06	0,04
luteolin 2,5 uM	1,26	0,09	0,02	0,36	0,02	0,00	0,73	0,07	0,01	0,79	0,31	0,52	1,60	0,17	0,09	0,47	0,17	0,02	0,60	0,09	0,05
luteolin-7-O-glukuronid 2,5 uM	0,93	0,16	0,57	0,21	0,06	0,03	1,15	0,20	0,54	1,07	0,13	0,76	0,71	0,10	0,04	1,05	0,06	0,34	1,39	0,14	0,18
DHA 25 uM, EPA 12,5 uM i luteolin 2,5 uM	0,91	0,09	0,22	1,48	0,22	0,05	1,64	0,18	0,01	0,82	0,04	0,07	0,35	0,09	0,00	0,91	0,09	0,29	12,70	2,17	0,01
DHA 25 uM, EPA 12,5 uM i luteolin-7-O-glukuronid 2,5 uM	0,79	0,12	0,09	0,53	0,04	0,00	1,39	0,12	0,01	0,89	0,11	0,28	0,49	0,11	0,00	0,84	0,09	0,11	5,01	0,10	0,00
Kontrola (monociti + LPS)	1,00	0,11		1,00	0,15		1,00	0,04		1,00	0,08		1,00	0,12		1,00	0,07		1,00	0,09	

Tablica 6 Pearsonovi koeficijenti korelacije između proizvedenih količina PGE2 i TXA2 i ekspresije mRNA enzima uključenih u njihovu proizvodnju

	COX-1	COX-2	PLA2	mPGES-2	mPGES-1	cPGES	TXAS
PGE2	0,612	-0,295	-0,734	0,306	0,233	0,106	
TXA2	0,210	0,292	0,267	-0,330	-0,410	-0,351	0,311

Uočeno je da nema većeg stupnja korelacije između proizvedenih količina PGE2 i TXA2 i ekspresije mRNA enzima uključenih u njihovu proizvodnju (**Tablica 6**), a u nekim je slučajevima uočen i izuzetno nizak stupanj korelacije, što jasno ukazuje na složenost reguliranja njihove sinteze te na to da se ne mogu isključiti događaji na translacijskoj i razini inhibicije samog enzima.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, a u odnosu na postavljene hipoteze, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Kombiniranje DHA i EPA masnih kiselina s fenolnim spojevima utječe na protuupalni potencijal ovih spojeva. Utvrđeno je da taj utjecaj, u sustavu u kojem je ispitivan, može biti sinergistički ili antagonistički, ovisno o primijenjenim koncentracijama i kombinacijama analiziranih spojeva;
- Ustanovljeno je da biološki potencijali prekursora i odgovarajućih metabolita nisu nužno povezani;
- Dokazan je protuupalni potencijal kombinacija DHA, EPA i luteolina, odnosno njegovog metabolita, te je utvrđena racionalna osnova za njihovo uključivanje u daljnje faze istraživanja, kao i za testiranje ublažavanja simptoma umora i CFS-a.

Kao uzorci s najpotentnijim proupalnim potencijalom od svih testiranih uzoraka pokazala se kombinacija DHA i EPA s luteolin-7-*O*-glukuronidom, izazivajući značajnu inhibiciju stvaranja obje proupalne komponente - PGE₂ i TXA₂; i kombinacija s luteolinom značajno inhibirajući stvaranje PGE₂.

Također, spomenuti uzorak smjese omega-3 masnih kiselina i luteolin-7-*O*-glukuronida je pokazao i modularni, inhibirajući učinak na ekspresiju COX-2 mRNA, dok su 7-*O*-glukuronidi luteolina i apigenina potentno inhibirali ekspresiju tog enzima;

Nizak stupanj korelacije između utjecaja na ekspresiju mRNA ispitivanih enzima i proizvedene količine PGE₂ i TXA₂ ukazuje na složenost regulacije njihove sinteze, kao i na potencijalne interferencije na translacijskoj i razini inhibicije samog enzima.

6. LITERATURA

- Arab-Tehrany E, Jacquot M, Gaiani C, Imran M, Desobry S, Linder M: Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Trends in Food Science & Technology* 25: 24-33, 2012.
- Aziz N, Kim MY, Cho JY: Anti-inflammatory effects of luteolin: A review of in vitro, in vivo, and in silico studies. *Journal of Ethnopharmacology* 225: 342-358, 2018.
- Bailey MA, Holscher HN: Microbiome-Mediated Effects of the Mediterranean Diet on Inflammation. *Advances in Nutrition* 9: 193–206, 2018.
- Bannenberg G, Mallon C, Edwards H, Yeadon D, Yan K, Johnson H, Ismail A: Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid content and oxidation state of fish oil supplements in New Zealand. *Scientific Reports* 7: 1-13, 2017.
- Borren NZ, van der Woude CJ, Ananthakrishnan AN: Fatigue in IBD: epidemiology, pathophysiology and management. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 16: 247-259, 2019.
- Cairns JA: The coxibs and traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a current perspective on cardiovascular risks. *Canadian Journal of Cardiology* 23: 125-131, 2007.
- Calder, PC: Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochemical Society Transactions* 45: 1105-1115, 2017.
- Comert ED, Gokmen V: Review Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Research International* 76-93, 2018.
- Cvejić Hogervorst J, Atanacković Krstonošić M, Bursać M, Miljić U: *Polyphenols*. U: Nutraceutical and Functional Food Components: Effects of Innovative Processing Techniques. Galanakis CM (ur.). Elsevier, Academic press, str. 203-258, 2017.
- Cvejić Hogervorst J, Russo G, Godos J, Mimica-Dukić N, Simin N, Bjelica A, Grosso G: Beneficial effects of polyphenols on chronic diseases and ageing. U: *Polyphenols: Properties, Recovery and Applications*. Galanakis CM (ur.). Elsevier, Academic press, str. 69-102, 2018.
- Cvejić Hogervorst J, Verardo V, Bernard O, Bonfond H, Langelotti L: Microalgae as a source of edible oils. U: *Lipids and Edible Oils: Properties, Processing and Applications*. Galanakis CM (ur.). Elsevier, Academic press, 2019.
- De Boer AA, Ismail A, Marshall K, Bannenberg G, Yan KL, Rowe WJ: Examination of marine and vegetable oil oxidation data from a multi-year, third-party database. *Food Chemistry* 254: 249-255, 2018.
- Demasi, M., Caughey, G E, James, M J, Cleland, L G: Assay of cyclooxygenase-1 and 2 in human monocytes. *Inflammation Research* 49: 737–743, 2000.

- Ding Y, Ren K, Dong H, Song F, Chen J, Guo Y, Liu Y, Tao W, Zhang Y: Flavonoids from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves inhibit proliferation and induce apoptosis in PC-3 cells by activation of oxidative stress and mitochondrial apoptosis. *Chemico-Biological Interactions* 275: 210-217, 2017.
- Edwards IJ, O'Flaherty JT: Omega-3 fatty acids and PPAR in cancer. *PPAR Research* Article ID 358052, 2008.
- European Nutraceutical Association (2021) Dostupno na: <https://www.enaonline.eu/> [20.06.2021].
- Finsterer J, Mahjoub SZ: Fatigue in healthy and diseased individuals. *American Journal of Hospice and Palliative Medicine* 31: 562-575, 2014.
- Fouquier J, Guedj M: Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology Research & Perspectives* 3: 00149, 2015.
- Gierse JK, McDonald JJ, Hauser SD, Rangwala SH, Koboldt CM, Seibert K: A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and- 2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 271: 15810-15814, 1996.
- Ginwala R, Bhavsar R, Chigbu DGI, Jain P, Khan ZK: Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin. *Antioxidants* 8: 35, 2019.
- Grúz P: Lipid peroxidation, diet, and the genotoxicology of aging, Chapter 12. U: *Molecular basis of nutrition and aging*. Malavolta M, Mocchegiani E (ur.). Elsevier, Academic Press, str. 155-176, 2016.
- Hadad N, Levy R: Combination of EPA with Carotenoids and Polyphenol Synergistically Attenuated the Transformation of Microglia to M1 Phenotype Via Inhibition of NF-κB. *Neuromolecular Medicine* 19: 436-451, 2017.
- Haney E, Smith MB, McDonagh M, Pappas M, Daeges M, Wasson N, Nelson HD: Diagnostic methods for myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: a systematic review for a National Institutes of Health Pathways to Prevention Workshop. *Annals of Internal Medicine* 162: 834-840, 2015.
- Haß U, Herpich C, Norman K: Anti-inflammatory diets and fatigue. *Nutrients* 11: 2315, 2019.
- Hoppenbrouwers T, Cvejić Hogervorst JH, Garssen J, Wichers HJ, Willemsen LE: Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids (LCPUFAs) in the prevention of Food Allergy. *Frontiers in Immunology, Frontiers in Immunology*, section Nutritional Immunology 10: 1118, 2019.

- Hostetler, G. L., Ralston, R. A., Schwartz, S. J.: Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. *Advances in Nutrition* (Bethesda, Md.) 8: 423–435, 2017.
- Ishihara T, Yoshida M, Arita M: Omega-3 fatty acid-derived mediators that control inflammation and tissue homeostasis. *International Immunology* 31: 559-567, 2019.
- Jaudszus, A., Gruen, M., Watzl, B., Ness, C., Roth, A., Lochner, A., Barz, D., Gabriel, H., Rothe, M., Jahreis, G: Evaluation of suppressive and pro-resolving effects of EPA and DHA in human primary monocytes and T-helper cells. *Journal of Lipid Research*, 54: 923–935, 2013.
- Jiang YJ, Lu, B, Choy PC, Hatch, G M: Regulation of cytosolic phospholipase A2, cyclooxygenase-1 and-2 expression by PMA, TNF α , LPS and M-CSF in human monocytes and macrophages. In *Vascular Biochemistry* 31-38, 2003.
- Jonsjö MA, Wicksell RK, Holmström L, Andreasson A, Olsson GL: Acceptance & commitment therapy for ME/CFS (Chronic Fatigue Syndrome)—a feasibility study. *Journal of Contextual Behavioral Science* 12: 89-97, 2019.
- Khanapure SP, Garvey DS, Janero DR, Gordon Letts L: Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 7: 311-340, 2007.
- Labuschagne IL, Blaauw R: An anti-inflammatory approach to the dietary management of multiple sclerosis: a condensed review. *South African Journal of Clinical Nutrition* 31: 67-73, 2018.
- Lee SA, Kim, HJ, Chang KC, Baek JC, Park,JK, Shin JK, Choi WJ, Lee JH, Paik WY: DHA and EPA Down-regulate COX-2 Expression through Suppression of NF-kappaB Activity in LPS-treated Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 13: 301–307, 2009.
- Luo C, Xu X, Wei X, Feng W, Huang H, Liu H, Xu R, Lin J, Li H, Zhang D: Natural medicines for the treatment of fatigue: Bioactive components, pharmacology, and mechanisms. *Pharmacological Research* 148: 104409, 2019.
- Maes M, Twisk FN, Kubera M, Ringel K: Evidence for inflammation and activation of cell-mediated immunity in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS): increased interleukin-1, tumor necrosis factor- α , PMN-elastase, lysozyme and neopterin. *Journal of Affective Disorders* 136: 933-939, 2012.
- Majkić T, Bekvalac K, Beara I: Plantain (*Plantago L.*) species as modulators of prostaglandin E2 and thromboxane A2 production in inflammation. *Journal of Ethnopharmacology* 262: 113140, 2020.

- Marina Đ, Pavlović M, Trbojević B, Popović V, Kostić N, Čaparević Z, Jelić S, Žarković M: Sindrom hroničnog zamora - zdravi, bolesni ili nešto između? *Medicinski Glasnik* 13: 55-76, 2008.
- Mimica-Dukić N, Beara I, Vojnović T, Cvejić JH: Bioactives for Neuronal and Immune Functions. U: *Food Bioactives and Health*. Galanakis CM (ur.). Springer, str. 269-305, 2021.
- Morita I: Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68: 165-175, 2002.
- Nacul L, Authier J, Scheibenbogen C, Lorusso L, Helland I, Alegre MJ, Sirbu CA, Mengshoel AM, Polo O, Behrends U, Nielsen H, Grabowski P, Sekulic S, Sepulveda N, Esteves Lopez F, Zalewski P, Pheby D, Castro-Marrero J, Sakkas G, Bergquist J, Capelli E, Brandslund I, Cullinan J, Krumina A, Murovska M, Vermuelen R, Lacerda E: EUROPEAN ME NETWORK (EUROMENE) *Expert Consensus on the Diagnosis, Service Provision and Care of People with ME/CFS in Europe*. Preprints 2020.
- Pallarès V, Calay D, Cedó L, Castell-Auví A, Raes M, Pinent M, Ardévol A, Arola L, Blay M: Enhanced anti-inflammatory effect of resveratrol and EPA in treated endotoxin-activated RAW 264.7 macrophages. *British Journal of Nutrition* 108:1562-1573, 2012.
- Peng F, Yin H, Du B, Niu K, Ren X, Yang Y: Anti-fatigue activity of purified flavonoids prepared from chestnut (*Castanea mollissima*) flower. *Journal of Functional Foods* 79: 104365, 2021.
- Penglis PS, Cleland LG, Demasi M, Caughey GE, James MJ: Differential regulation of prostaglandin E2 and thromboxane A2 production in human monocytes: implications for the use of cyclooxygenase inhibitors. *Journal of Immunology* 165:1605-1611, 2000.
- Ribeiro D, Freitas M, Lima JL, Fernandes E: Proinflammatory pathways: the modulation by flavonoids. *Medicinal Research Reviews* 35: 877-936, 2015.
- Ricciotti E, Fitzgerald GA: Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31: 986–1000, 2011.
- Richman S, Morris MC, Broderick G, Craddock TJ, Klimas NG, Fletcher MA: Pharmaceutical interventions in chronic fatigue syndrome: a literature-based commentary. *Clinical Therapeutics* 41: 798-805, 2019.
- Ricker MA, Haas WC: Anti-Inflammatory Diet in Clinical Practice: A Review. *Nutrition in Clinical Practice* 32: 318-325, 2017.
- Ross SD, Estok RP, Frame D, Stone LR, Ludensky V, Levine CB: Disability and chronic fatigue syndrome: a focus on function. *Archives of Internal Medicine* 164: 1098-1107, 2004.

- Rouzer CA, Marnett LJ: Cyclooxygenases: structural and functional insights. *Journal of Lipid Research* 50: S29-S34, 2009.
- Sandler CX, Lloyd AR: Chronic fatigue syndrome: progress and possibilities. *Medical Journal of Australia* 212: 428-433, 2020.
- Saw CL, Huang Y, Kong AN: Synergistic anti-inflammatory effects of low doses of curcumin in combination with polyunsaturated fatty acids: docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid. *Biochemical Pharmacology* 79: 421-430, 2010.
- Shang T, Liu L, Zhou J, Zhang M, Hu Q, Fang M, Wu Y, Yao P, Gong Z: Protective effects of various ratios of DHA/EPA supplementation on high-fat diet-induced liver damage in mice. *Lipids in Health and Disease* 16: 65, 2017.
- Sitzia C, Meregalli M, Belicchi M, Farini A, Arosio M, Bestetti D, Villa C, Valenti L, Brambilla P, Torrente Y: Preliminary evidences of safety and efficacy of flavonoids-And omega 3-based compound for muscular dystrophies treatment: a randomized double-blind placebo controlled pilot clinical trial. *Frontiers in Neurology* 10: 755, 2019.
- Smith WL: The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochemical Journal* 259: 315-324, 1989.
- Soberman RJ, Christmas P: The organization and consequences of eicosanoid signaling. *The Journal of Clinical Investigation* 111: 1107-1113, 2003.
- Stadje R, Dornieden K, Baum E, Becker A, Biroga T, Bösner S, Haasenritter J, Keunecke C, Viniol A, Donner-Banzhoff N: The differential diagnosis of tiredness: a systematic review. *BMC Family Practice* 17: 1-11, 2016.
- Tian C, Liu X, Chang Y, Wang R, Lv T, Cui C, Liu M: Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin. *South African Journal of Botany* 137: 257-264, 2021.
- Tosti V, Bertozzi B, Fontana L: Health Benefits of the Mediterranean Diet: Metabolic and Molecular Mechanisms *Journals of Gerontology: Biological Sciences* 73: 318–326, 2018.
- Yen GC, Duh PD, Tsai PD, Huang SL: Pro-oxidative Properties of Flavonoids in Human Lymphocytes. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 67: 1215–1222, 2003.
- Wan JJ, Qin Z, Wang PY, Sun Y, Liu X: Muscle fatigue: general understanding and treatment. *Experimental & Molecular Medicine* 49: 384, 2017.
- Williams MV, Cox B, Lafuse WP, Ariza ME: Epstein-Barr virus dUTPase induces neuroinflammatory mediators: implications for myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Clinical Therapeutics* 41: 848-863, 2019.

Wilson J, Morgan S, Magin P, van Driel M: Fatigue - a rational approach to investigation. *Australian Family Physician* 43: 457, 2014.

Wong E, DeLuca C, Boily C, Charleson S, Cromlish W, Denis D, Kargman BP, Ouellet M, Skorey K, O'Neill GP, Vickers PJ, Riendeau D: Characterization of autocrine inducible prostaglandin H synthase-2 (PGHS-2) in human osteosarcoma cells. *Inflammation Research* 46: 51-59, 2017.