In vitro učinci resveratrola i ferocenskog derivata resveratrola na kulture stanica ovarija i keratinocita

Doskočil, Bruno

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:525338

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Bruno Doskočil

IN VITRO UČINCI RESVERATROLA I FEROCENSKOG DERIVATA RESVERATROLA NA KULTURE STANICA OVARIJA I KERATINOCITA

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za toksikologiju Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Kmetič te uz pomoć dr. sc. Marine Miletić i doc. dr. sc. Teute Murati.

Ovaj rad je izrađen u sklopu HRZZ projekta **IP-2020-02-9162** *„Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija“* voditeljice prof. dr.sc. Lidije Barišić.

Veliko hvala prof. dr. sc. Ivani Kmetič za mentorstvo, veliko strpljenje i pomoć pri izradi diplomskog rada. Također hvala i doc. dr. sc. Teuti Murati na stalnom ohrabrenju te savjetima prilikom pisanja. Za veliku pomoć pri izradi praktičnog dijela diplomskog rada te uvijek ugodnoj radnoj atmosferi zahvalio bih se dr. sc. Marini Miletić. Hvala Vam što ste uvijek bile pozitivne, nasmijane te uvijek spremne pomoći. Upravo zbog toga sam se tijekom cijelog ovog procesa izrade diplomskog rada osjećao kao četvrti član Vašeg laboratorija.

Najveće zahvale idu mojim roditeljima, Mihaeli i Kristijanu, bez kojih nikada ne bih bio tu gdje sam sada. Hvala vam što ste mi bili vjetar u leđa cijeli moj život i omogućili mi sve što mi je ikad trebalo, ovo je za vas.

Zahvalio bih se i ostatku svoje obitelji što su uvijek bili uz mene, svojoj djevojci Lari na stalnoj podršci i svim svojim prijateljima koji su uvijek tu uz mene.

Posebna zahvala ide svim mojim gorilicama na pet prekrasnih godina punih uspomena i provoda za cijeli život. Bez vas ovaj fakultetski dio života ne bi bio isti.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za toksikologiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

IN VITRO UČINCI RESVERATROLA I FEROCENSKOG DERIVATA RESVERATROLA NA KULTURE STANICA OVARIJA I KERATINOCITA

Bruno Doskočil, univ. bacc. nutr.
0058214732

Sažetak: U ovom radu ispitan je učinak resveratrola (RSV) te ferocenskog derivata resveratrola (RF) (5, 20, 50 i 100 μM) na indukciju stanične smrti u kulturama stanica ovarija (CHO-K1 stanična linija) i keratinocita (HaCaT stanična linija). Uz to, praćena je i vijabilnost te proliferacija stanica metodama *Neutral Red* i *Trypan Blue*. Nakon tretmana stanica RSV-om u obje stanične linije zabilježene su niže IC vrijednosti dobivene *Trypan Blue* metodom u odnosu na *Neutral Red* test što se može objasniti povećanjem broja i veličine lizosoma te većom količinom vezane boje *Neutral Red* u tretiranih stanica u odnosu na netretirane. Tretman HaCaT stanica RSV-om rezultirao je blago povećanim udjelom stanica u apoptozi u odnosu na kontrolni uzorak, dok je u CHO-K1 kulturi stanica taj učinak bio izraženiji i statistički značajan (u dozama ≥20 μM). RSV je potaknuo autofagiju u obje kulture stanica, a vrijednost *autophagy induction ratio* varira ovisno o primijenjenoj koncentraciji. RF je pri dozama ≥ 20 μM uzrokovao statistički značajno (p<0,001) smanjenje udjela stanica koje odumiru autofagijom u odnosu na kontrolni uzorak, što ukazuje na izmijenjenu biološku aktivnost od djelovanja samog RSV-a koji statistički značajno inducira autofagiju u CHO-K1 kulturi stanica.

Ključne riječi: *apoptoza, autofagija ,resveratrol, ferocenski derivat resveratrola, vijabilnost stanica*

Rad sadrži: 55 stranica, 23 slike, 1 tablicu, 60 literaturnih navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: prof. dr. sc. Ivana Kmetič
Pomoć pri izradi: dr. sc. Marina Miletić
doc. dr. sc. Teuta Murati
Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Teuta Murati (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ivana Kmetič (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (član)
4. prof. dr. sc. Igor Slivac (zamjenski član)

Datum obrane: 28. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Toxicology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

IN VITRO EFFECTS OF RESVERATROL AND FERROCENE DERIVATIVE OF RESVERATROL ON OVARIAN AND KERATINOCYTE CELL CULTURES

Bruno Doskočil, univ. bacc. nutr.
0058214732

Abstract: In this study, the effect of resveratrol (RSV) and the ferrocene derivative of resveratrol (RF) (5, 20, 50 and 100 μM) on the induction of cell death in ovarian cell culture (CHO-K1 cell line) and keratinocytes (HaCaT cell line) was determined. In addition, viability and cell proliferation were monitored using the *Neutral Red* and *Trypan Blue* methods. After treatment of cells with RSV, lower IC values obtained by the *Trypan Blue* method compared to the *Neutral Red* test were recorded in both cell lines, which can be explained by an increase in the number and size of lysosomes. Treatment of HaCaT cells with RSV resulted in a slightly increased proportion of cells undergoing apoptosis compared to the control sample, whereas in CHO-K1 cell culture this effect was more pronounced and statistically significant (at doses ≥20 μM). RSV induced autophagy in both cell cultures, and the value of the autophagy induction ratio varied depending on the concentration applied. At doses ≥ 20 μM, RF caused a statistically significant (p<0.001) decrease in the proportion of cells that die by autophagy compared to the control sample, indicating altered biological activity of RF compared to the action of RSV itself (which induced autophagy in CHO-K1 cell culture).

Keywords: *apoptosis, autophagy, resveratrol, ferrocene derivative of resveratrol, cell viability*
Thesis contains: 55 pages, 23 figures, 1 table, 60 references
Original in: Croatian
Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology**,** Kačićeva 23, Zagreb.
Mentor: Ivana Kmetič, PhD, Full professor
Technical support and assistance: Marina Miletić, PhD, Scientific assistant
Teuta Murati, PhD, Assistant professor
Reviewers:

1. Teuta Murati, PhD, Assistant professor (president)
2. Ivana Kmetič, PhD, Full professor (mentor)
3. Kristina Radošević, PhD, Associate professor (member)
4. Igor Slivac, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 28th, 2023

Sadržaj

1.UVOD ... 1

2. TEORIJSKI DIO ... 2

2.1. STANIČNA SMRT ... 2

2.1.1. Autofagija ... 3

2.1.2. Apoptoza ... 4

2.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST RESVERATROLA ... 5

2.2.1. Protuupalni učinci resveratrola ... 7

2.2.2. Antioksidacijsko djelovanje resveratrola ... 8

2.2.3. Učinci resveratrola na procese starenja ... 9

2.2.4. Resveratrol i stanična smrt ... 11

2.3. METODE POBOLJŠANJA APSORPCIJE I BIOLOŠKE AKTIVNOSTI RESVERATROLA ... 12

2.4. *IN VITRO* TOKSIKOLOGIJA ... 14

3. EKSPERIMENTALNI DIO ... 15

3.1. MATERIJALI ... 15

3.1.1. Biološki materijal ... 15

3.1.2. Kemikalije ... 15

3.1.3. Otopine i puferi ... 16

3.1.4. Oprema i uređaji ... 21

3.2. METODE RADA ... 21

3.2.1. Uzgoj CHO-K1 i HaCaT staničnih linija ... 21

3.2.2. Određivanje vijabilnosti stanica ... 22

3.2.3. Detekcija apoptoze protočnom citometrijom ... 23

3.2.4. Detekcija autofagije protočnom citometrijom ... 24

3.2.5. Obrada rezultata ... 25

4. REZULTATI I RASPRAVA ... 26

4.1. UČINAK RESVERATROLA I FEROCENSKOG DERIVATA RESVERATROLA NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU HaCaT I CHO-K1 STANICA ... 26

4.1.1. Učinak resveratrola i ferocenskog derivata resveratrola na vijabilnost HaCaT stanica određen metodom *Neutral Red* ... 26

4.1.2. Učinak resveratrola i ferocenskog derivata resveratrola na vijabilnost CHO-K1 stanica određen metodom *Neutral Red* ... 28

4.1.3. Učinak resveratrola i ferocenskog derivata resveratrola na proliferaciju HaCaT stanica određen metodom *Trypan Blue* ... 30

4.1.4. Učinak resveratrola i ferocenskog derivata resveratrola na proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Trypan Blue* ... 32

4.2. IC VRIJEDNOSTI ZA RESVERATROL I FEROCENSKI DERIVAT RESVERATROLA ODREĐENE NA HaCaT I CHO-K1 KULTURI STANICA 34

4.3. UČINAK RESVERATROLA I FEROCENSKOG DERIVATA RESVERATROLA NA INDUKCIJU STANIČNE SMRTI 37

4.3.1. Apoptoza potaknuta resveratrolom u HaCaT kulturi stanica 38

4.3.2. Apoptoza potaknuta resveratrolom u CHO-K1 kulturi stanica 40

4.3.3. Autofagija potaknuta resveratrolom u HaCaT staničnoj liniji 42

4.3.4. Autofagija potaknuta resveratrolom u CHO-K1 staničnoj liniji 44

4.3.5. Autofagija potaknuta ferocenskim derivatom resveratrola u CHO-K1 kulturi stanica . 46

5. ZAKLJUČCI 48

6. LITERATURA 50

1.UVOD

Biološka aktivnost je sposobnost pojedinog molekularnog entiteta da postigne određeni biološki učinak. Biološki aktivni spojevi definirani su kao esencijalni i neesencijalni spojevi (npr. vitamini ili polifenoli) koje nalazimo u prirodi, dio su hranidbenog lanca te imaju utjecaj na ljudsko zdravlje (Biesalski i sur., 2009). Takvi kemijski spojevi često se klasificiraju kao fitokemikalije. Neke od važnih biološki aktivnih tvari koje imaju zdravstvene učinke uključuju polifenole, glukozinolate, fitosterole, tokoferole, karotenoide. Njihova uloga je da posjeduju antioksidacijsko djelovanje, a učinak fenolnih spojeva na ljudski organizam ispoljava se kroz nekoliko mehanizama: uklanjanje slobodnih radikala (antioksidacijski učinak), zaštita i regeneracija drugih antioksidanasa (npr. vitamin E) i kelirajuća aktivnost (vežu se na metalne ione i tako inhibiraju njihovu apsorpciju i iskorištavanje) (Žlabur i sur., 2018). Uz navedeno polifenolima se pripisuju višestruki farmakološki učinci poput protuupalnog, antibiotskog, antiseptičkog, antialergijskog, kardioprotektivnog i antitumorskog djelovanja. Obzirom da je disregulacija procesa smrti uključena u etiopatologiju različitih bolesti (npr. neurodegenerativne bolesti, karcinom), polifenoli koji djeluju i kao regulatori stanične smrti mogli bi se koristiti kao nova sredstva njihova liječenja (Chimento i sur., 2023). Neki od oblika stanične smrti su nekroza i nekroptoza, autofagija, apoptoza, anoikis, entoza, piroptoza, mitotska katastrofa, NEToza, partanatoza i dr (Miletić i sur., 2021).

Autofagija je glavni unutarstanični sustav razgradnje kojim se citoplazmatski materijali (topivi proteini, oštećeni proteini i organele, ribosomi, unutarstanični patogeni i strana tijela) dostavljaju i razgrađuju u lizosomima. Svrha autofagije nije samo eliminacija tvari, već također ima važnu ulogu u preživljavanju i održavanju homeostaze stanica, jer razgradnja unutarstaničnih komponenti osigurava stanicama energiju potrebnu za osnovne stanične funkcije. Disfunkcija ovog procesa tako doprinosi razvoju mnogih ljudskih bolesti (Ichimiya i sur., 2020).

Apoptoza tj. programirana stanična smrt se smatra vitalnom komponentom raznih fizioloških procesa. Disregulacija apoptoze uzrokuje neurodegenerativne bolesti, ishemijska oštećenja, autoimune poremećaje i mnoge vrste raka. Kontrola procesa stanične diobe i smrti vrlo je važna zbog svog ogromnog terapeutskog potencijala. Apoptoza se normalno javlja tijekom razvoja i

starenja i kao homeostatski mehanizam za održavanje razine stanične populacije u tkivima (Elmore, 2007).

Cilj ovog rada je bio istražiti utjecaj resveratrola (RSV) na indukciju stanične smrti (autofagija, apoptoza) u kulturi stanica ovarija (CHO-K1 stanična linija - *Chinese Hamster Ovary*) i keratinocitima (HaCaT stanična linija). Također je praćena proliferacija stanica i vijabilnost pomoću metoda *Neutral Red* i *Trypan Blue*. Recentne studije su pokazale kako pojedini bioorganometalni spojevi koji nose ferocenilnu skupinu pokazuju bolja farmakokinetička svojstva i izraženiju aktivnost u odnosu na ishodne molekule, stoga je u nastavku ovog istraživanja dodatno provedena biološka evaluacija ferocenom modificiranog polifenola – RF-a.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. STANIČNA SMRT

Stanična smrt je ključni proces uključen u niz bioloških mehanizama koji kontroliraju razvoj, homeostazu te imunološku regulaciju višestaničnih organizama, a neravnoteža tih mehanizama povezana je s brojnim bolestima. Stanična smrt može se klasificirati prema morfološkim kriterijima u npr. apoptozu, nekrozu, autofagiju ili smrt povezanu s mitotičkom katastrofom. Osim toga, stanična smrt može se identificirati na temelju biokemijskih mehanizama koji uključuju aktivaciju različitih klasa specifičnih enzima (proteaze, nukleaze i kaspaze) i prema prisutnosti određenih molekula stanične površine ili otpuštanju topivih medijatora (imunogena ili neimunogena stanična smrt) (Giampietri i sur., 2014).

Programirana stanična smrt (PCD – engl. *Programmed Cell Death*) temeljni je biološki proces koji je evolucijski visoko očuvan. Kod razvoja višestaničnih organizama je potrebna za uklanjanje nepotrebnih ili viška stanica tijekom formiranja uzorka tkiva i za održavanje homeostaza tkiva. Također, PCD ima ulogu u uklanjanju abnormalnih ili oštećenih stanica kao i onih koje su zaražene patogenima (Denton i sur., 2012).

Zbog nedostatka jasne definiranosti kada je stanica mrtva, NCCD (NCCD - engl. *The Nomenclature Committee on Cell Death*; Odbor za nomenklaturu stanične smrti) definira da se stanica treba smatrati mrtvom kada je ispunjen jedan od sljedećih molekularnih ili morfoloških kriterija: 1) stanica je izgubila cjelovitost svoje citoplazmatske membrane, definirano ugradnjom vitalnih boja *in vitro*; 2) stanica, uključujući njezinu jezgru, prošla je potpunu

fragmentaciju u diskretna tijela (koja su često nazivaju apoptotička tjelešca); i/ili 3) već je u tijeku postupak uklanjanja (fagocitiranje) mrtvih stanica (ili njihovih fragmenata) od strane susjednih stanica *in vivo* (Kroemer i sur., 2009).

Stanična smrt može se definirati kao nepovratni gubitak integriteta citoplazmatske membrane. Može se razlikovati niz različitih tipova stanične smrti, uključujući programiranu staničnu smrt, koja je posredovana visoko reguliranim unutarstaničnim programom ili nekrozu (rezultat odumiranja stanica izazvanog različitim uzrocima: toksini, hipoksija, ekstremne temperaturne razlike, životinjski otrovi (kukci, zmije, pauci), djelovanje virusa, traumatska stanja). Apoptoza i autofagija su neovisni oblici programirane stanične smrti. S druge strane, nekroza se opisuje kao nekontrolirana, iznenadna i pasivna vrsta stanične smrti. Osim toga, novi oblik nekroze, nazvan nekroptoza, je nedavno opisan kao alternativni oblik programirane stanične smrti. Različiti tipovi stanične smrti imaju pozitivne učinke na organizam koji uključuju održavanje funkcije epitelnog tkiva, uništavanje mikroorganizama, izazivanje imunološkog odgovora, obnavljanje, odnosno recikliranje bioloških makromolekula, unutarstaničnu signalizaciju i očuvanje genomskog integriteta (Niemann i Rohrbach, 2016).

2.1.1. Autofagija

Samo ime dolazi od grčke riječi *autóphagos* (*auto* = sam + *phagein* = jesti). U užem smislu, to je katabolički proces koji rezultira razgradnjom staničnih komponenti unutar lizosoma/vakuole tijekom kojih se recikliraju makromolekule što omogućuje stanici preživljavanje u stresnim uvjetima prilikom nedostatka hranjivih tvari.

Autofagija je opći izraz za degradaciju citoplazmatskih komponenti unutar lizosoma. Pokreće se kao odgovor na stanični stres, npr. nedostatak hranjivih sastojaka ili faktora rasta, nedostatak energije. Autofagija zahtijeva formiranje autofagosoma (dvomembranska vezikula) koji zatim svoj sadržaj predaje lizosomu (kod sisavaca), odnosno vakuoli (kod kvasaca i biljaka) unutar kojih dolazi do razgradnje. U slučaju nedostatka hranjivih tvari, autofagijom se neselektivno kataboliziraju citoplazmatske komponente obavijajući ih i razgrađujući unutar autofagosoma (Murati i sur., 2022). Međutim, nedavna istraživanja jasno su pokazala da autofagija ima veću raznolikost fizioloških uloga od očekivanih, kao što su prilagodba na gladovanje, „čišćenje“ unutarstaničnih proteina i organela, razvoj, zaustavljanje starenja, eliminacija mikroorganizama, stanična smrt, supresija tumora i prezentacija antigena. Postoje tri vrste autofagije: makroautofagija, mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonom (Mizushima, 2005).

Prekomjerna autofagija može biti štetna za stanice. Znanstvenim studijama ipak je utvrđeno da je razina autofagije strogo kontrolirana *in vivo*; izrazita autofagna aktivnost ili totalna proteoliza nije održiva, a smanjuje se tijekom dugotrajnog gladovanja. Autofagija se sastoji od nekoliko uzastopnih koraka: sekvestracija, razgradnja i recikliranje staničnih komponenti. Svaki korak ima različite funkcije u nizu staničnih fizioloških procesa (Mizushima, 2007).

Shen i Codogno (2011) predložili su da se za definiranje stanične smrti autofagijom trebaju ispuniti sljedeća tri kriterija: 1) stanična smrt se događa neovisno o apoptozi; 2) dolazi do povećanja autofagijskog fluksa, a ne samo povećanja markera autofagije; i 3) zaustavljanje procesa autofagije specifičnim inhibitorima može spriječiti staničnu smrt (Denton i sur., 2012).

Modulacija procesa autofagije identificirana je kao potencijalna terapija u liječenju određenih bolesti poput karcinoma. Mnogi aktivatori autofagije su u pretkliničkim studijama ili kliničkim ispitivanjima, a nekoliko ih je već, u kombinaciji s drugim konvencionalnim terapijama, odobreno za kliničku upotrebu (Murati i sur., 2022).

2.1.2. Apoptoza

Apoptoza je oblik programirane stanične smrti koja je posredovana skupinom specijaliziranih enzima za cijepanje proteina nazvanih kaspaze. 1970.-ih godina Kerr, Wyllie i Currie prvi su identificirali jedinstvenu morfologiju ovog oblika stanične smrti (Kerr i sur., 1972). Kasnija istraživanja Horvitza i suradnika na nematodama *Caenorhabditis elegans* pokazali su da je apoptoza programirana stanična smrt kontrolirana genima (Hengartner i Horvitz, 1994; Ellis i Horvitz, 1986).

Apoptoza je važan mehanizam svojstven većini stanica. Aktivira se kada stanica ostane bez bitnih čimbenika za preživljavanje. S druge strane, apoptoza može biti inducirana, bilo izazivanjem težih staničnih oštećenja ili kao odgovor na izvanstanične signale koji se prenose specifičnim signalnim putevima (Miletić i sur., 2021). Apoptozu karakterizira piknoza, ispupčenje dijelova stanične membrane (protruzija), formiranje apoptotskih tjelešaca, fragmentacija DNA te kondenzacija kromatina (Tang i sur., 2019). Temeljni apoptotski enzimski sustav sastoji se od kaspaza koje se klasificiraju u dvije glavne kategorije: inicijatorske kaspaze i egzekutorske tj. efektorske kaspaze. Kaspaze su u citoplazmi stanice prisutne u obliku zimogena odnosno inaktivnih preteča koje se nazivaju prokaspaze. Apoptotski podražaji induciraju aktivaciju jedne ili više inicijatorskih kaspaza preko specifičnih oligomerizacijskih platformi. Inicijatori zatim pokreću kaskadnu proteolitičku stimulaciju

zimogena efektorskih kaspaza. Aktivirani enzimi pokreću izvršenje programa apoptotičke smrti cijepanjem velikog broja kritičnih proteina unutar stanice (Ashkenazi i Salvesen, 2014).

Apoptoza se normalno odvija tijekom razvoja i starenja kao homeostatski mehanizam za održavanje razine stanične populacije u tkivima. Javlja se i kao obrambeni mehanizam kod imunoloških reakcija (Norbury i Hickson, 2001). Iako postoji veliki broj podražaja i stanja, kako fizioloških tako i patoloških, koji mogu potaknuti apoptozu, neće sve stanice nužno umrijeti kao odgovor na isti podražaj. Zračenje ili lijekovi koji se koriste za kemoterapiju raka rezultiraju oštećenjem DNA u nekim stanicama, što može dovesti do apoptotičke smrti kroz put ovisan o p53. Neki hormoni, npr. kortikosteroidi, mogu dovesti do apoptotičke smrti u nekim stanicama iako druge stanice nisu zahvaćene ili stimulirane (Elmore, 2007).

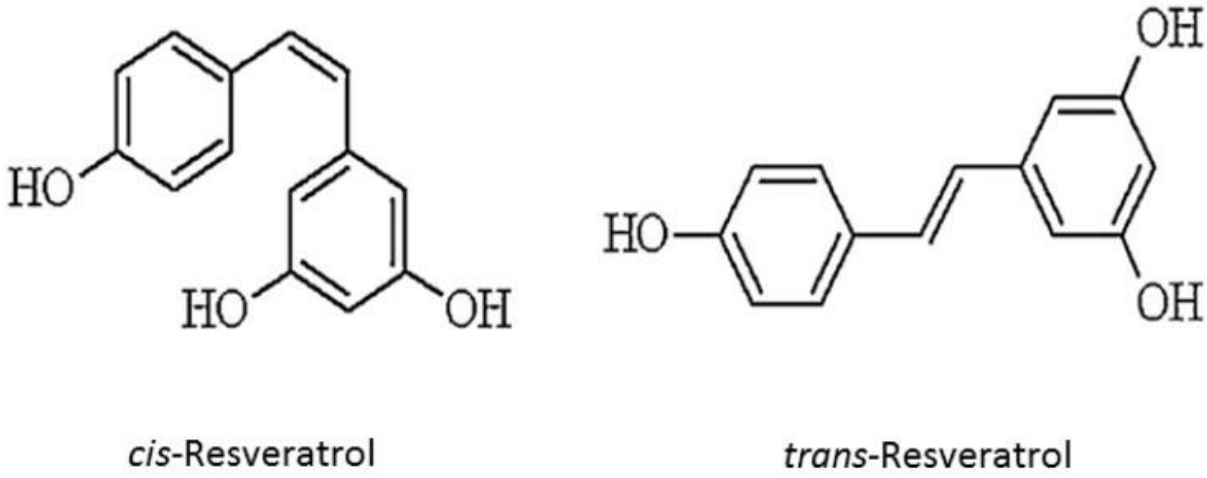
Postoje dva glavna puta aktivacije apoptoze - intrinzični i ekstrinzični put. Intrinzični ili mitohondrijski put reguliran je proteinima obitelji Bcl-2. Aktivaciju ovog puta potiču čimbenici koji nastaju unutar stanice kao rezultat staničnoga stresa (npr. virusna infekcija, slobodni radikali, iscrpljivanje faktora rasta, ionizirajuće zračenje). Ekstrinzični put ili put posredovan receptorima smrti, prima i obrađuje izvanstanične signale koji induciraju smrt i koji djeluju preko tih receptora na površini stanica. Ekstrinzični put apoptoze aktiviraju molekule koje pripadaju skupini čimbenika nekroze tumora (TNF - engl. *tumor necrosis factor*), u obliku su homotrimera te se mogu vezati za TNFR (engl. *tumor necrosis factor receptor*) na membrani stanice (Miletić i sur., 2021; Ashkenazi i Salvesen, 2014).

Važno je razlikovati apoptozu od nekroze, dva procesa koji se mogu odvijati neovisno, uzastopno, ali i istovremeno. U malim dozama, različiti štetni podražaji kao što su toplina, zračenje, hipoksija i citotoksični lijekovi protiv raka mogu potaknuti apoptozu, ali ti isti podražaji mogu rezultirati nekrozom pri većim dozama (Elmore, 2007).

2.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST RESVERATROLA

RSV (3,5,4'-trihidroksi-*trans*-stilben) pripada skupini neflavonoidnih polifenola - stilbena, koja posjeduje dva fenolna prstena međusobno povezana etilenskim mostom. Kemijska struktura RSV-a identificirana je u dva izomerna oblika, *cis*- i *trans*-RSV (Slika 1). *Trans*-RSV je bijeli prah čija molarna masa iznosi 228,25 g mol^{-1}, a temperatura tališta mu je između 253–255 °C, komercijalno je dostupan, a *cis* oblik se može dobiti UV zračenjem (Aggarwal i sur., 2004). Glavni prehrambeni izvori RSV-a su brusnice, kakao, grožđe, šljive, kikiriki, pistacije te bijela i crvena vina. Glavne biološke aktivnosti RSV su inhibicija peroksidacije lipida, kelacija bakra,

uklanjanje slobodnih radikala, promjena sinteze eikosanoida, inhibicija agregacije trombocita, protuupalno djelovanje, vazorelaksirajuća aktivnost, modulacija metabolizma lipida, antikancerogeno djelovanje i estrogena aktivnost (Bhat i sur., 2001).



Slika 1. Kemijska struktura resveratrola (RSV) (*cis*- i *trans*- oblik) (Salehi i sur., 2018)

RSV se sve više istražuje zbog svoje aktivnosti u liječenju mnogih bolesti, uključujući bolesti srca i rak, te zbog svoje niske *in vivo* toksičnosti. Korisna svojstva prisutnih fenolnih spojeva u grožđu i vinu proučavana su nakon otkrića "francuskog paradoksa". Vjeruje se da je u određenim dijelovima Francuske stopa smrtnosti uzrokovana bolestima koronarnih arterija niža unatoč relativno visokom unosu masti u ljudskoj prehrani. Ova činjenica je povezana s konzumacijom crnog vina koje sadrži RSV (1,5-3,0 mg L^{-1} crnog vina). Dakle, pokazalo se da konzumacija crnog vina smanjuje rizik od kroničnih bolesti kao što su ateroskleroza, upale i kardiovaskularne bolesti. Uz to, zanimljivi su učinci ovog spoja na životni vijek kvasaca i muha, implicirajući njegov potencijal u usporavanju starenja te u liječenju ljudskih bolesti povezanih sa starenjem (Gambini i sur., 2015).

Zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava, RSV može pasivnom difuzijom prolaziti stanične membrane i vezati se na unutrastanične receptore ili ulaziti u interakciju s membranskim receptorima. Iz tog razloga, mehanizam djelovanja na staničnoj razini može se pokrenuti aktiviranjem različitih signalnih putova (Gambini i sur., 2015).

2.2.1. Protuupalni učinci resveratrola

Upala je ključna za patologiju raznih bolesti uključujući artritis, Crohnovu bolest i psorijazu, a može imati i ulogu u razvoju kardiovaskularnih bolesti i raka. Ciklooksigenaza (COX) je enzim važan u stvaranju upalnog odgovora, a sudjeluje u pretvorbi arahidonske kiseline u prostaglandine, kemijske spojeve koji imaju središnju ulogu u upalnom procesu. Postoje dva oblika ciklooksigenaze: konstitutivna COX-1 i inducibilna COX-2. Rezultati brojnih znanstvenih studija upućuju na povezanost protuupalnih svojstava RSV-a s regulacijom signalnih puteva u stanicama, a najznačajnijim učinkom smatra se inhibicija puta arahidonske kiseline, konkretnije djelovanje na aktivnost COX-2 (Subbaramaiah i sur., 1998). RSV značajno smanjuje i akutne i kronične kemijski inducirane edeme, upale dišnih puteva uzrokovane lipopolisaharidima i osteoartritis, a pomaže i u sprječavanju odbacivanja transplantata. Intravenozno dani RSV smanjuje upalu izazvanu ishemijom/reperfuzijom, oksidansima generiranim hipoksantin/ksantin oksidazom (HX/XO) ili faktorom aktivacije trombocita. RSV bi mogao predstavljati alternativu trenutnim tretmanima za kronične upale jer dugotrajna uporaba aspirina može oštetiti sluznice želuca, a selektivni COX-2 inhibitori razvijeni za izbjegavanje ovog problema povezani su s kardiovaskularnim komplikacijama (Baur i Sinclair, 2006).

Inhibicija aktivnosti prostaglandina može biti djelomično odgovorna za kemopreventivni i kardioprotektivni učinak RSV-a. RSV ovisno o dozi inhibira lipopolisaharidom induciranu proizvodnju prostaglandina E2 (PGE2) u humanim leukocitima periferne krvi (Richard i sur., 2005), dok *in vivo* RSV značajno smanjuje povišene razine prostaglandina D2 (PGD2) u štakora (Candelario-Jalil i sur., 2007). U modelima *in vitro* i *in vivo*, RSV je smanjio ekspresiju COX-2. RSV također smanjuje ekspresiju upalnih citokina, kao što su čimbenik nekroze tumora α (TNF-α) i interleukin-1β (IL-1β). Nuklearni faktor-κB (NF-κB), faktor transkripcije, regulira gene uključene u upalu i tumorigenezu. Mogući mehanizam kojim RSV ispoljava svoje protuupalno djelovanje je inhibicija aktivnosti NF-κB. Inhibicija TNF-inducirane NF-κB aktivacije RSV-om uočena je u nekoliko staničnih linija. Manna i suradnici (2000) utvrdili su da RSV inhibira TNF induciranu NF-κB aktivaciju. RSV također sprječava TNF induciranu fosforilaciju i nuklearnu translokaciju podjedinice p65 NF-κB. Sprječava aktivnost NF-κB blokiranjem vezanja NF-κB na DNA i inhibiranjem aktivnosti IκB kinaze (IKK) (Holmes-McNary i Baldwin, 2000).

2.2.2. Antioksidacijsko djelovanje resveratrola

Oksidacijski stres je stanje uzrokovano neravnotežom između proizvodnje i eliminacije reaktivnih kisikovih vrsta (ROS – engl. *Reactive Oxygen Species*) u stanicama i tkivima (Pizzino i sur., 2017). Oksidacijska oštećenja uključena su u patogenezu mnogih važnih bolesti, poput dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, neurodegenerativnih bolesti i raka, a također povezuju se i s procesom starenja.

ROS imaju ulogu u inicijaciji i napredovanju raka putem izravnog oštećenja DNA i ostalih makromolekula. RSV ima intrinzični antioksidacijski kapacitet koji bi mogao biti povezan s njegovim kemopreventivnim učincima. *In vivo* je dokazano da RSV povećava antioksidacijski kapacitet plazme i smanjuje peroksidaciju lipida (Baur i Sinclair, 2006).

Antioksidacijsko djelovanje fenolnih spojeva povezuje se upravo s njihovom aromatskom strukturom koja omogućava delokalizaciju elektrona i postojanje više rezonantnih oblika, dok hidroksilne skupine imaju sposobnost doniranja vodikovih atoma ili elektrona što dovodi do inaktivacije slobodnih radikala te zaustavljanja lančanih oksidacijskih reakcija (Mikolaj, 2019). RSV sadrži dvije aromatske skupine međusobno povezane etilenskim mostom. Kao antioksidans, RSV može odgoditi i/ili spriječiti oštećenje stanica i bolesti izazvane oksidacijskim stresom. Pretjerano oštećenje stanica izazvano oksidacijskim stresom može potaknuti staničnu smrt - apoptozu. Dokazano je da RSV inhibira ROS-om induciranu apoptozu u nizu staničnih linija. Oksidacija lipoproteina niske gustoće (LDL) važan je događaj u razvoju ove bolesti. *In vivo*, RSV u koncentraciji 10 μmol L^{-1} je inhibirao LDL oksidaciju kataliziranu bakrom u dva zdrava čovjeka za 81 % odnosno 70 % (Frankel i sur., 1993). Antioksidacijsko djelovanje RSV-a također može biti povezano uz zaštitu od napredovanja ateroskleroze. Na mjestu rane ateroskleroze, mogu se naći i trombociti. Kada se aktiviraju, trombociti mogu stvarati ROS. Utvrđeno je da RSV inhibira proizvodnju ROS-a u trombocitima iako ne u mjeri u kojoj to postiže vitamin C (Olas i Wachowicz, 2002).

Antioksidacijsko djelovanje RSV-a utvrđeno je u izoliranim mitohondrijima mozga štakora, koji pokazuju inhibiciju respiracije mitohondrija kada su inkubirani s RSV-om. Nadalje, RSV inhibira aktivnost kompleksa III natječući se s koenzimom Q, što je zanimljivo jer određuje antioksidacijsku aktivnost RSV-a u mitohondrijima, ne samo njegovu aktivnost u kapacitetu preuzimanja nesparenih elektrona, već i inhibicijom kompleksa koji stvara slobodne radikale (Zini i sur., 1999).

Većina objavljenih *in vitro* studija navodi korištenje previsokih koncentracija RSV-a koje bi se mogle postići u organizmu konzumacijom crnog vina. Vrlo je važno da niske koncentracije slobodnog RSV-a u plazmi budu dovoljne da budu aktivni kao antioksidansi. U vezi s tim, pokazalo se da nutritivno relevantne koncentracije RSV-a mogu smanjiti razine vodikovog peroksida u MCF-7 stanicama inducirajući ekspresiju antioksidativnih gena, kao što su geni za katalazu i mangan superoksid dismutazu, kroz mehanizam koji uključuje fosfatazu i homolog tenzina i signalni put protein kinaze-B (Inglés i sur., 2014).

2.2.3. Učinci resveratrola na procese starenja

Starenje je biološki proces definiran kao progresivan pad u fiziološkim i staničnim funkcijama s vremenom, što dovodi do raznih metaboličkih poremećaja uključujući dijabetes tipa 2, rak te neurodegenerativne bolesti kao što su Parkinsonova bolest i Alzheimerova bolest. Obilježja starenja su genomska nestabilnost, skraćivanje telomera, epigenetske promjene, gubitak proteostaze, mitohondrijska disfunkcija, stanično starenje, iscrpljenost matičnih stanica i promijenjena međustanična komunikacija. To su opći čimbenici i fenotipovi starenja s obzirom na to da se javljaju tijekom normalnog procesa starenja. Progresija u ovim čimbenicima ubrzava starenje, dok slabljenje odgađa (Kirkwood, 2005).

Recente studije usmjerene su na istraživanje potencijala i biološke aktivnosti prirodnih spojeva i fitokemikalija u usporavanju procesa starenja. Prekomjerni oksidacijski stres uzrokuje oštećenje makromolekula - DNA, proteina i lipida kao i organela poput mitohondrija, čime se ubrzava proces starenja. U takvim slučajevima ključno je poboljšati sposobnost stanica da održavaju ravnotežu ROS–a. Prirodni spojevi s fenolnom komponentom po prirodi su antioksidansi. Njihovo antioksidacijsko djelovanje pripisuje se prisutnosti slobodnih hidroksilnih skupina koje mogu donirati atome vodika za zaštitu stanica od reaktivnih slobodnih radikala. Brojne fitokemikalije, uključujući RSV, povećavaju antioksidacijsku aktivnost u stanicama povećanjem razina superoksid dismutaze i katalaze. Među fitokemikalijama koje se ispituju kao aktivne tvari u usporavanju procesa starenja, RSV je među najopsežnije proučavanim (Pyo i sur., 2020).

RSV se pokazao kao najjači induktor aktivnosti deacetilaze među različitim polifenolima. Istraživanja su potvrdila da RSV može produljiti životni vijek *Saccharomyces cerevisiae, Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster* i miševa samo ako je prisutan gen koji kodira Sir2 homolog. Također, dokazano je da je primjena RSV-a uzrokovala značajno smanjenje sadržaja proteina u mozgu na modelu starenja riba, produžujući dugovječnost do 59

%; međutim, nije bilo jasno je li učinak ovisan o Sir2 (Pyo i sur., 2020). Kod ljudi, zbog ograničenja u doziranju i etičkih pitanja, učinak RSV-a na produljenje životnog vijeka nije dokazan (Moran i sur., 1997).

U kombinaciji sa SIRT-ovima (geni koji kodiraju za sirutin) i neovisno o njima, RSV aktivira AMPK (AMP aktivirane kinaze), tj. ključni regulator energetskog metabolizma i procesa starenja. Aktivacija se odvija bez izravne interakcije s AMPK proteinom. Studije na životinjama pokazale su da je RSV učinkovit tretman za pretilost i dijabetes tipa 2, poboljšavajući metabolizam glukoze i profile lipida, gubitak težine i metaboličku učinkovitost.

RSV se izravno veže i aktivira SIRT, a oni su stanični NAD^+ senzori. Jedna od najvažnijih funkcija RSV-a je o dozi ovisna i recipročna regulacija SIRT1 i AMPK. Pri niskim koncentracijama RSV-a, SIRT1 deacetilira i aktivira jetrenu kinazu B1, koja je uzvodna kinaza AMPK, čime se povećava aktivnost AMPK. S druge strane, kod visokih razina, RSV povećava omjer staničnog AMP-a- i ATP-a, vjerojatno inhibicijom mitohondrijske proizvodnje ATP-a, i tako aktivira AMPK. AMPK potiče energetski katabolizam i povećava stanične razine NAD^+, što dodatno povećava aktivnost SIRT1. AMPK je negativni regulator mTOR-a (engl. *mammalian target of rapamycin complex 1*), čime inducira autofagiju i mitohondrijsku biogenezu, dok SIRT1 inhibira NF-κB, što dovodi do protuupalnog i antikancerogenog djelovanja. Regulacijska aktivnost RSV-a na SIRT1 i AMPK ima učinke protiv starenja. RSV može aktivirati AMPK putem cAMP-a i mehanizama ovisnih o kalciju, što ima pozitivan učinak na starenje i stanično starenje. RSV inhibira fosfodiesterazu, uzrokujući porast unutarstaničnih razina cAMP i Ca^{2+}, posljedično aktivirajući AMPK put. AMPK put ne samo da pojačava autofagiju, već također povećava razine NAD^+, čime se također povećava aktivnost SIRT1. Osim toga, cAMP pojačava ekspresiju Nrf2 i inducira ekspresiju gena antioksidansa. Dakle, RSV je snažan aktivator SIRT1 i pozitivan regulator AMPK, povećavajući životni vijek u modelnim organizmima; međutim, učinak RSV-a na ljudski životni vijek nije proučavan (Reinisalo i sur., 2015).

2.2.4. Resveratrol i stanična smrt

2.2.4.1. Apoptoza i resveratrol

Jedan od mehanizama kojim bi RSV mogao inhibirati stvaranje tumora je zaustavljanje staničnog ciklusa i indukcija apoptoze. Antiproliferativni i proapoptotski učinci RSV-a u tumorskim staničnim linijama su opsežno dokumentirani u brojnim istraživanjima provedenima *in vitro* te dodatno potvrđeni na tumorskim modelima *in vivo* pomoću kojih je dokazana smanjena ekspresija proteina koji imaju ulogu u regulaciji staničnog ciklusa i potvrđeno povećanje udjela stanica u apoptozi (Baur i Sinclair, 2006).

Visoka razina ekspresije p53 u apoptotičnim stanicama, sugerira da je taj oblik stanične smrti povezan s pojačanom regulacijom *TP53*. RSV inducira apoptozu, transaktivaciju p53 aktivnosti i ekspresiju proteina p53 u nekim staničnim linijama tretiranim s tumorskim promotorima. Apoptoza potaknuta RSV-om događa se samo u stanicama koje eksprimiraju divlji tip p53, ali ne u stanicama s nedostatkom p53, što sugerira da je antitumorsko djelovanje RSV-a povezano s indukcijom apoptoze. Apoptoza je rezultat aktivacije unaprijed programiranog puta biokemijskih događaja koji vode do stanične smrti. Veliki broj dokaza pokazuje da apoptoza može predstavljati zaštitni mehanizam protiv stvaranja neoplazmi eliminacijom genetski oštećenih stanica (Cal i sur., 2003).

2.2.4.2. Autofagija i resveratrol

Tijekom gladovanja, stresa ili stanja visoke metaboličke potražnje, stanice aktiviraju mehanizme čiji je cilj detektirati nedostatak energije i osigurati makromolekule za preživljavanje. RSV regulira nekoliko staničnih procesa koji sprječavaju oštećenja stanica i povećavaju staničnu vijabilnost. Regulacija autofagije odgovorna je za neke od korisnih učinaka RSV-a u različitim patologijama (Pineda-Ramírez i Aguilera, 2021).

RSV može aktivirati više staničnih signalnih puteva ovisno o najmanje četiri čimbenika: vrsti stanica, upotrebljenoj dozi, vremenu izloženosti i specifičnoj patologiji. Aktivacija autofagije RSV-om dokazana je u *in vivo* i *in vitro* modelima različitih patoloških stanja i bolesti: različitim vrstama raka, steatozi jetre, nakupljanju lipida u jetri izazvanim prehranom, srčanoj hipoksiji/reoksigenaciji, srčanoj ishemiji/reperfuziji, moždanom udaru, ozljedi leđne moždine, ozljedi perifernih živaca, prignječenju ishijadičnog živca i neurodegenerativnim bolestima. U

tim modelima, RSV modulira metaboličku i mitohondrijsku funkciju, potiče neuralnu regeneraciju i obnavlja neuralnu funkciju kroz specifične signalne putove, iako mehanizmi djelovanja još nisu razjašnjeni. RSV-om inducirani signalni put nije konačno definiran i postoji značajna razlika u rezultatima dobivenim među različitim laboratorijima koji proučavaju njegove učinke (Pineda-Ramírez i sur., 2018).

Nekoliko istraživanja potvrdilo je da je zaštitna uloga RSV-a povezana s regulacijom metaboličkih senzora/efektora uključujući mTOR (ciljna molekula rapamicina u sisavaca), AMPK (engl. *5′ adenosine monophosphate-activated protein kinase*), SIRT1 (Sirtuin 1), PARP-1 (poli(ADP-riboza) polimeraza 1), put PI3K (fosfatidilinozitol-3-kinaza) /AKT (proteinska kinaza B), kao i signalni put MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinases*). Sve ove komponente ključne su u procesu koji omogućuje autofagiju. Ipak, kao i u mnogim drugim procesima u kojima sudjeluje RSV, točan mehanizam djelovanja nije još u potpunosti objašnjen (Pineda-Ramírez i Aguilera, 2021).

2.3. METODE POBOLJŠANJA APSORPCIJE I BIOLOŠKE AKTIVNOSTI RESVERATROLA

RSV ima blagotvorne učinke na zdravlje, no posjeduje farmakokinetička svojstva koja ograničavaju njegovu upotrebu. Kod sisavaca, RSV se intenzivno metabolizira i brzo eliminira te stoga pokazuje slabu bioraspoloživost. Nakon oralne primjene, RSV se apsorbira na intestinalnoj razini pasivnom difuzijom ili membranskim prijenosnicima, a zatim otpušta u krvotok gdje se nalazi kao nemodificirana ili metabolizirana molekula. U crijevima ovaj spoj prolazi presistemski metabolizam kroz glukuronidaciju i sulfatnu konjugaciju fenolnih skupina i hidrogenaciju alifatske dvostruke veze. U krvotoku, RSV se može vezati za albumin i lipoproteine, kao što je LDL, stvarajući tako komplekse koji se mogu disocirati na staničnoj membrani gdje albumin i LDL stupaju u interakciju s odgovarajućim receptorima koji omogućuju ulaz RSV-u u stanice. Faza II metabolizma RSV-a i njegovih metabolita odvija se u jetri. U urinu je otkriveno pet različitih metabolita: RSV monosulfat, dva izomerna oblika RSV monoglukuronida, monosulfat dihidro-RSV i monoglukuronid dihidro-RSV. Zabilježeno je da su većina metabolita RSV-a u plazmi RSV-3-*O*-sulfat, RSV-4'-*O*-glukuronid i RSV-3-*O*-glukuronid, svi s vrlo malom bioaktivnošću. Iznimno brza konjugacija RSV-a sa sulfatom u crijevima/jetri mogao bi biti razlog koji ograničava bioraspoloživost RSV-a. Iako se RSV brzo metabolizira, oralna primjena je poželjan i jedini održivi put, osim lokalne primjene. Na temelju

rezultata kliničkih studija, čini se da je glavna prepreka koju treba prevladati da bi se RSV smatrao terapijskim sredstvom njegova niska bioraspoloživost (Wenzel i Somoza, 2005).

Budući da RSV ima ograničenu brzinu otapanja u vodenom okruženju, malo povećanje topljivosti može značajno povećati njegovu bioraspoloživost. U posljednjem desetljeću, kako bi se poboljšala slaba bioraspoloživost RSV-a, razvijeni su različiti metodološki pristupi. To uključuje nekoliko sustava kao što je inkapsulacija RSV-a u lipidne nanonosače ili liposome, emulzije, micele, umetanje u polimerne nanočestice, čvrste disperzije i nanokristale. Enkapsulacija nudi potencijalni pristup za povećanje topljivosti RSV-a i poboljšanje njegove bioraspoloživosti. Ovaj se pristup potencijalno može koristiti za zaštitu RSV-a od razgradnje i za kontrolu njegovog oslobađanja kada se daje oralno. Čvrsti disperzijski sustavi za isporuku lijeka atraktivni su kao alternativne metode solubilizacije jer se manipuliranjem nosačima i svojstvima praha aktivnih komponenti može poboljšati topljivost, otapanje, pa čak i *in vivo* apsorpcija aktivnih komponenti. Nadalje, nanonizacija čestica lijeka koja proizvodi nanokristale predstavlja vrlo obećavajuću strategiju koja poboljšava topljivost, brzinu otapanja netopljivih lijekova, fizičku i kemijsku stabilnost, kompatibilnost u oralnim oblicima doziranja i oralnu bioraspoloživost (Chimento i sur., 2019).

Klinička ispitivanja naglasila su moguće nedostatke niske bioraspoloživosti RSV-a. Provedena su mnoga istraživanja kako bi se sintetizirali novi i snažniji analozi RSV-a koji pokazuju bolja farmakokinetička svojstva zajedno s boljom biološkom aktivnošću od samog RSV-a. Proizvedeni su razni derivati RSV-a koji se strukturno razlikuju po vrsti, broju i položajima supstituenata. Prisutnost tri slobodne hidroksilne skupine u okosnici RSV-a čini ga osjetljivim na reakcije konjugacije faze II *in vivo*, što uzrokuje njegovu slabu bioraspoloživost. Metoksilirani, hidroksilirani i halogenirani RSV-ni derivati su zanimljivi zbog svojih korisnih bioloških učinaka i potencijalno povećane oralne bioraspoloživosti. Neki od njih imaju jači farmakološki učinak i bolji farmakokinetički profil od samog RSV-a. Metoksilacija je povećala metaboličku stabilnost, a također i vrijeme potrebno za postizanje maksimuma koncentracije u plazmi. Međutim, oralna bioraspoloživost metoksiliranih spojeva ovisi o položaju metoksilne skupine. Općenito, polihidroksilirani derivati koji sadrže manje od tri hidroksilne skupine na stilbenskom dijelu pokazuju vrlo slabu oralnu bioraspoloživost. S druge strane, *trans*-3,5,2′,4′-tetrahidroksistilben pokazao je bržu stopu apsorpcije od RSV-a zbog bolje topljivosti zbog prisutnosti jedne dodatne hidroksilne skupine. Prisutnost halogenih skupina u stilbenskom dijelu povećava lipofilnost spojeva i poboljšava oralnu bioraspoloživost i terapijsku primjenu ovih spojeva (Chimento i sur., 2019).

2.4. *IN VITRO* TOKSIKOLOGIJA

In vitro testovi citotoksičnosti razvijeni su kao alternativa klasičnim *in vivo* testovima koji se provode na laboratorijskim životinjama, a uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama, dijelovima tkiva, kulturama organa, itd. (Kniewald i sur., 2005). U *in vitro* toksikologiji najčešće se koriste: 1) kontinuirane stanične linije, 2) primarne stanične linije (izolirane izravno iz organizma) i 3) inducirane pluripotentne stanice (dediferencirane matične stanice iz kultura) (Labtoo, 2023).

In vitro testovi toksičnosti primjenjuju se za određivanje potencijalno aktivnih tvari, za određivanje mehanizama kroz koje supstanca može ostvariti toksični učinak, kao predtest za utvrđivanje raspona aktivnosti tvari, za određivanje raspona toksične koncentracije, za predviđanje učinkovitog citotoksičnog lijeka za tretiranje pacijenata oboljelih od raka te za određivanje odnosa koncentracije prema vremenu izlaganja. Upotrebljavaju se u ispitivanjima citotoksičnosti, mutagenosti, kancerogenosti i toksičnosti na ciljne organe: reproduktivne toksičnosti, imunotoksičnosti, endokrine toksičnosti, neurotoksičnosti, nefrotoksičnosti itd. Oni se koriste kao zamjenski sustavi za pokusne životinje, za brže dobivanje rezultata pokusa, kao predtestovi klasičnim testovima, jeftiniji su od *in vivo* testova, nastaje manja količina toksičnog otpada i visok je stupanj standardizacije i reproducibilnosti (Kmetič, 2023).

Uz brojne prednosti, također postoje i neke mane ovih testova. *In vitro* sustavi ne predstavljaju uvijek reprezentativno organ ili tkivo iz kojeg su izolirane, koncentracije ksenobiotika koje se ispituju nisu iste kao one kojima je organizam izložen *in vivo*, nedostaju specifične barijere (npr. krvno-moždana barijera). Također, profili metabolita se razlikuju te postoje poteškoće u uzgoju/održavanju određenih ciljnih organa/tkiva/stanica *in vitro* (Atterwill, 1995).

Četiri su glavna čimbenika koji pokreću razvoj *in vitro* toksikologije: potreba za relativno jednostavnim, jeftinim i učinkovitim sustavom za testiranje velikog broja kemikalija za koje su toksikološki podaci potrebni; javni i zakonodavni pritisci da se smanji testiranje na životinjama; potreba za boljim razumijevanjem mehanizama kemijski izazvane toksičnosti i kako bi se poboljšala znanstvena osnova trenutne procedure procjene rizika; i želja za korištenjem ljudskih stanica i tkiva kad god je to moguće (Kniewald i sur., 2005).

Kao metode određivanja citotoksičnosti često se koriste *Kenacid Blue* metoda, MTT, *Trypan Blue* i *Neutral Red*.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biološki materijal

U radu su korištene dvije stanične linije. Stanična linija ovarija kineskog hrčka (engl. *Chinese Hamster Ovary*, CHO-K1) i monoslojna stanična linija humanih keratinocita, HaCaT.

3.1.2. Kemikalije

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

medij za uzgoj stanica *Dulbecco Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F-12) (minimalni esencijalni medij s 15 mM HEPES-om, $NaHCO_3$ i piridoksinom), Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
medij za uzgoj stanica *Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose* (DMEM-HG), basic, CLS, Eppelheim, Njemačka
Fetal Bovine Serum (FBS – fetalni goveđi serum), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
resveratrol (RSV), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
Muse® Autophagy LC3-antibody based kit, kat. broj MCH 200109, Luminex, SAD
Ferocenski triacilni derivat resveratrola (RF), sinteza provedena u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno –biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Slika 2)
0.25 % tripsin – EDTA, GIBCO, SAD
boja tripan plavo (*Trypan Blue*), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
apsolutni etanol, Kemika, Zagreb
Guava ICF (*Instrument cleaning fluid*), Millipore, Merck, Darmstadt, Njemačka
DMSO (dimetilsulfoksid), Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Francuska
destilirana voda (dH_2O)
PBS (engl. *Phosphate Buffer Saline*) pufer
ledena octena kiselina, Kemika, Zagreb
Neutralrot, E. Merck Ag – Darmstadt, Njemačka
kalijev klorid (KCl), Kemika, Zagreb, RH
kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), Kemika, Zagreb, RH
dinatrijev hidrogenfosfat, bezvodni (Na_2HPO_4), Kemika, Zagreb, RH
natrijev klorid (NaCl), Kemika, Zagreb, RH

3.1.3. Otopine i puferi

Dulbecco's MEM/F-12	
SASTOJCI	**KONCENTRACIJA (mg L^{-1})**
aminokiseline	
glicin	18,75
L-alanin	4,45
L-arginin hidroklorid	147,50
L-asparagin x H_2O	7,50
L-asparaginska kiselina	6,65
L-cistein hidroklorid x H_2O	17,56
L-cistein x 2 HCl	31,29
L-glutaminska kiselina	7,35
L-glutamin	365,00
L-histidin hidroklorid x H_2O	31,48
L-izoleucin	54,47
L-leucin	59,05
L-lizin hidroklorid	91,25
L-metionin	17,24
L-fenilalanin	35,48
L-prolin	17,25
L-serin	26,25
L-treonin	53,45
L-triptofan	9,02
L-tirozin x 2 Na x 2 H_2O	55,79
L-valin	25,85
vitamini	
biotin	0,0035
kolin klorid	8,98
D-Ca pantotenska kiselina	2,24
folna kiselina	2,65
nikotinamid	2,02
piridoksin hidroklorid	2,00

riboflavin	0,219
tiamin hidroklorid	2,17
vitamin B_{12}	0,68
i-inozitol	12,60
anorganske soli	
$CaCl_2$	116,60
$CuSO_4$ x 5 H_2O	0,0013
$Fe(NO_3)_3$ x 9 H_2O	0,05
$FeSO_4$ x 7 H_2O	0,417
$MgCl_2$ x 6 H_2O	61,00
$MgSO_4$ x 7 H_2O	100,00
KCl	311,80
$NaHCO_3$	1200,00
NaCl	6995,50
Na_2HPO_4 x 7 H_2O	134,00
NaH_2PO_4 x H_2O	62,50
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	0,432
ostali sastojci	
D-glukoza	3151,00
HEPES	3075,40
hipoksantin x Na	2,39
linolna kiselina	0,042
lipoična kiselina	0,105
fenol crveno	8,10
putrescin x 2 HCl	0,081
Na piruvat	55,00
timidin	0,365

DMEM-HG	
SASTOJCI	**KONCENTRACIJA (mg L^{-1})**
aminokiseline	
L-Arginin hidroklorid	84

L-Cistin dihidroklorid	62,6
L-Glutamin	584
L-Glicin	30
L-Histidin hidroklorid x H_2O	42
L-Izoleucin	105
L-Leucin	105
L-Lizin hidroklorid	146
L-Metionin	30
L-Fenilalanin	66
L-Serin	42
L-Tirozin dinatrij x $2H_2O$	103,79
L-Treonin	95
L-Triptofan	16
L-Valin	94
vitamini	
D- ½Ca pantotenska kiselina	4
Folna kiselina	4
Kolin klorid	4
Myo-inozitol	7,2
Niacinamid	4
Piridoksin hidroklorid	4,04
Riboflavin	0,4
Tiamin hidroklorid	4
anorganske soli	
$CaCl_2$	200
$Fe(NO_3)_3$ x $9H_2O$	0,1
$MgSO_4$	97,67
KCl	400
$NaHCO_3$	3700
NaCl	6400
Na_2HPO_4	109
ostali sastojci	

D-Glukoza	4500
Na fenol crvenilo	15,9
Na piruvat	110

PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pufer pH=7,4

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na_2HPO_4	1,44 g
KH_2PO_4	0,24 g
dH_2O	do 1000 mL

0,4 %-tna otopina *Trypan Blue*

Trypan Blue	0,08 g
PBS pufer	20 mL

- profiltrirati

4 %-tna *stock* otopina *Neutral Red*

Neutral Red	4 g
dH_2O	100 mL

- Sterilno profiltrirati

Radna otopina *Neutral Red*

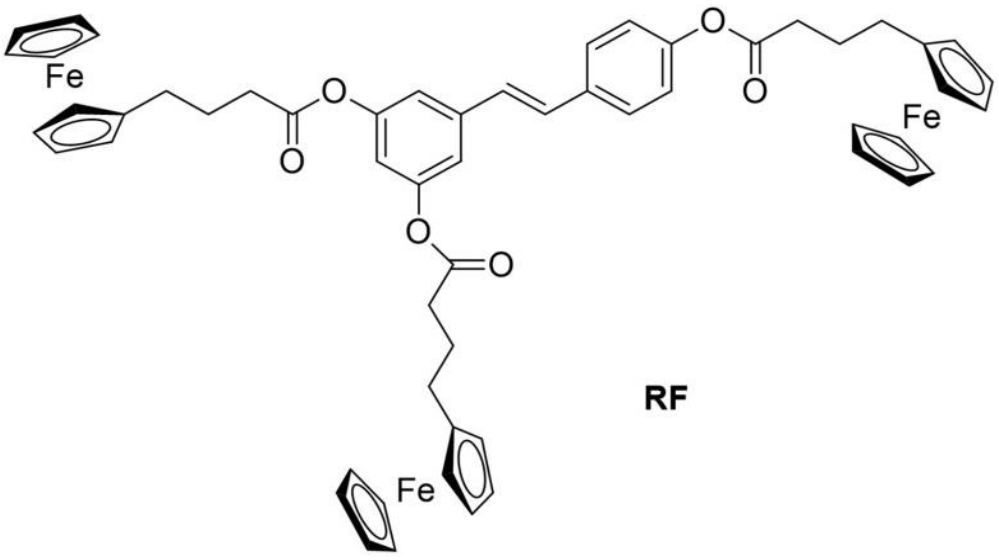
stock otopina *Neutral Red*	125 μL
medij za uzgoj	100 mL

Otopina za odbojavanje *Neutral Red* boje

apsolutni etanol	50 % (v/v)
ledena octena kiselina	1 % (v/v)
dH_2O	49 % (v/v)

Ishodna otopina resveratrola	
RSV	13,6944 mg
DMSO	3 mL
pripremljena su otopine RSV-a tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija od 5, 20, 50, 100 μM	

Ishodna otopina ferocenskog triacilnog derivata resveratrola (RF)	
ferocenski triacilni derivat resveratrola (RF)	59,4348 mg
DMSO	3 mL
pripremljena su otopine RF-a tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija od 5, 20, 50, 100 μM	



Slika 2. Ferocenski triacilni derivat resveratrola (RF)

3.1.4. Oprema i uređaji

U radu je korištena sljedeća oprema i uređaji:

CO_2 inkubator s kontroliranom atmosferom Memmert GmbH + Co.KG, Njemačka
Komora za sterilan rad (laminar) Twin 30, Gelaire Flow Laboratories, UK
Inverzni mikroskop Motic AE2000 s kamerom Moticam S6, MOTIC Deutschland GmbH, Njemačka
Svjetlosni mikroskop LABOVAL 4, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica Assistant, Bright-Line, Njemačka
Guava® Muse® Cell Analyzer, Luminex, SAD
Vibracijska mješalica, Tehnica Železniki, Slovenija
Spektrofotometar Helios- γ, Thermo Electron Corporation, UK
Centrifuga Centric 322A, Tehnica Železniki, Slovenija
Hladnjak za čuvanje stanica na -80°C, New Brunswick Scientific, UK

3.2. METODE RADA

3.2.1. Uzgoj CHO-K1 i HaCaT staničnih linija

CHO-K1 i HaCaT stanice čuvaju se u mediju za zamrzavanje koji se sastoji od 80 % Dulbecco's MEM/F-*12* medija, 10 % FBS-a i 10 % DMSO-a na temperaturi -80 °C. Uzgoj i održavanje staničnih linija započinje naglim odmrzavanjem na 37 °C, u atmosferi od 95 % zraka i 5 % CO_2. Nakon toga slijedi resuspenzija u mediju za uzgoj (90 % *Dulbecco's MEM/F-12* medija i 10 % FBS-a) u T-bocama radi daljnje kultivacije. Uvjeti kontrolirane atmosfere (37 °C, 95 % zraka i 5 % CO_2) potrebni su za optimalni rast i razvoj stanica, a osiguravaju se uzgojem stanica u inkubatoru u kojem vladaju navedeni uvjeti. Nužno je redovito mijenjanje medija za uzgoj. Monoslojne stanice su pričvršćene za podlogu te je prvo potrebno u T-boci isprati od ostatka iskorištenog seruma i medija, a zatim odvojiti od površine T-boce dodavanjem 1 mL tripsina koji ima proteaznu aktivnost. Tripsiniziranim stanicama se dodaje medij za uzgoj (90 % *Dulbecco's MEM/F-12 medija* i 10 % FBS-a) te se stanice resuspendiraju u mediju za uzgoj. Iz stanične suspenzije uzima se mali uzorak za određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*. Nakon izračunavanja broja stanica u uzorku, stanice se razrijeđuju na koncentraciju 2×10^5 stanica mL^{-1} medija za uzgoj dodatkom novog medija.

3.2.2. Određivanje vijabilnosti stanica

U svrhu određivanja učinka RSV-a (Slika1) te RF-a (Slika 2) na staničnu vijabilnost (HaCaT i CHO-K1 stanična linija) u jažice 6-*well* ploča nacjepljuje se po 2 mL stanične suspenzije u koncentraciji od $2x10^4$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj te se ploče stavljaju na inkubaciju. Nakon 24 sata stanice se tretiraju s 10 μL otopine RSV-a ili RF-a kako bi se u mediju za uzgoj postigle koncentracije od 5 – 100 μM. Također, prati se vijabilnost stanica u kontrolnim uzorcima – intaktna kontrola (Ki; netretirane stanice), stanice tretirane s 5 μL etanola mL^{-1} (Ke; obzirom da je RSV otopljen u etanolu) odnosno s 5 μL DMSO mL^{-1} (Kd; obzirom da je RF otopljen u DMSO). Vijabilnost i proliferacija stanica tretiranih različitim koncetracijama RSV-a i RF-a određene su metodama *Neutral Red* i *Trypan Blue* nakon 48 sati.

3.2.2.1. Trypan Blue metoda

Trypan Blue je molekula ~960 Daltona koja ne može penetrirati kroz intaktne stanične membrane i stoga ulazi samo u stanice s oštećenom membranom. *Trypan Blue* metodom stanična vijabilnost određuje se indirektno detekcijom integriteta stanične membrane.

Iz stanične suspenzije prethodno tretirane tripsinom uzme se uzorak od 20 μL i stavi u jažicu na ploči za uzorke, zatim se doda 20 μL *Trypan Blue* boje i dobro se resuspendira. Iz resuspendiranog uzorka uzme se 20 μL i nanese na Fuchs-Rosenthalovu komoricu te se broje stanice pod svjetlosnim mikroskopom. Žive stanice su neobojane, a mrtve plavo obojane. Mrtve se stanice oboje budući da boja lako prolazi kroz oštećenu staničnu membranu. Fuchs-Rosenthalova komorica podijeljena je na 16 kvadrata, a broje se stanice unutar 4 središnja kvadrata i to tako da se uvijek broje sve stanice unutar kvadrata te one u donjem i desnom rubu kako bi se izbjeglo brojanje istih stanica više puta. Nakon toga se računa srednja vrijednost izbrojanih stanica. Površina komorice iznosi 0,0625 mm^2, a dubina 0,2 mm. Ukupan broj živih stanica u uzorku odredi se prema formuli gdje je broj živih stanica jednak srednjoj vrijednosti broja izbrojanih stanica x 2 x 5 x 10^3 [st mL^{-1}].

3.2.2.2. Neutral Red metoda

Neutral Red (NR) metoda je test vijabilnosti koji se temelji na sposobnosti živih stanica da ugrade i vežu boju NR unutar lizosoma. Ova slaba kationska boja može prodrijeti u stanice neionskom difuzijom pri fiziološkom pH. Jednom kada je NR u stanici, nakuplja se

intracelularno u lizosomima gdje se elektrostatskim hidrofobnim vezama veže na anionske i/ili fosfatne skupine lizosomalnog matriksa. Promjenom stanične površine ili umiranjem stanice, sposobnost zadržavanja boje se smanjuje (Repetto i sur., 2008).

Prvo je potrebno iz jažica *multiwell* ploča na koje su nacijepljene stanice ukloniti medij za uzgoj i ispirati stanice sa 1 mL sterilnog PBS-a. U svaku jažicu se dodaje 1 mL radne otopine *Neutral Red*. Potom slijedi inkubacija od tri sata pri 37°C u sterilnim uvjetima. Nakon inkubacije iz jažica se uklanja boja i stanice se ispiru s PBS-om. U jažice se dodaje 2 mL otopine za odbojavanje, a nakon toga se *multiwell* ploče stavljaju na tresilicu u trajanju od 20 minuta. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540 nm u odnosu na slijepu probu.

3.2.3. Detekcija apoptoze protočnom citometrijom

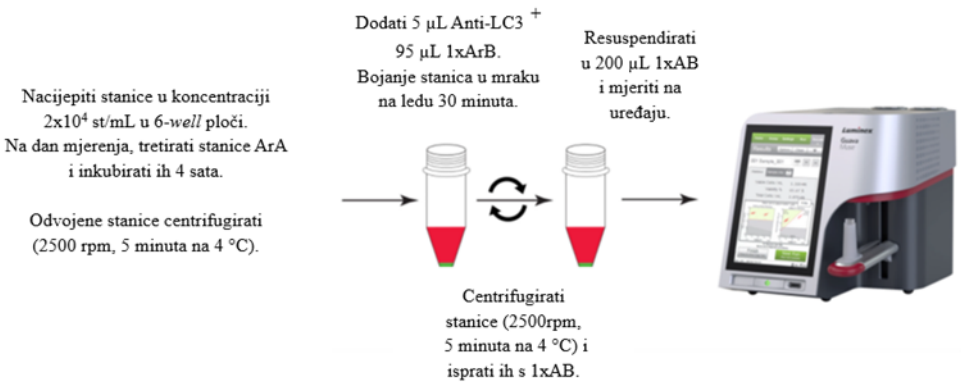
Poznata metoda za detekciju apoptoze je kvantifikacija vezanja aneksina V (engl. *Annexin V*) na fosfatidilserin (engl. *phosphatidylserine*, PS), a temelji na detekciji PS na površini apoptotičkih stanica koristeći reagens koji sadrži fluorescentno označeni aneksin V u kombinaciji s markerom stanične smrti, 7-amino aktinomicin D (engl. *7-amino actinomycin D*, 7-AAD). Aneksin V je Ca^{2+}-ovisni fosfolipid-vezujući protein koji ima visoki afinitet za PS koji se nalazi na unutarnjoj površini stanične membrane. U fazi rane apoptoze PS se premješta na vanjski sloj membrane te se aneksin V veže na njega označavajući tako stanice u ranoj apoptozi (Oh i sur., 2016). Fluorescentna boja 7- AAD izlučuje se iz živih i zdravih stanica s netaknutim membranama, dok prodire u stanice u kasnoj apoptozi ili mrtve te se tamo zadržava. U fazi kasne apoptoze stanice pokazuju gubitak membranskog integriteta (Khan i sur., 2012). Pomoću ove metode može se odrediti udio živih i mrtvih stanica te udio stanica u ranoj i kasnoj apoptozi.

Po 4 mL stanične suspenzije CHO-K1 ili HaCaT stanica u koncentraciji 2×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj, uz dodatak 10 % FBS-a, nacijepi se na *multiwell* ploču sa 6 jažica. Stanice se, nakon inkubacije od 24 sata, tretiraju s 20 µL RSV ili RF kako bi se u mediju za uzgoj postigle koncentracije od 5, 20, 50 i 100 µM spoja. Nakon 48 sati inkubacije s odabranim spojem, metodom protočne citometrije određuje se udio živih, mrtvih i apoptotskih stanica u populaciji. Postupak započinje uklanjanjem medija za uzgoj iz jažica *multiwell* ploče te se na stanice dodaje 500 µL tripsina i takve ploče vraćaju se u inkubator na kratku inkubaciju kako bi se stanice odvojile od podloge. Nakon odvajanja stanica od podloge, u jažice se vraća 500 µL uklonjenog medija za uzgoj. Uzorak za analizu protočnim citometrom dobiva se miješanjem 100 µL

dobivene stanične suspenzije sa 100 µL *MUSE® Annexin V & Dead Cell* reagensa. Slijedi inkubacija na sobnoj temperaturi u mraku, u trajanju od 20 minuta. Stavljanjem uzorka u uređaj, na ekranu se očitavaju podaci o broju živih, mrtvih te stanica u ranoj i kasnoj apoptozi.

3.2.4. Detekcija autofagije protočnom citometrijom

Protokol određivanja autofagije uz *Muse® Autophagy LC3-antibody based Kit* prikazan je na Slici 3. Po 2 mL stanične suspenzije (2×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj, uz dodatak 10 % FBS-a) nacijepi se na *multiwell* ploče sa 6 jažica. Slijedi inkubacija od 24 sata, a zatim se stanice tretiraju s 10 µL otopine RSV-a u etanolu, kako bi se u mediju za uzgoj postigle koncentracije od 5, 20, 50 i 100 µM spoja. Nakon 48 sati inkubacije s RSV-om, metodom protočne citometrije određuje se udio stanica u autofagiji. Prvo se iz jažica *multiwell* ploče ukloni medij za uzgoj te se stanice sterilno ispiru s po 500 µL PBS-a. Po 500 µL PBS-a + 5 µL reagensa A (engl. *autophagy reagent A*, ArA) stavlja se na isprane stanice. Slijedi inkubacija od 4 sata, a nakon toga stanice se opet ispiru s po 500 µL PBS-a te se u jažice stavlja po 500 µL tripsina. Slijedi kratka inkubacija kako bi se stanice odvojile od podloge. Tripsinizirane stanice prebacuju se u Eppendorf epruvete (od 2 mL) te se u njih doda po 500 µL PBS-a. Nakon centrifugiranja (2500 rpm, 5 minuta na 4 °C) uklanja se supernatant, a na stanice se dodaje 5 µL Anti-LC3 + 95 µL 1 x reagens B (engl. 1 x *autophagy reagent B*, ArB). Sljedeći korak je bojanje stanica u mraku na ledu 30 minuta. Nakon bojanja stanice se ponovno centrifugiraju (2500 rpm, 5 minuta na 4 °C), nakon čega se uklanja supernatant, stanice se isperu puferom (engl. 1x *Assay Buffer*, 1xAB) i ponovno centrifugiraju (2500 rpm, 5 minuta, 4 °C). Kada se ukloni supernatant, stanice se resuspendiraju u 200 µL 1xAB. Analiza uzorka provodi se metodom protočne citometrije na *Guava® Muse® Cell Analyzer* uređaju. Podaci generirani pomoću analizatora stanica zajedno s odgovarajućim softverom daju uvid u indukciju autofagije (na temelju intenziteta fluorescencije testnog uzorka u odnosu na kontrolu).



Slika 3. Protokol određivanja autofagije uz *Muse® Autophagy LC3-antibody based Kit* (*prema* Merck KGaA, 2013)

3.2.5. Obrada rezultata

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($\bar{x}$) uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} x_i$$

S pripadajućim standardnim greškama $S_{\bar{x}}$:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N(N\ -\ 1)}}$$

N = ukupan broj uzoraka u skupini

X_i = pojedinačne vrijednosti uzoraka

Statistička analiza provedena je Studentovim *t*-testom, a t vrijednost dobivena je iz izraza:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_{\bar{x}_1}^2 + S_{\bar{x}_2}^2}}$$

Statistički značajnim smatrane su razlike između skupina za koje je stupanj vjerojatnosti najmanje $p<0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

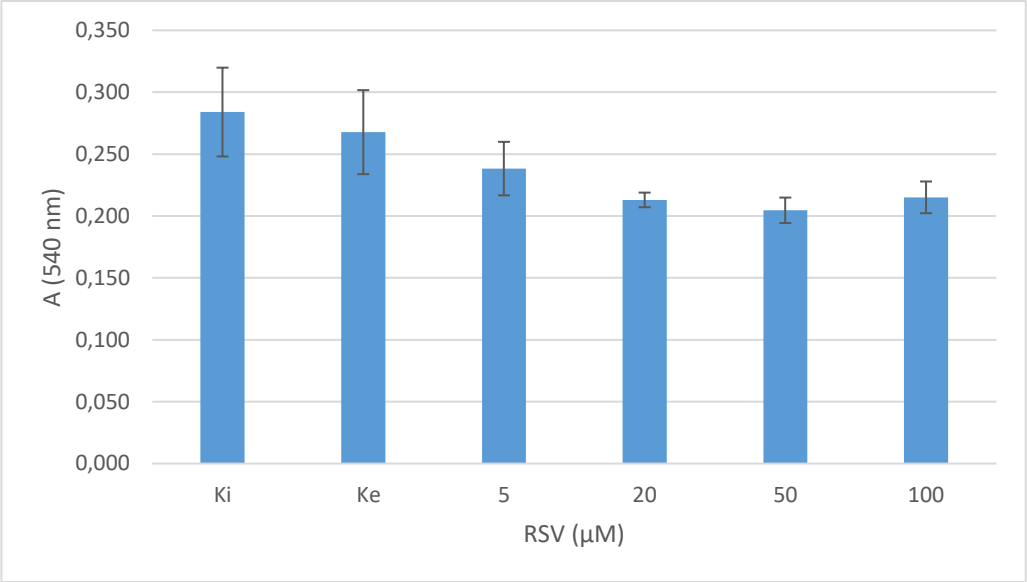
4.1. UČINAK RESVERATROLA I FEROCENSKOG DERIVATA RESVERATROLA NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU HaCaT I CHO-K1 STANICA

Vijabilnost i proliferacija stanica tretiranih različitim koncetracijama RSV-a i RF-a određene su metodama *Neutral Red* i *Trypan Blue* nakon 48 sati. Utvrđene su koncentracije spojeva (RSV i RF) koje uzrokuju 20, 50 i 80 %-tnu inhibiciju stanične vijabilnosti (IC_{20}, IC_{50}, IC_{80}).

4.1.1. Učinak resveratrola i ferocenskog derivata resveratrola na vijabilnost HaCaT stanica određen metodom *Neutral Red*

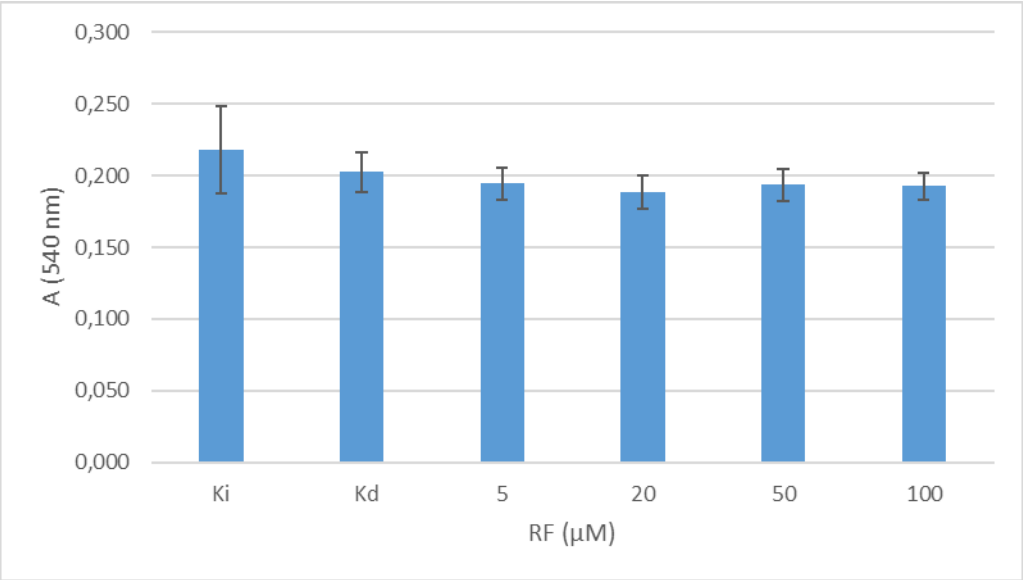
Učinak RSV-a i RF-a u koncentracijama od 5, 20, 50 i 100 μM na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica određen je metodom *Neutral Red* 48 sati nakon tretmana. Statistički obrađeni rezultati (4 do 11 mjerenja po uzorku) prikazani su na Slikama 4 i 5 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška.

Na Slici 4 prikazan je utjecaj RSV-a (5-100 μM) na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica. Uočen je blagi pad vijabilnosti stanica s porastom koncentracije, no učinak nije bio statistički značajan. Pad vijabilnosti HaCaT stanica tretiranih RSV-om (25 – 500 μM) određen je i u istraživanju Rocha i sur. (2017). U studiji Chen i sur. (2021) također je ispitan učinak RSV na vijabilnost humanih keratinocita. Više koncentracije resveratrola (>100 μM) statistički su značajno smanjile vijabilnost HaCaT stanica, dok niže koncentracije (≤100 μM) nisu imale signifikantnog učinka na staničnu vijabilnost što je u korelaciji s rezultatima dobivenim ovim istraživanjem.



Slika 4. Učinak resveratrola (RSV) (5, 20, 50 i 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica 48 sati nakon tretmana, određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška (K_i – intaktna kontrola (netretirane stanice); Ke - stanice tretirane s 5 μL etanola mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane resveratrolom (RSV) u koncentracijama od 5 – 100 μM).

Na Slici 5 prikazan je utjecaj RF-a (5 -100 μM) na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica određen *Neutral Red* metodom nakon 48h. Različito od blagog pada vijabilnosti stanica uzrokovanog RSV-om, RF nije djelovao citotoksično te je vijabilnost ostala nepromijenjena u odnosu na Kd (stanice tretirane s 5 μL DMSO mL^{-1} medija za uzgoj).

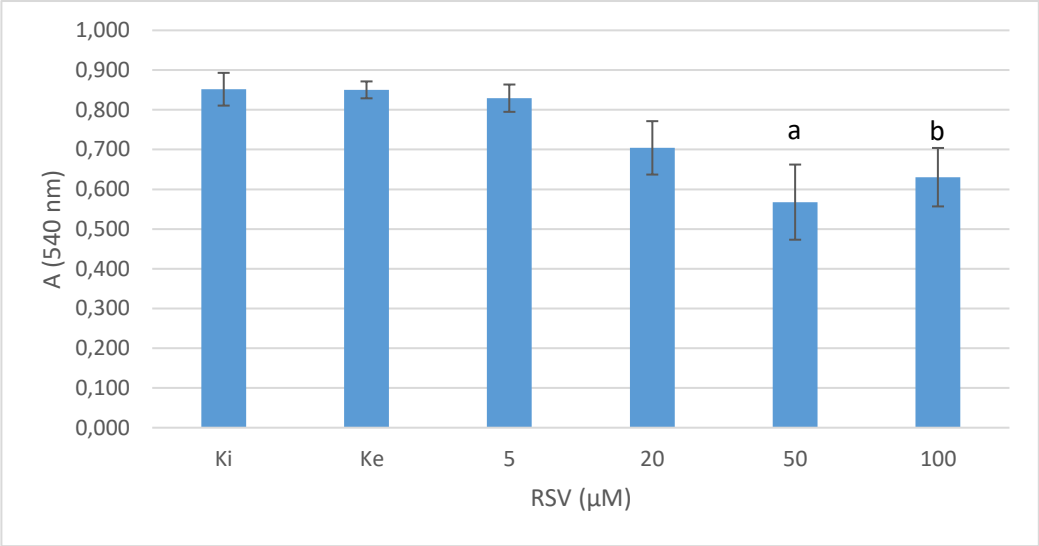


Slika 5. Učinak ferocenskog derivata resveratrola (RF) (5, 20, 50 i 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica 48 sati nakon tretmana, određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška (K_i – intaktna kontrola (netretirane stanice); Kd - stanice tretirane s 5 μL DMSO mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane ferocenskim derivatom resveratrola (RF) u koncentracijama od 5 – 100 μM).

4.1.2. Učinak resveratrola i ferocenskog derivata resveratrola na vijabilnost CHO-K1 stanica određen metodom *Neutral Red*

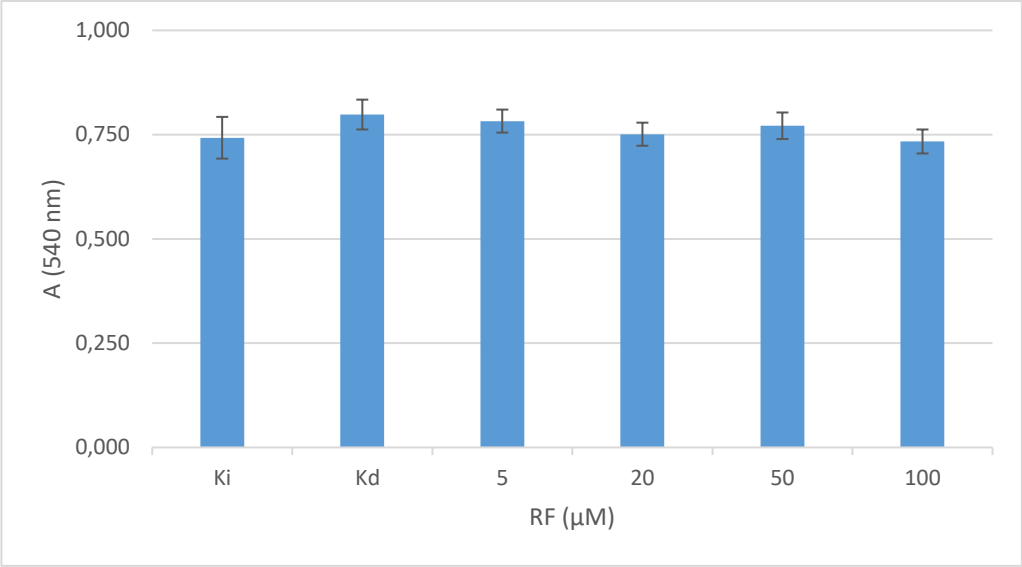
Učinak RSV-a i RF-a u koncentracijama od 5, 20, 50 i 100 μM na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen je metodom *Neutral Red* 48 sati nakon tretmana. Statistički obrađeni rezultati (4 do 11 mjerenja po uzorku) prikazani su na Slikama 6 i 7 kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška.

Na Slici 6 prikazan je utjecaj RSV-a (5 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen *Neutral Red* metodom nakon 48h. Uočen je blagi pad u staničnoj vijabilnosti pri nižim koncentracijama, no pri koncentracijama 50 i 100 μM određena je statistički značajno niža vijabilnost u odnosu na kontrolni uzorak (pri 50 μM $p<0,01$, a pri 100 μM $p<0,025$). Pri 50 μM RSV-a preživljenje je iznosilo 66,82 % u odnosu na kontrolni uzorak, a pri 100 μM 74,12 %. U radu Marđetko (2015) također je metodom *Neutral Red* potvrđeno smanjenje stanične vijabilnosti u ovisnosti o koncentraciji RSV-a.



Slika 6. Učinak resveratrola (RSV) (5, 20, 50 i 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 48 sati nakon tretmana, određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška (K_i – intaktna kontrola (netretirane stanice); Ke - stanice tretirane s 5 μL etanola mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane resveratrolom (RSV) u koncentracijama od 5 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na Ke (Student *t*-test): $^{b}p<0,025$, $^{a}p<0,01$.

Na Slici 7 prikazan je utjecaj RF-a (5 - 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Neutral Red* nakon 48h. Nije uočen pad vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolni uzorak što ukazuje na izmijenjenu biološku aktivnost novosintetiziranog derivata u odnosu na ishodni spoj – RSV.

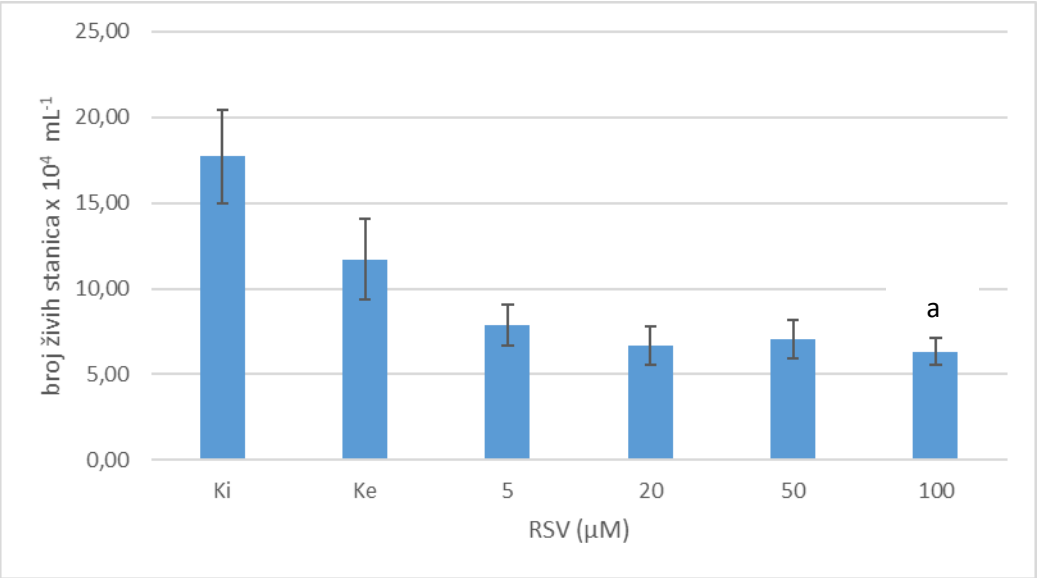


Slika 7. Učinak ferocenskog derivata resveratrola (RF) (5, 20, 50 i 100 µM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 48 sati nakon tretmana, određen metodom *Neutral Red*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška (K_i – intaktna kontrola (netretirane stanice); Kd - stanice tretirane s 5 µL DMSO mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane ferocenskim derivatom resveratrola (RF) u koncentracijama od 5 – 100 µM).

4.1.3. Učinak resveratrola i ferocenskog derivata resveratrola na proliferaciju HaCaT stanica određen metodom *Trypan Blue*

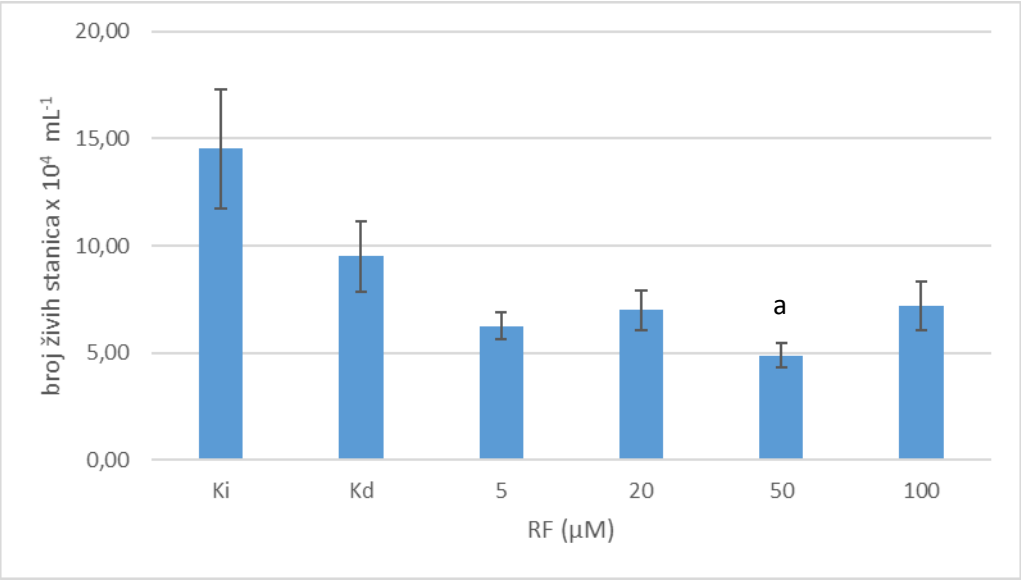
Učinak RSV-a i RF-a u koncentracijama od 5, 20, 50 i 100 µM na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica određen je metodom *Trypan Blue* 48 sati nakon tretmana. Statistički obrađeni rezultati (5 do 12 mjerenja po uzorku) prikazani su na Slikama 8 i 9 kao srednja vrijednost broja živih stanica mL^{-1}.

Na Slici 8 prikazan je utjecaj RSV na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica. Pri ispitivanju učinka RSV-a na proliferaciju HaCaT stanica *Trypan Blue* metodom nakon 48h pri svim upotrebljenim koncentracijama tog spoja određeno je smanjenje proliferacije u odnosu na kontrolni uzorak, s time da je statistički značajno smanjenje primjećeno pri 100 µM koncentraciji RSV-a (p<0,05) (Slika 8). Slične rezultate u svom istraživanju dobili su Rocha i sur. (2017).



Slika 8. Učinak resveratrola (RSV) (5, 20, 50 i 100 µM) na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica 48 sati nakon tretmana, određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost broja živih stanica mL^{-1} ± standardna pogreška (K_i – intaktna kontrola (netretirane stanice); Ke - stanice tretirane s 5 µL etanola mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane resveratrolom (RSV) u koncentracijama od 5 – 100 µM). Statistički značajna razlika u odnosu na Ke (Student *t*-test): $^{a}p<0,05$.

Na Slici 9 prikazan je utjecaj RF-a na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica određen metodom *Trypan Blue*. 48 sati nakon tretmana stanica RF-om utvrđeno je smanjenje proliferacije u odnosu na kontrolni uzorak (stanice tretirane s DMSO) pri svim ispitanim koncentracijama (5 – 100 µM) tog spoja, a 50 µM koncentraciji taj je učinak bio statistički signifikantan ($p<0,025$).

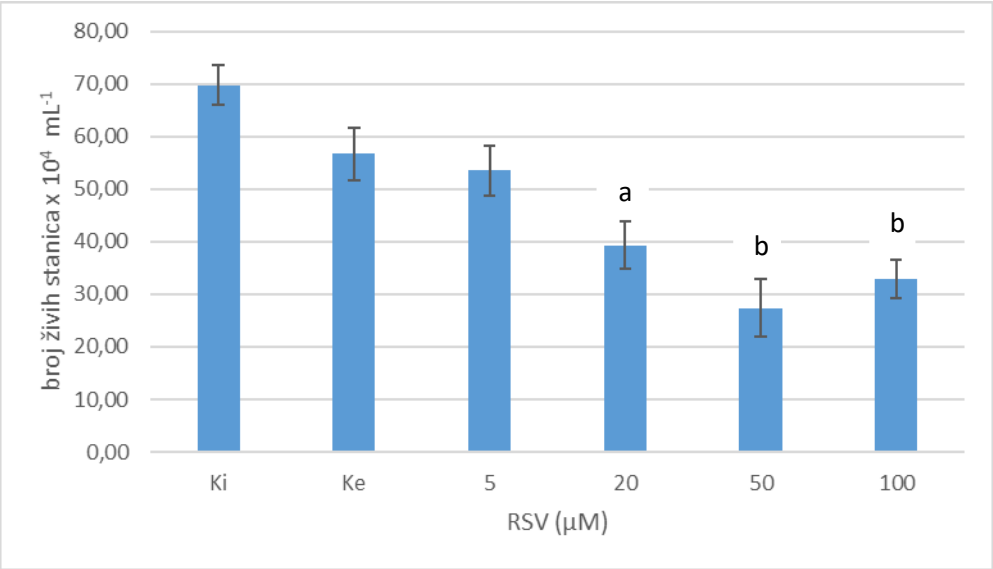


Slika 9. Učinak ferocenskog derivata resveratrola (RF) (5, 20, 50 i 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica 48 sati nakon tretmana, određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost broja živih stanica mL^{-1} ± standardna pogreška (K_i – intaktna kontrola (netretirane stanice); Kd - stanice tretirane s 5 μL DMSO mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane ferocenskim derivatom resveratrola (RF) u koncentracijama od 5 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na Kd (Student *t*-test): $^{a}p<0,025$.

4.1.4. Učinak resveratrola i ferocenskog derivata resveratrola na proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Trypan Blue*

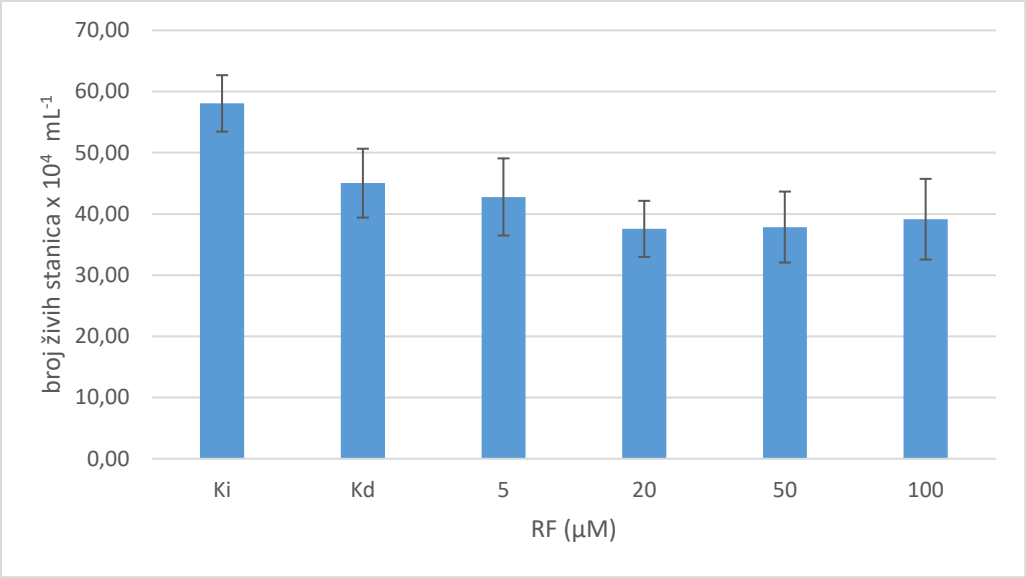
Učinak RSV-a i RF-a u koncentracijama od 5, 20, 50 i 100 μM na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen je metodom *Trypan Blue* 48 sati nakon tretmana. Statistički obrađeni rezultati (4 do 12 mjerenja po uzorku) prikazani su na Slikama 10 i 11 kao srednja vrijednost broja živih stanica mL^{-1} ± standardna pogreška .

Na Slici 10 prikazan je utjecaj RSV-a (5 -100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Trypan Blue* nakon 48h. Iz rezultata je vidljivo statistički značajno ($p<0,025$ - $p<0,001$) smanjenje vijabilnosti stanica kod svih ispitanih koncentracija osim pri najnižoj dozi (5 μM) gdje je inhibitoran učinak na proliferaciju stanica prisutan no ne i signifikantan.



Slika 10. Učinak resveratrola (RSV) (5, 20, 50 i 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 48 sati nakon tretmana, određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost broja živih stanica mL^{-1}± standardna pogreška (K_i – intaktna kontrola (netretirane stanice); Ke - stanice tretirane s 5 μL etanola mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane resveratrolom (RSV) u koncentracijama od 5 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na Ke (Student *t*-test): $^{b}p<0,001$, $^{a}p<0,025$.

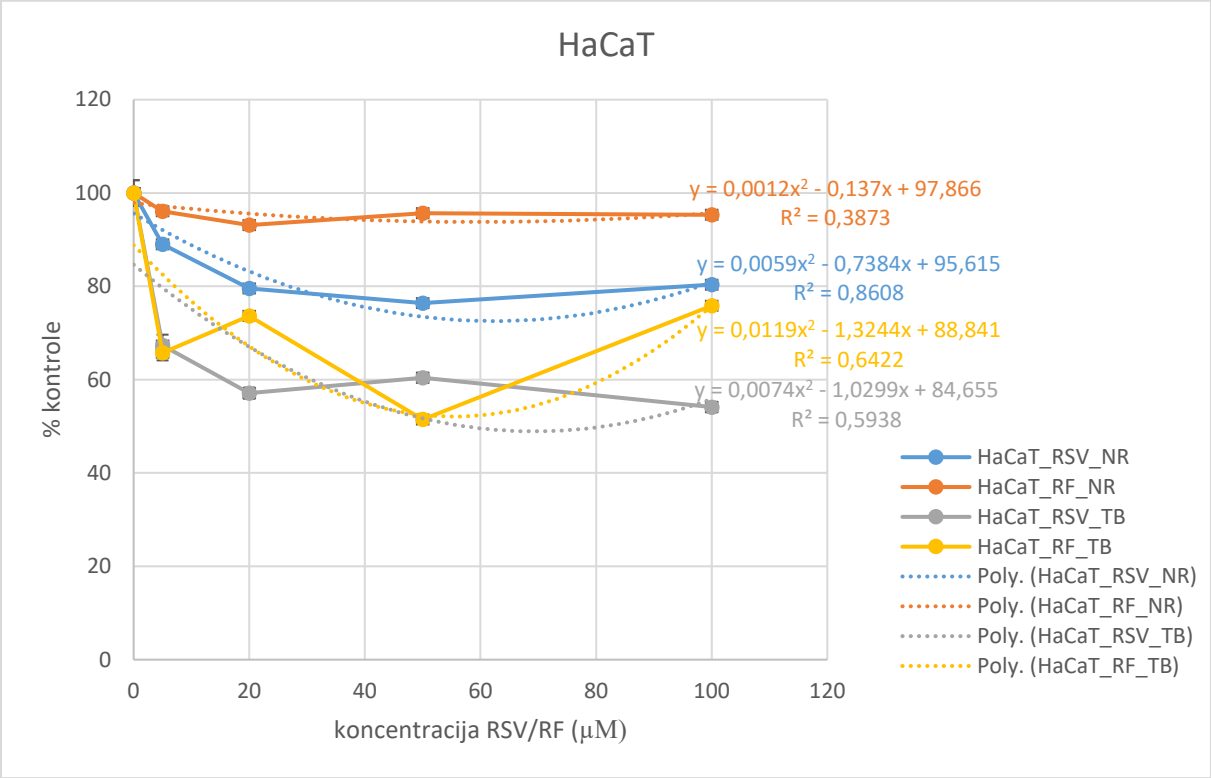
Na Slici 11 prikazan je utjecaj RF-a (5 – 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *Trypan Blue*. U usporedbi s RSV-om, RF je pokazao drugačiju biološku aktivnost u CHO-K1 stanicama pri čemu je inhibitorni učinak na staničnu proliferaciju i vijabilnost u odnosu na RSV (određen metodom *Trypan Blue* kao i s *Neutral Red* metodom) bio znatno slabiji. Rezultati učinka RSV su u skladu s hipotezom te se podudaraju s rezultatima Marđetko (2015). U radu Duan i sur. (2016) proučavan je utjecaj RSV-a i triacilresveratrola na proliferaciju PANC-1 i BxPC-3 stanica metodom MTS. Rezultati 48h nakon tretmana spojevima su pokazali kako oba spoja imaju inhibirajući utjecaj na staničnu vijabilnost, s tim da RSV ima značajniji utjecaj nego triacilresveratrol, slično kao i odnos RSV-a i RF-a.



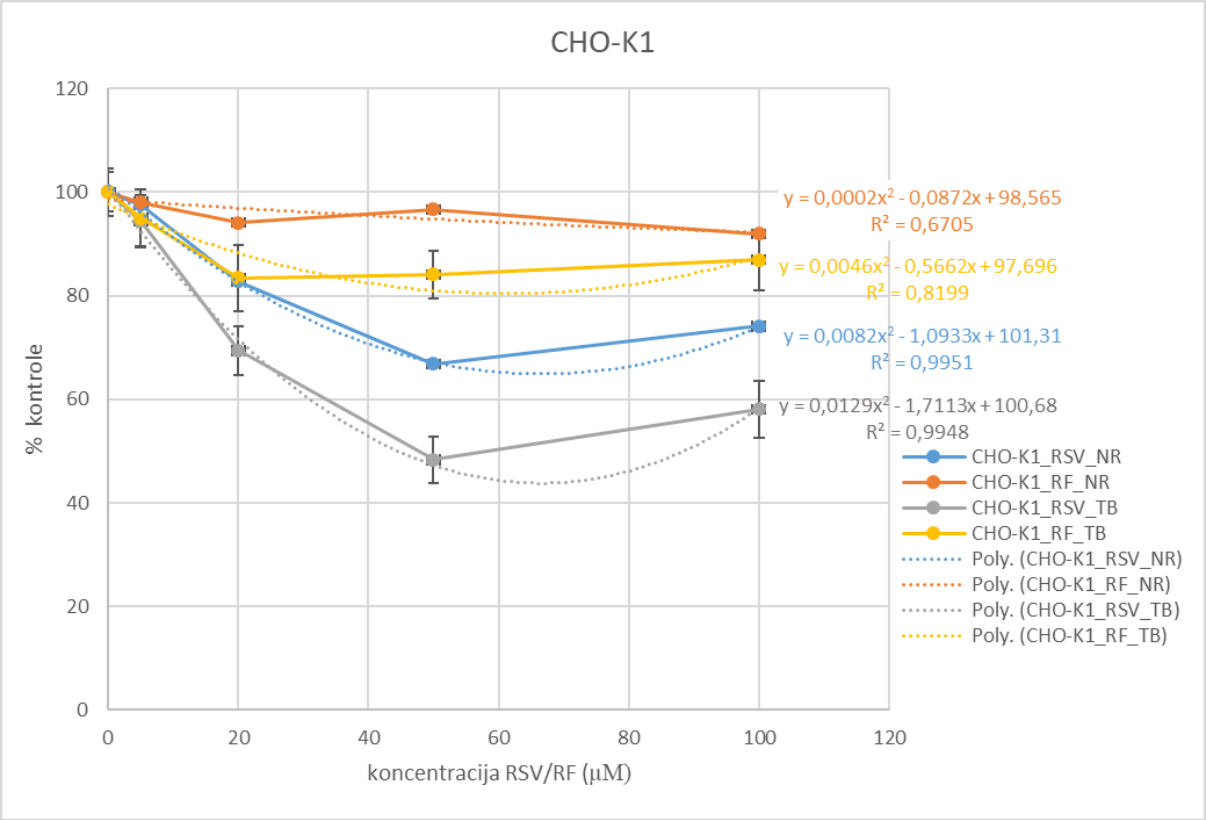
Slika 11. Učinak ferocenskog derivata resveratrola (RF) (5, 20, 50 i 100 μM) na vijabilnost i proliferaciju CHO-K1 stanica 48 sati nakon tretmana, određen metodom *Trypan Blue*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost broja živih stanica mL^{-1} ± standardna pogreška (K_i – intaktna kontrola (netretirane stanice); Kd - stanice tretirane s 5 μL DMSO mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane ferocenskim derivatom resveratrola (RF) u koncentracijama od 5 – 100 μM).

4.2. IC VRIJEDNOSTI ZA RESVERATROL I FEROCENSKI DERIVAT RESVERATROLA ODREĐENE NA HaCaT I CHO-K1 KULTURI STANICA

Prikazi ovisnosti preživljenja stanica o različitim koncentracijama RSV-a i RF-a određeni metodama *Neutral Red* i *Trypan Blue* 48 h nakon tretmana prikazani su na Slikama 12 i 13. Učinak svake od doza RSV-a i RF-a (5, 20, 50 i 100 μM) određen je iz najmanje 4, a najviše 12 mjerenja. Iz oba grafa vidi se kako u pravilu vijabilnost stanica obje kulture pada s porastom koncentracije oba spoja. Proučavajući odnose RSV i RF vidi se kako RF pokazuje izmijenjenu aktivnost u odnosu na RSV, tj. vidi se da RF ima slabiji utjecaj na smanjenje vijabilnosti od samog RSV u obje stanične linije. Odnosno, nakon tretmana RF veća je vijabilnost stanica zbog njegovog blažeg citotoksičnog utjecaja.



Slika 12. Prikaz vijabilnosti HaCaT stanica 48 h nakon tretmana s 5 do 100 μM resveratrolom (RSV) i ferocenskim derivatom resveratrola (RF) u odnosu na kontrolne vrijednosti praćeno *Neutral Red* i *Trypan Blue* metodama. Prikazani podaci pokazuju srednju vrijednost ± standardna pogreška. Jednadžbe se odnose na interpolirane polinomne krivulje s pripadajućom R^2 vrijednostima.



Slika 13. Prikaz vijabilnost CHO-K1 stanica 48 h nakon tretmana s 5 do 100 µM resveratrolom (RSV) i ferocenskim derivatom resveratrola (RF) u odnosu na kontrolne vrijednosti praćeno *Neutral Red* i *Trypan Blue* metodama. Prikazani podaci pokazuju srednju vrijednost ± standardna pogreška. Jednadžbe se odnose na interpolirane polinomne krivulje s pripadajućom R^2 vrijednostima.

Iz jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja koje najmanje odstupaju od izmjerenih podataka određene su IC_{20}, IC_{50}, IC_{80} vrijednosti koje su prikazane u Tablici 1. Odabir interpoliranih krivulja temeljio se na tome da pripadajući koeficijent determinacije (R^2) , čije su vrijednosti u intervalu $0 \leq R^2 \leq ,1$ bude što bliži 1 (tada je model reprezentativniji). IC_{20}, IC_{50} i IC_{80} vrijednosti su određene primjenom metoda *Neutral Red* i *Trypan Blue* (Tablica 1), a one predstavljaju koncentracije ispitivanog spoja kod kojih dolazi do 20, 50 i 80 %-tne inhibicije staničnog rasta. IC_{20} vrijednost za RSV na HaCaT stanicama određena metodom *Neutral Red* iznosi 26,95 µM, a određena metodom *Trypan Blue* 4,68 µM. IC_{20} za RSV na CHO-K1 iznosi 23,71 µM određeno *Neutral Red* metodom, a 13,45 *Trypan Blue*. Niže IC vrijednosti u obje stanične linije dobivene *Trypan Blue* metodom u odnosu na *Neutral Red* test

mogu se objasniti povećanjem broja i veličine lizosoma (u kojima se nakuplja boja Neutral Red) nakon tretmana stanica RSV-om. U radu Greifová i sur. (2020) istraživan je učinak RSV-a na lizosomalnu funkciju metodom *Neutral Red*. Najveće doze RSV-a (50 i 100 μM) pokazale su značajno smanjenje lizosomalne aktivnosti. Za RF na HaCaT stanicama IC_{20} vrijednost iznosi 7,13 μM određena *Trypan Blue* metodom te je viša u odnosu na IC_{20} vrijednost određenu na istoj staničnoj liniji za RSV. Također, iz Slika 12 i 13 vidljiv je znatno slabiji citotoksični učinak RF-a u obje stanične kulture što upućuje na izmjenjenu aktivnost derivata nakon uvođenja ferocena u strukturu.

Tablica 1. Koncentracije resveratrola (RSV) i ferocenskog derivata resveratrola (RF) koje inhibiraju vijabilnost HaCaT i CHO-K1 stanica za 20, 50 i 80 % određene metodom *Neutral Red* i *Trypan Blue* nakon 48 sati

	IC vrijednosti /μM							
	HaCaT				CHO-K1			
Neutral Red		IC_{20}	IC_{50}	IC_{80}		IC_{20}	IC_{50}	IC_{80}
	RSV	26,95	-	-		23,71	-	-
	RF	-	-	-		-	-	-
Trypan Blue	RSV	4,68	56,96	-		13,45	44,63	-
	RF	7,13	-	-		-	-	-

4.3. UČINAK RESVERATROLA I FEROCENSKOG DERIVATA RESVERATROLA NA INDUKCIJU STANIČNE SMRTI

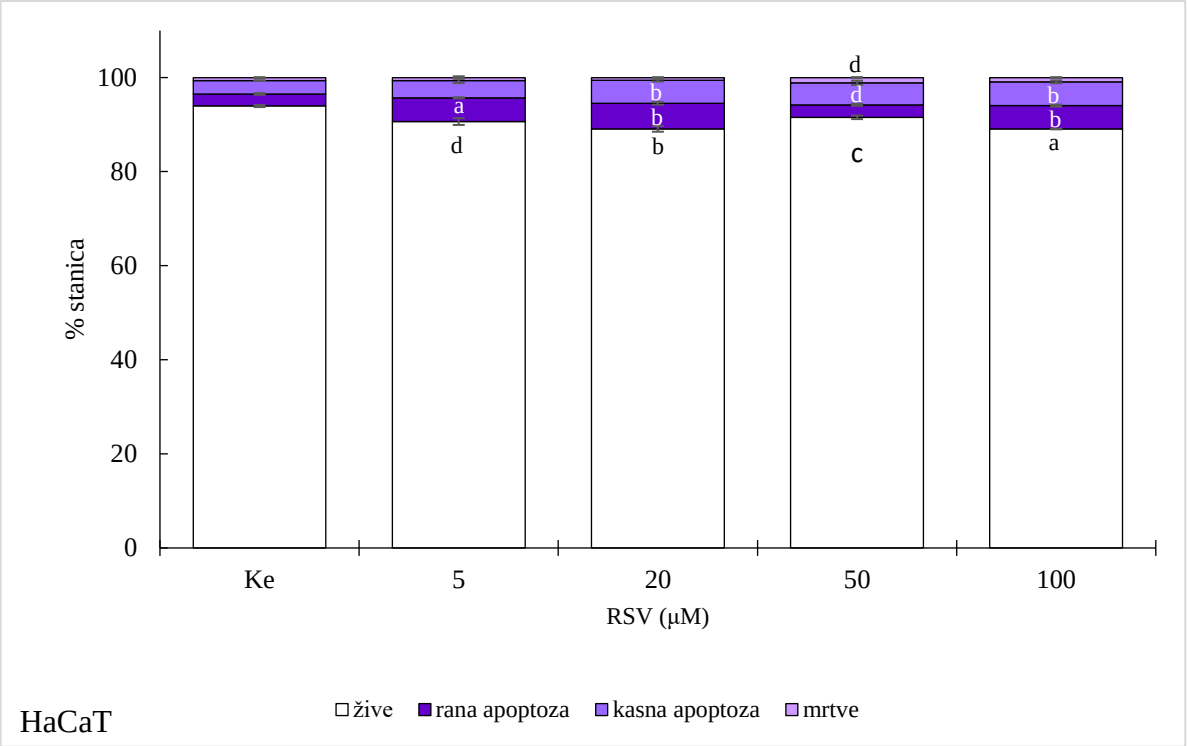
Radi utvrđivanja tipa stanične smrti nakon tretmana HaCaT i CHO-K1 stanica RSV-om nacijepljene su stanice u volumenu od 2 mL u jažice 6-*well* ploča u koncentraciji od $2x10^4$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj. 24 sata nakon tretirane su s po 10 μL otopine RSV u DMSO-u tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 5 – 100 μM RSV. Upotrebom *MUSE*® protočnog citometra provodi se kvantitativna analiza živih, apoptotskih (rana i kasna apoptoza) i mrtvih (nekrotičnih) stanica.

Primjenom *MUSE*® protočnog citometra rezultati su prikazani u obliku *dot-plot* dijagrama na kojima je subpopulacija živih stanica prikazana u donjem lijevom kvadrantu (7-AAD (-)/aneksin V (-)), u donjem desnom kvadrantu prikazane su stanice koje čine populaciju stanica u ranoj apoptozi (7-AAD (-)/aneksin V (+)), gornji desni kvadrant prikazuje stanice u kasnoj apoptozi (7-AAD (+)/aneksin V (+)), dok se u gornjem lijevom kvadrantu nalazi subpopulacija mrtvih stanica (7-AAD (+)/aneksin V (-)).

Rezultati analize HaCaT i CHO-K1 stanične smrti nakon tretmana stanica RSV/RF prikazani su kao udio živih stanica, mrtvih stanica te stanica u ranoj i kasnoj apoptozi. Također, rezultati su prikazani i kao reprezentativni *dot-plot* dijagrami sa četiri različite subpopulacije HaCaT i CHO-K1 stanica dobiveni primjenom metode protočne citometrije 48 sati nakon tretmana RSV-om.

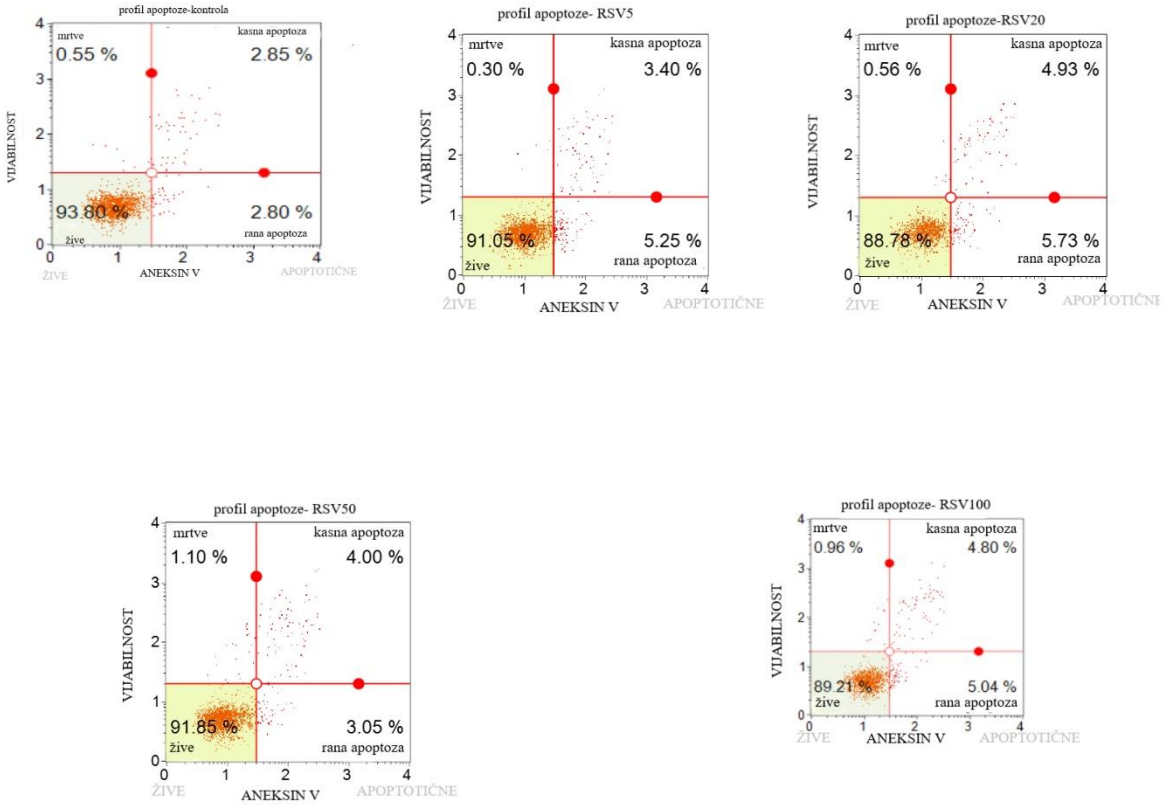
4.3.1. Apoptoza potaknuta resveratrolom u HaCaT kulturi stanica

Na Slici 14 prikazani su udjeli subpopulacija HaCaT stanica - živih, mrtvih, u ranoj i kasnoj apoptozi nakon tretmana RSV-om (5-100 μM). Iz grafa možemo vidjeti kako s porastom koncentracije spoja dolazi do blagog smanjenja subpopulacije živih stanica. U kontrolnom uzorku je udio živih stanica 93,95 %, a nakon toga slijedi blagi pad vijabilnosti (udjela subpopulacije živih stanica u kulturi) koji je statistički značajan pri koncentracijama: od 5 μM (p<0,025; udio živih stanica - 90,65 %), pri 20 μM (p<0,005; udio živih stanica - 89,09 %), pri 50 μM (p<0,01; udio živih stanica - 91,55 %) i pri 100 μM (p<0,001; udio živih stanica - 89,07 %). Tretman HaCaT stanica RSV-om rezultirao je blago povećanim udjelom stanica u apoptozi u odnosu na kontrolni uzorak. Naime, u kontrolnih stanica udio stanica u apoptozi (rana i kasna apoptoza) iznosio je 5,4 %, dok je taj udio iznosio 8,73 % nakon tretmana s 5 μM RSV-om, te je s porastom koncentracije (100 μM RSV) dosegao 10,03 % (p<0,005). U kontrolnom uzorku udio mrtvih stanica iznosio je 0,65 %, te je s porastom koncentracije dosegao 1,12 % (p<0,025) pri 50 μM te 0,90 % pri 100 μM.



Slika 14. Udjeli živih, stanica u ranoj apoptozi, kasno apoptotičnih te mrtvih stanica u HaCaT kulturi nakon tretmana stanica s resveratrolom (RSV) (5 – 100 μM). (Ke – stanice tretirane s 5 μL etanola mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane resveratrolom (RSV) u koncentracijama 5 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na Ke (Student *t*-test): $^{d}p<0,025$, $^{c}p<0,01$, $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$

Na Slici 15 prikazani su reprezentatvni *dot-plot* dijagrami 48h nakon tretmana HaCaT stanica s RSV-om (5-100 μM).



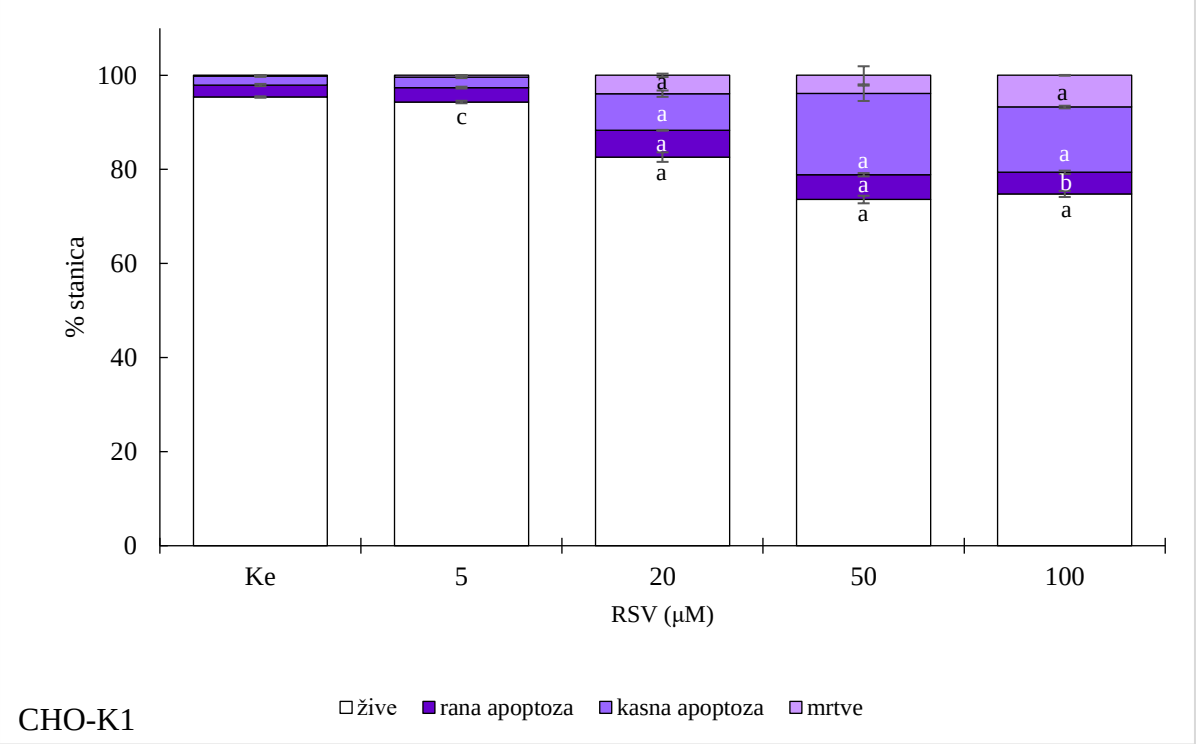
Slika 15. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami 48 sati nakon tretmana HaCaT stanica resveratrolom (RSV) dobiveni metodom protočne citometrije (kontrola – stanice tretirane etanolom u koncentraciji 5 μL mL^{-1} medija za uzgoj; RSV5 – 100 – stanice tretirane resveratrolom (RSV) u koncentracijama od 5 – 100 μM)

4.3.2. Apoptoza potaknuta resveratrolom u CHO-K1 kulturi stanica

Na Slici 16 prikazani su udjeli subpopulacija CHO-K1 stanica - živih, mrtvih, u ranoj i kasnoj apoptozi nakon tretmana RSV-om (5-100 μM). Udio živih stanica u kulturi statistički je značajno pao s 95,38 % u kontrolnom uzorku na 74,78 % (p<0,001) pri 100 μM RSV-a, dok se udio apoptotičnih te mrtvih stanica se povećao ovisno o apliciranoj dozi RSV-a (*dose-response*). Udio mrtvih stanica u kontrolnom uzorku iznosio je 0,20 % te je s porastom koncentracije iznosio 3,90 % (p<0,001) pri 20 μM te 6,74 % (p<0,001) pri 100 μM RSV-a. RSV u dozama ≥20 μM statistički je značajno (p<0,005 - p<0,001) inducirao apoptozu (porast udjela stanica u ranoj i kasnoj apoptozi) u CHO-K1 staničnoj liniji. Iz rezultata je vidljivo da

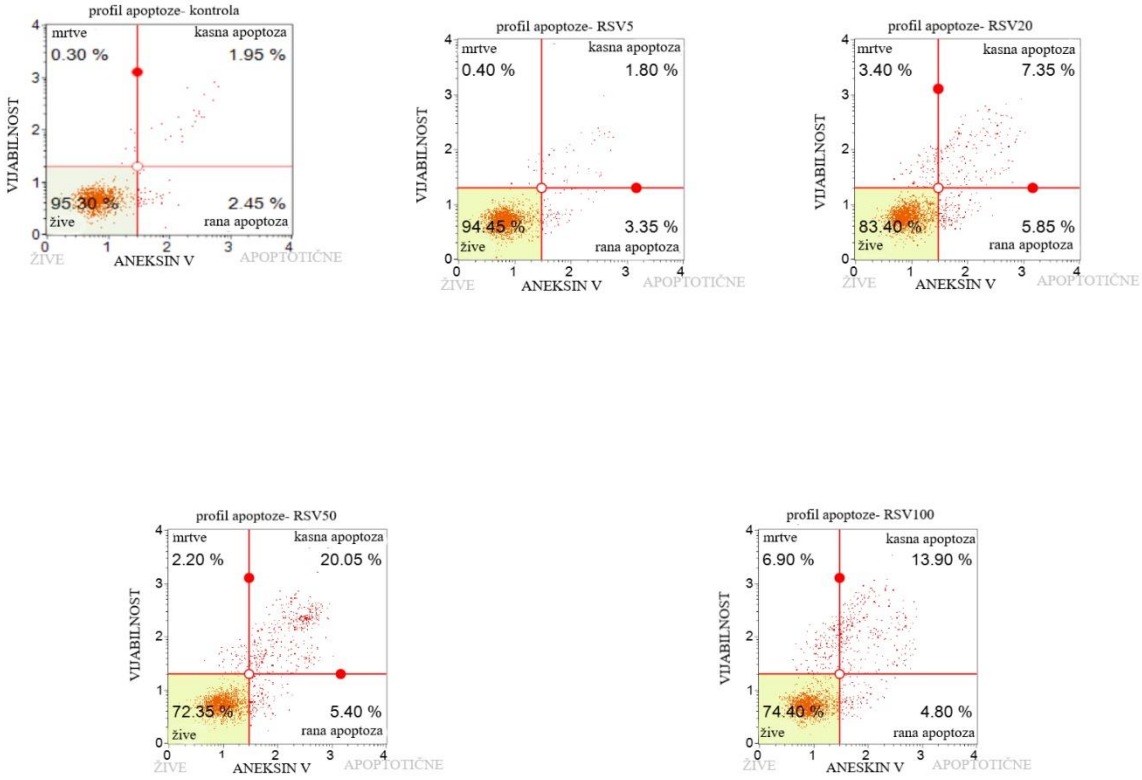
RSV dovodi do odumiranja stanica primarno apoptotskim putem obzirom da je udio mrtvih stanica (one koje odumiru nekrozom) niži u odnosu na udio ukupno apoptotskih stanica.

U radu Jiang i sur. (2005) ispitivao se učinak resveratrola (0-100 μM) na staničnu smrt ljudskih U251 glioma stanica. Razina stanične smrti određena je 48 sati nakon tretmana stanica ispitivanjem oslobađanja laktat dehidrogenaze (LDH). Značajno povećanje oslobađanja LDH izazvanog resveratrolom uočeno je pri koncentracijama od 50 i 100 μM. Indukcija stanične smrti podudara se s rezultatima u ovom radu.



Slika 16. Udjeli živih, stanica u ranoj apoptozi, kasno apoptotičnih te mrtvih stanica u CHO-K1 kulturi nakon tretmana stanica s resveratrolom (RSV) (5 – 100 μM). (Ke – stanice tretirane s 5 μL etanola mL^{-1} medija za uzgoj; 5 – 100 – stanice tretirane resveratrolom (RSV) u koncentracijama 5 – 100 μM). Statistički značajna razlika u odnosu na Ke (Student *t*-test): $^{c}p<0,01$, $^{b}p<0,005$, $^{a}p<0,001$

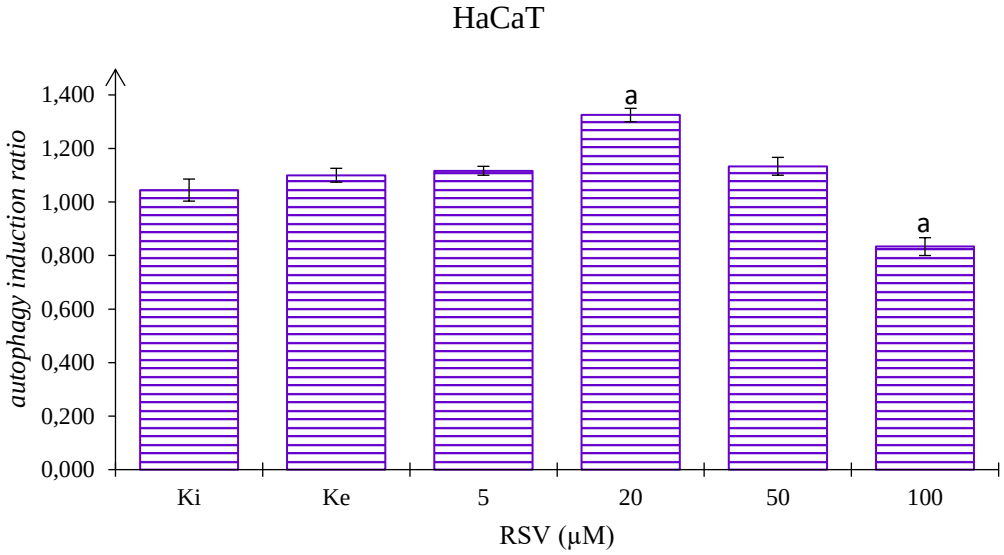
Na Slici 17 prikazani su reprezentatvni *dot-plot* dijagrami 48h nakon tretmana CHO-K1 stanica s RSV-om (5-100 μM).



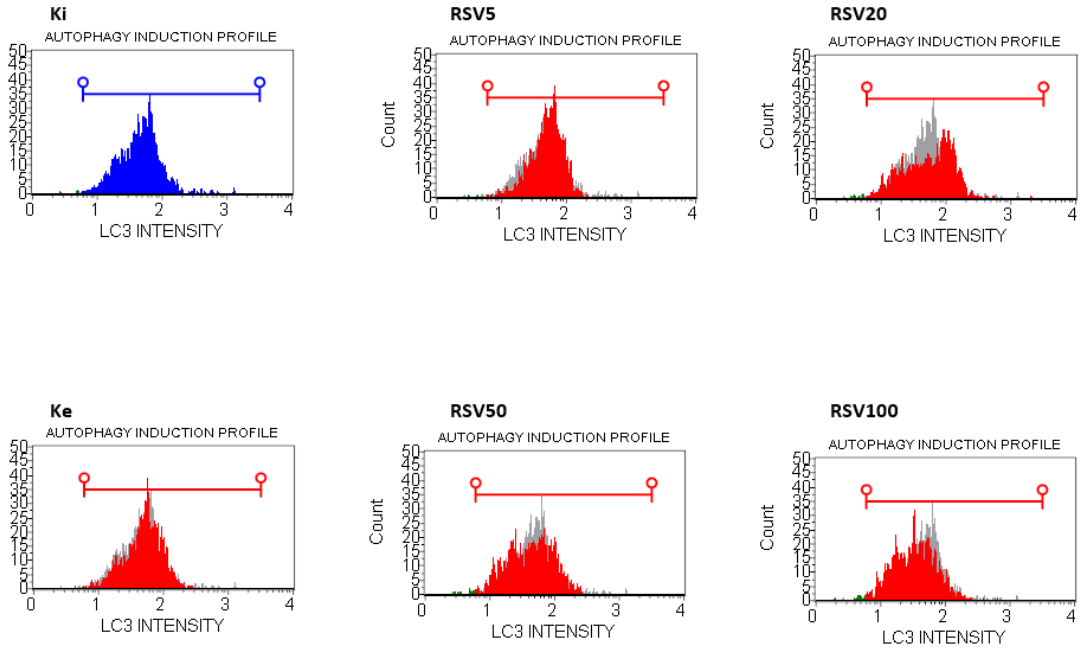
Slika 17. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami 48 sati nakon tretmana CHO-K1 stanica resveratrolom (RSV) dobiveni metodom protočne citometrije (kontrola – stanice tretirane etanolom u koncentraciji 5 μL mL^{-1} medija za uzgoj; RSV5 – 100 – stanice tretirane resveratrolom (RSV) u koncentracijama od 5 – 100 μM).

4.3.3. Autofagija potaknuta resveratrolom u HaCaT staničnoj liniji

Rezultati učinka različitih koncentracija RSV-a na indukciju autofagije u HaCaT kulturi stanica statistički su obrađeni i prikazani na Slici 18. Reprezentativni uzorci tj. histogrami (*Autophagy induction profile*) dobiveni primjenom protočne citometrije i *Muse autophagy LC3-antibody based kit*-a za kontrolne uzorke (Ki i Ke) i stanice tretirane RSV-om (5 –100 μM) prikazani su na Slici 19.



Slika 18. Evaluacija autofagije u HaCaT staničnoj liniji nakon tretmana resveratrolom (RSV) u koncentraciji 5, 20, 50 ili 100 μM. Ki – intaktna kontrola (netretirane stanice); Ke – kontrola uz dodatak EtOH u koncentraciji 5 μL mL^{-1} medija za uzgoj. Statistički značajna razlika u odnosu na Ke (Student *t*-test): $^{a}p<0,001$



Slika 19. Reprezentativni uzorci - histogrami (*Autophagy induction profile*) dobiveni primjenom protočne citometrije i *Muse autophagy LC3-antibody based kit*-a za kontrolne uzorke (Ki i Ke) i HaCaT stanice tretirane resveratrolom (RSV) (5 –100 μM). Ki – intaktne stanice; Ke – kontrola uz dodatak EtOH u koncentraciji 5 μL mL^{-1} medija za uzgoj

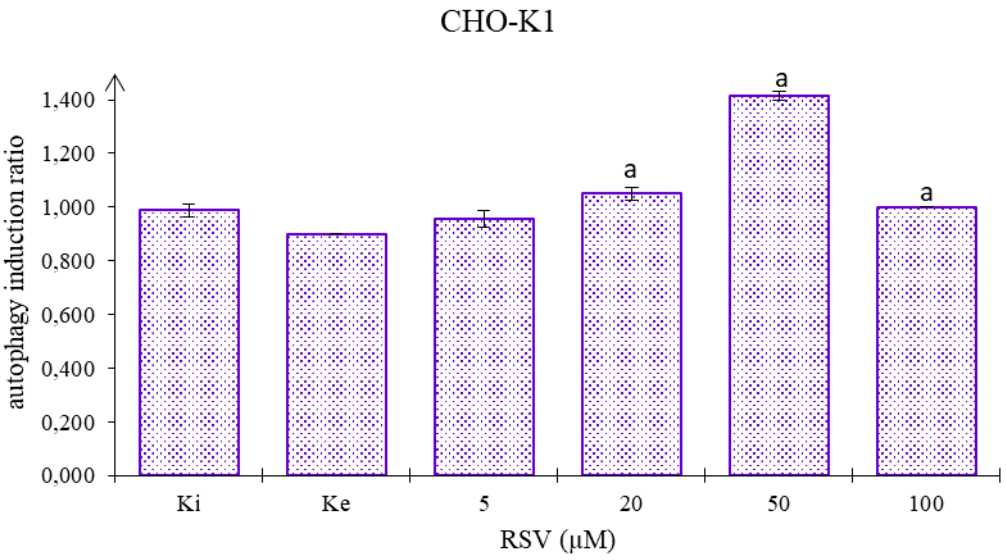
U odnosu na kontrolne uzorke, vidljivo je kako je RSV uzorkovao statistički značajan porast autofagije pri koncentraciji od 20 μM (p<0,001) pri čemu je zabilježen *autophagy induction ratio* od 1,33. Nakon tretmana HaCaT stanica RSV-om pri dozi 5 μM i 50 μM nije određeno statistički značajno odstupanje u udjelu stanica koje odumiru autofagijom u odnosu na kontrolni uzorak, dok je kod koncentracije od 100 μM udio stanica koje odumiru autofagijom bio statistički značajno niži (p<0,001). Iz rezultata se može uočiti kako RSV potiče autofagiju stanica, a vrijednost *autophagy induction ratio* varira ovisno o primijenjenoj koncentraciji.

Predmet istraživanja studije Yamamoto i sur. (2010) bila je indukcija autofagije RSV-om u ljudskim U737 glioma stanicama. Kada su stanice tretirane RSV-om GFP-LC3 obilježeni autofagosomi pojavili su se u citoplazmi. Postotak autofagnih stanica u GFP-pozitivnim stanicama je bio otprilike 90 %. Nadalje, broj GFP-pozitivnih vezikula po stanici dramatično se povećao u stanicama tretiranim s 50 μM RSV-a u usporedbi s onima koji su tretirani s 10 μM RSV-a.

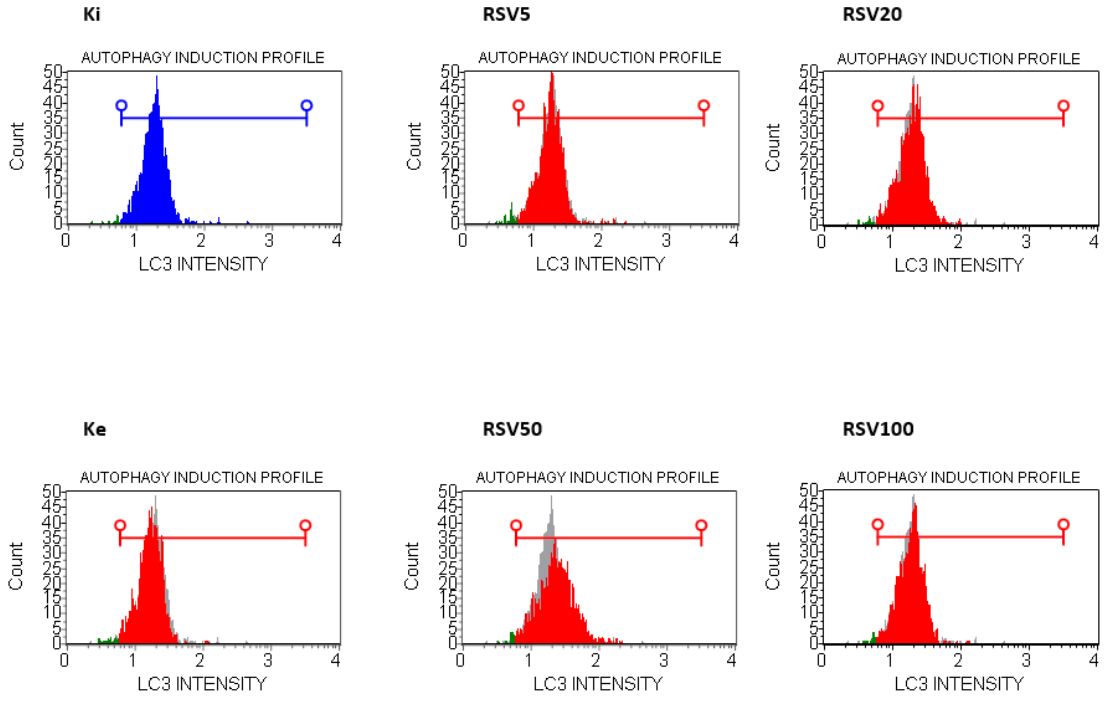
Uloga autofagije inducirane RSV-om u A549 stanicama proučavana je u radu Li i sur. (2022). Koncentracije RSV-a niže od 55 μM aktivirale su zaštitnu autofagiju, dok su koncentracije RSV-a veće od 55 μM stimulirale letalnu autofagiju. RSV je izazvao autofagiju i apoptozu aktiviranjem puta NGFR-AMPK-mTOR u stanicama A549. RSV je povećao količinu NGFR proteina povećanjem ekspresije mRNA i produljenjem životnog vijeka mRNA i proteina. Fosforilacija AMPK i mTOR bila je povišena, odnosno potisnuta nakon tretmana RSV-om.

4.3.4. Autofagija potaknuta resveratrolom u CHO-K1 staničnoj liniji

Rezultati učinka različitih koncentracija RSV-a na indukciju autofagije u CHO-K1 kulturi stanica statistički su obrađeni i prikazani na Slici 20. Reprezentativni uzorci tj. histogrami (*Autophagy induction profile*) dobiveni primjenom protočne citometrije i *Muse autophagy LC3-antibody based kit*-a za kontrolne uzorke (Ki i Ke) i stanice tretirane RSV-om (5 –100 μM) prikazani su na Slici 21.



Slika 20. Evaluacija autofagije u CHO-K1 staničnoj liniji nakon tretmana resveratrolom (RSV) u koncentraciji 5, 20, 50 ili 100 μM. Ki – intaktna kultura (netretirane stanice); Ke – kontrola uz dodatak EtOH u koncentraciji 5 μL mL^{-1} medija za uzgoj. Statistički značajna razlika u odnosu na Ke (Student *t*-test): $^{a}p<0,001$.



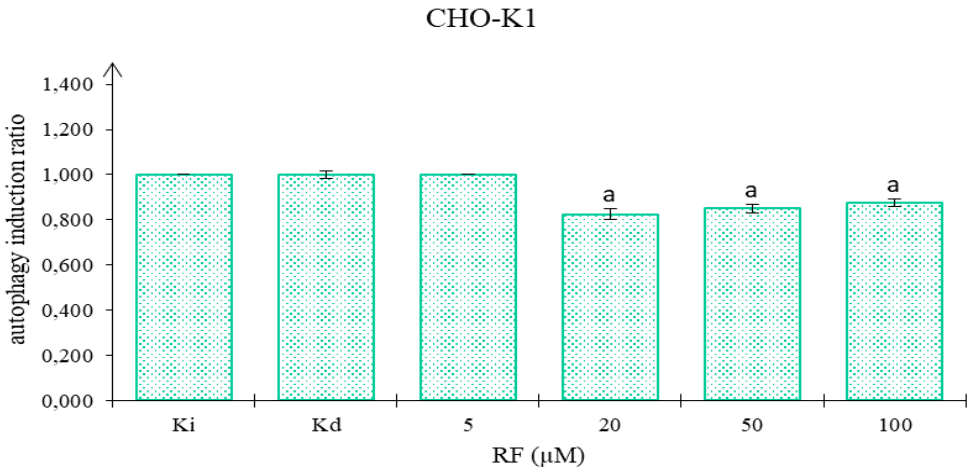
Slika 21. Reprezentativni uzorci - histogrami (*Autophagy induction profile*) dobiveni primjenom protočne citometrije i *Muse autophagy LC3-antibody based kit*-a za kontrolne uzorke (Ki i Ke) i CHO-K1 stanice tretirane resveratrolom (RSV) (5 –100 μM). Ki – intaktne stanice; Ke – kontrola uz dodatak EtOH u koncentraciji 5 μL mL^{-1} medija za uzgoj

Rezultati pokazuju značajan porast u udjelu stanica koje odumiru autofagijom u odnosu na kontrolni uzorak - određen je statistički značajan porast pri koncentracijama RSV-a od 20, 50 i 100 μM (p<0,001). Pri koncentraciji od 50 μM zabilježen je najveći *autophagy induciton ratio* koji iznosi 1,42. Iz rezultata se može uočiti kako RSV potiče autofagiju u CHO-K1 kulturi stanica, a vrijednost *autophagy induction ratio* varira ovisno o primijenjenoj koncentraciji.

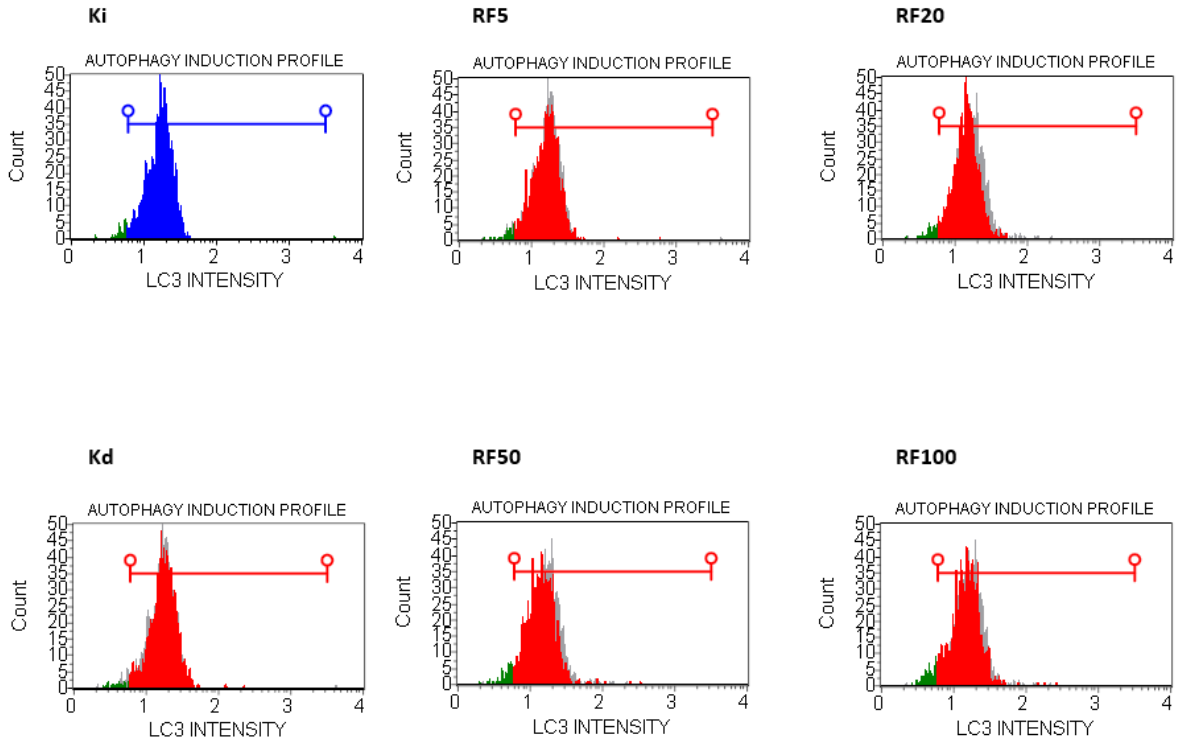
U radu Li i sur. (2022) rezultati su pokazali kako RSV smanjuje stopu preživljavanja stanica ovisno o vremenu i koncentraciji spoja, aktivirajući autofagiju i apoptozu. Uloga RSV-inducirane autofagije povezana je s koncentracijom RSV-a u stanicama A549. RSV je u koncentracijama nižim od 55 μM aktivirao su „zaštitnu autofagiju“, dok je u koncentracijama većim od 55 μM stimulirao „letalnu autofagiju“.

4.3.5. Autofagija potaknuta ferocenskim derivatom resveratrola u CHO-K1 kulturi stanica

Rezultati učinka različitih koncentracija RF-a na indukciju autofagije u CHO-K1 kulturi stanica statistički su obrađeni i prikazani na Slici 22. Reprezentativni uzorci tj. histogrami (*Autophagy induction profile*) dobiveni primjenom protočne citometrije i *Muse autophagy LC3-antibody based kit*-a za kontrolne uzorke (Ki i Kd) i stanice tretirane RF-om (5 –100 μM) prikazani su na Slici 23.



Slika 22. Evaluacija autofagije u CHO-K1 staničnoj liniji nakon tretmana ferocenskim derivatom resveratrola (RF) u koncentraciji 5, 20, 50 ili 100 μM. Ki – intaktna kultura (netretirane stanice); Kd – kontrola uz dodatak DMSO u koncentraciji 5 μL mL^{-1} medija za uzgoj. Statistički značajna razlika u odnosu na Kd (Student *t*-test): ^{a}p<0,001



Slika 23. Reprezentativni uzorci - histogrami (*Autophagy induction profile*) dobiveni primjenom protočne citometrije i *Muse autophagy LC3-antibody based kit*-a za kontrolne uzorke (Ki i Kd) i CHO-K1 stanice tretirane ferocenskim derivatom resveratrola (RF) (5 – 100 μM). Ki – intaktne stanice; Kd – kontrola uz dodatak DMSO u koncentraciji 5 μL mL^{-1} medija za uzgoj

Rezultati pokazuju kako je RF pri dozama ≥ 20 μM uzrokovao statistički značajno (p<0,001) smanjenje udjela stanica koje odumiru autofagijiom u odnosu na kontrolni uzorak. Iz toga proizlazi kako RF pokazuje izmijenjenu biološku aktivnost od djelovanja samog RSV-a koji statistički značajno inducira autofagiju u CHO-K1 kuturi stanica (Slika 20).

Wang i sur. (2019) testirali su *in vitro* i *in vivo* antiproliferativnu ulogu derivata kurkumina - WZ35 u ljudskim kancerogenim stanicama jetre (HCCLM3). Autori su uočili suprotne biološke učinke kurkumina i njegovog derivata. WZ35 je uzrokovao inhibiciju autofagije što je različito u odnosu na djelovanje kurkumina. Derivat inhibira autofagiju uglavnom kroz smanjenje ekspresije modulatora autofagije *Yes-associated proteina* (YAP).

5. ZAKLJUČCI

1. RF je pokazao izmijenjenu biološku aktivnost u odnosu na ishodni spoj – RSV.
2. Učinak RSV-a i RF-a (5-100 μM) na vijabilnost HaCaT stanica određen metodom *Neutral Red* bio je različit. RSV je uzrokovao blagi pad vijabilnosti stanica, dok RF nije djelovao citotoksično te se vijabilnost nije mijenjala u odnosu na kontrolu.
3. Učinak RSV-a na vijabilnost CHO-K1 stanica određen metodom *Neutral Red* rezultirao je blagim padom u staničnoj vijabilnosti pri nižim koncentracijama, no statistički značajnim padom pri koncentracijama 50 i 100 μM (pri 50 μM $p<0,01$, a pri 100 μM $p<0,025$). RF nije imao učinak na promjenu vijabilnosti CHO-K1 stanica što ukazuje na izmijenjenu biološku aktivnost tog spoja u odnosu na RSV.
4. Pri svim ispitanim koncentracijama RSV-a i RF-a (5-100 μM) određen je inhibitorni učinak na proliferaciju HaCaT stanica *Trypan Blue* metodom nakon 48h, tj. utvrđeno je smanjenje proliferacije u odnosu na kontrolni uzorak, s time da je statistički značajno smanjenje primjećeno pri 100 μM koncentraciji RSV-a ($p<0,05$) i pri 50 μM koncentraciji RF-a ($p<0,025$).
5. Statistički značajno ($p<0,025$ - $p<0,001$) smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica tretiranih s RSV (5-100 μM) određeno je metodom *Trypan Blue* kod svih ispitanih koncentracija osim pri najnižoj dozi (5 μM) gdje je prisutan inhibitorni učinak, no ne značajan. S druge strane, inhibitorni učinak RF-a na staničnu proliferaciju i vijabilnost u odnosu na RSV bio je znatno slabiji.
6. Niže IC vrijednosti nakon tretmana stanica RSV-om u obje stanične linije dobivene *Trypan Blue* metodom u odnosu na *Neutral Red* test mogu se objasniti povećanjem broja i veličine lizosoma (u kojima se nakuplja boja *Neutral Red*). RF je pokazao znatno slabiji citotoksični učinak.
7. RSV je pokazao proapoptotsko djelovanje u obje stanične linije. U HaCaT kulturi stanica udio stanica u apoptozi iznosio je 5,4 % u kontrolnom uzorku te porasao do 10,03 % ($p<0,005$) pri koncentraciji od 100 μM. RSV je u dozama ≥20 μM statistički značajno ($p<0,005$ - $p<0,001$) inducirao apoptozu u CHO-K1 staničnoj liniji.
8. RSV potiče autofagiju u HaCaT i CHO-K1 kulturi stanica, a vrijednost *autophagy induction ratio* varira ovisno o primijenjenoj koncentraciji.
9. RF je pri dozama ≥ 20 μM uzrokovao statistički značajno ($p<0,001$) smanjenje udjela stanica koje odumiru autofagijom u odnosu na kontrolni uzorak, što pokazuje

izmijenjenu biološku aktivnost od djelovanja samog RSV-a koji statistički značajno inducira autofagiju u CHO-K1 kuturi stanica.

6. LITERATURA

Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y (2004) Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer Res* **24**, 2783-2840.

Ashkenazi A, Salvesen G (2014) Regulated Cell Death: Signaling and Mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* **30** (1), 337–356. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013226

Atterwill CK (1995) Alternative methods of assessing toxicity. U: O'Hare S, Atterwill CK (ured.) Methods in Molecular Biology, Vol. 43, In Vitro Toxicity Testing Protocols, Humana Press, Totowa/ NJ/ USA, str. 1-9.

Baur JA, Sinclair DA (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* **5** (6), 493-506. http://dx.doi.org/10.1038/nrd2060

Bhat KP, Kosmeder JW, Pezzuto JM (2001) Biological Effects of Resveratrol. *Antioxid Redox Signal* **3** (6),1041-1064. https://doi.org/10.1089/152308601317203567

Biesalski HK, Dragsted LO, Elmadfa I, Grossklaus R, Müller M, Schrenk D i sur. (2009) Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition* **25** (11-12), 1202-1205. https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.023

Cal C, Garban H, Jazirehi A, Yeh C, Mizutani Y, Bonavida B (2003) Resveratrol and Cancer: Chemoprevention, Apoptosis, and Chemoimmunosensitizing Activities. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **3** (2), 77–93. https://doi.org/10.2174/1568011033353443

Candelario-Jalil E, Pinheiro de Oliveira AC, Gräf S, Bhatia HS, Hüll M, Muñoz E i sur. (2007) Resveratrol potently reduces prostaglandin E2production and free radical formation in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. *J Neuroinflammation* **4** (25). https://doi.org/10.1186/1742-2094-4-25

Chen S, Tamaki N, Kudo Y, Tsunematsu T, Miki K, Ishimaru N, Ito HO (2021) Protective effects of resveratrol against 5-fluorouracil-induced oxidative stress and inflammatory responses in human keratinocytes. *J Clin Biochem Nutr* **69** (3), 238-246. https://doi.org/10.3164/jcbn.21-23

Chimento A, De Amicis F, Sirianni R, Sinicropi MS, Puoci F, Casaburi I i sur. (2019) Progress to Improve Oral Bioavailability and Beneficial Effects of Resveratrol. *Int J Mol Sci* **20** (6), 1381. https://doi.org/10.3390/ijms20061381

Chimento A, De Luca A, D'Amico M, De Amicis F, Pezzi V (2023) The Involvement of Natural Polyphenols in Molecular Mechanisms Inducing Apoptosis in Tumor Cells: A Promising Adjuvant in Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* **24** (2), 1680. https://doi.org/10.3390/ijms24021680

Denton D, Nicolson S, Kumar S (2012) Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ* **19**, 87–95. https://doi.org/10.1038/cdd.2011.146

Duan J, Yue W, E J, Malhotra J, Lu SE, Gu J i sur. (2016) In vitro comparative studies of resveratrol and triacetylresveratrol on cell proliferation, apoptosis, and STAT3 and NFκB signaling in pancreatic cancer cells. *Sci Rep* **6** (1), 31672. https://doi.org/10.1038/srep31672

Ellis HM, Horvitz HR (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans. *Cell* **44** (6), 817-829.

Elmore S (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* **35** (4), 495–516. https://doi.org/10.1080/01926230701320337

Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE (1993) Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* **341** (8852), 1103-1104. https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)92472-6

Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L i sur. (2015) Properties of resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. *Oxid Med Cell Longev* **2015**. http://dx.doi.org/10.1155/2015/837042

Giampietri C, Paone A, D'Alessio A (2014) Cell Death. *Int J Mol Sci* **2014**, 864062 https://doi.org/10.1155/2014/864062

Greifová H, Jambor T, Tokárová K, Speváková I, Knížatová N, Lukáč N (2020) Resveratrol attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress in TM3 Leydig cells in vitro. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, Part A* **55** (5), 585-595. https://doi.org/10.1080/10934529.2020.1717899

Hengartner MO, Horvitz HR (1994) *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* **76** (4), 665-676. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90506-1

Holmes-McNary M, Baldwin Jr AS (2000) Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the IkappaB kinase. *Cancer Res* **60** (13), 3477-3483.

Ichimiya T, Yamakawa T, Hirano T, Yokoyama Y, Hayashi Y, Hirayama D i sur. (2020) Autophagy and Autophagy-Related Diseases: A Review. *Int J Mol Sci* **21** (23), 8974. https://doi.org/10.3390/ijms21238974

Inglés M, Gambini J, Miguel MG, Bonet-Costa V, Abdelaziz KM, El Alami M i sur. (2014) PTEN Mediates the Antioxidant Effect of Resveratrol at Nutritionally Relevant Concentrations. *Biomed Res Int* **2014**. http://dx.doi.org/10.1155/2014/580852

Jiang H, Zhang L, Kuo J, Kuo K, Gautam SC, Groc L i sur. (2005) Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. *Mol Cancer Ther* **4** (4), 554–561. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-04-0056

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26** (4), 239-257.

Khan MA, Gahlot S, Majumdar S (2012) Oxidative stress induced by curcumin promotes the death of cutaneous T-cell lymphoma (HuT-78) by disrupting the function of several molecular targets. *Mol Cancer Ther* **11** (9), 1873-1883. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0141

Kirkwood TBL (2005) Understanding the Odd Science of Aging. *Cell* **120** (4), 437-447. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.027

Kmetič I (2023) *Primjena kulture životinjskih stanica u ispitivanju citotoksičkog učinka lindana*. Multimedijski sustav (Merlin). Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Kniewald J, Kmetič I, Gaurina-Srček V, Kniewald Z (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh Hig Rada Toksikol* **56** (2), 195-204.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH i sur. (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16** (1), 3–11. https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150

Labtoo (2023) Cell culture, *ex vivo*, and *in vitro* model services. https://www.labtoo.com/en/page/cell-culture-and-cell-lines-ex-vivo-and-in-vitro-models. Pristupljeno 16. kolovoza 2023.

Li J, Fan Y, Zhang Y, Liu Y, Yu Y, Ma M (2022) Resveratrol Induces Autophagy and Apoptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells by Activating the NGFR-AMPK-mTOR Pathway. *Nutrients* **14** (12), 2413. https://doi.org/10.3390/nu14122413

Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB (2000) Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-κB, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* **164** (12), 6509-6519.

Marđetko S (2015) Učinak resveratrola na vijabilnost CHO (Chinese Hamster Ovary) - K1 stanica uz ili bez tretmana polikloriranim bifenilima (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Mikolaj E (2019) Aromatski profil ekstrakata kadulje dobivenih primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Miletić M, Murati T, Slavica A, Kmetič I (2021) Opstati ili umrijeti – regulacija stanične smrti. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **16** (1-2), 11-20. https://doi.org/10.31895/hcptbn.16.1-2.2

Mizushima N (2005) The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ* **12** (2), 1535-1541. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401728

Mizushima N (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev* **21** (22), 2861-2873. https://doi.org/10.1101/gad.1599207

Moran JF, Klucas RV, Grayer RJ, Abian J, Becana M (1997) Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* **22** (5), 861-870. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00426-1

Murati T, Drenški M, Miletić M, Kmetič I (2022) Molekularni mehanizmi i morfološka obilježja autofagije. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **17** (3-4), 65-71.

Niemann B, Rohrbach S (2016) Metabolically Relevant Cell Biology – Role Of Intracellular Organelles For Cardiac Metabolism. U: Schwarzer M, Doenst T (ured.) The Scientist's Guide to Cardiac Metabolism, Academic Press, Amsterdam/ Boston/ Heidelberg/ London/ New York/

Oxford/Paris/San Diego/San Francisco/Singapore/Sydney/Tokyo, str. 19-38. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802394-5.00003-0

Norbury CJ, Hickson ID (2001) Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41** (1), 367–401. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.367

Oh H, Yoon G, Shin JC, Park SM, Cho SS, Cho JH i sur. (2016) Licochalcone B induces apoptosis of human oral squamous cell carcinoma through the extrinsic- and intrinsic-signaling pathways. *Int J Oncol* **48** (4), 1749-1757. https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3365

Olas B, Wachowicz B (2002) Resveratrol and vitamin C as antioxidants in blood platelets. *Thromb Res* **106** (2),143-148. https://doi.org/10.1016/S0049-3848(02)00101-9

Pineda-Ramírez N, Gutiérrez Aguilar GF, Espinoza-Rojo M, Aguilera P (2018) Current evidence for AMPK activation involvement on resveratrol-induced neuroprotection in cerebral ischemia. *Nutr Neurosci* **21** (4), 229-247. https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1284361

Pineda-Ramírez N, Aguilera P (2021) Resveratrol as an inductor of autophagy: is there a unique pathway of activation? *Neural Regen Res* **16** (1), 101. https://doi.org/10.4103/1673-5374.286959

Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V i sur. (2017) Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev* **2017**. https://doi.org/10.1155/2017/8416763

Pyo IS, Yun S, Yoon YE, Choi JW, Lee SJ (2020) Mechanisms of Aging and the Preventive Effects of Resveratrol on Age-Related Diseases. *Molecules* **25** (20), 4649. https://doi.org/10.3390/molecules25204649

Reinisalo M, Kårlund A, Koskela A, Kaarniranta K, Karjalainen RO (2015) Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev* **2015**. https://doi.org/10.1155/2015/340520

Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* **3** (7), 1125–1131. http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.75

Richard N, Porath D, Radspieler A, Schwager J (2005) Effects of resveratrol, piceatannol, tri-acetoxystilbene, and genistein on the inflammatory response of human peripheral blood leukocytes. *Mol Nutr Food Res* **49** (5),431-442. https://doi.org/10.1002/mnfr.200400099

Rocha V, Marques C, Figueiredo JL, Gaio AR, Costa PC, Sousa Lobo Jmi sur. (2017) In vitro cytotoxicity evaluation of resveratrol-loaded nanoparticles: Focus on the challenges of in vitro methodologies. *Food Chem Toxicol* **103**, 214–222. https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.017

Shen HM, Codogno P (2011) Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* **7** (5), 457-465. https://doi.org/10.4161/auto.7.5.14226

Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H i sur. (1998) Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* **273**, 21875–21882. https://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21875

Tang D, Kang R, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Kroemer G (2019) The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res* **29** (5), 347-364. http://dx.doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5

Wang L, Zhu Z, Han L, Zhao L, Weng J, Yang H i sur. (2019) A curcumin derivative, WZ35, suppresses hepatocellular cancer cell growth via downregulating YAP-Mediated autophagy. *Food Funct* **10** (6), 3748-3757. https://doi.org/10.1039/C8FO02448K

Wenzel E, Somoza V (2005) Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol Nutr Food Res* **49** (5), 472-481. https://doi.org/10.1002/mnfr.200500010

Yamamoto M, Suzuki SO, Himeno M (2010) Resveratrol-induced autophagy in human U373 glioma cells. *Oncol Lett* **1** (3), 489-493. https://doi.org/10.3892/ol_00000086

Zini R, Morin C, Bertelli A, Bertelli AAE, Tillement JP (1999) Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp Clin Res* **25** (2-3), 87–97.

Žlabur JŠ, Voća S, Brnčić M, Rimac-Brnčić S (2018) New trends in food technology for green recovery of bioactive compounds from plant materials. U: Grumezescu AM, Holban AM (ured.) Role of Materials Science in Food Bioengineering, Academic Press, London/San Diego/Cambridge, str. 1-36. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811448-3.00001-2

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja BRUNO DOSKOČIL izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

_____

Vlastoručni potpis