

Učinci polifenola i ferocenom modificiranih polifenola na staničnu liniju keratinocita

Supičić, Alen

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:314800>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2024.

Alen Supičić

**UČINCI POLIFENOLA I FEROCENOM
MODIFICIRANIH POLIFENOLA NA
STANIČNU LINIJU KERATINOCITA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za toksikologiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Teute Murati te uz pomoć prof. dr. sc. Ivane Kmetič i dr. sc. Marine Miletić.



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

Posebno se želim zahvaliti izv. prof. dr. sc. Teuti Murati na mentorstvu, strpljenju te pomoći pri izradi ovog diplomskoga rada. Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Ivani Kmetič na pomoći te svim savjetima uz diplomski rad, a i životnim. Veliko hvala dr. sc. Marini Miletić na pomoći pri izradi praktičnoga dijela diplomskoga rada, na svom prenesenom znanju te što je napravila ugodnu atmosferu za rad zbog čega sam uvijek sa zadovoljstvom dolazio u laboratorij.

Najveća zahvala ide mojoj obitelji, posebno roditeljima Denisu i Silvi na konstatnoj podršci, savjetima i pomoći tijekom studija, bez kojih ovo ne bi bilo moguće.

Zahvaljujem se i svojim prijateljima koji su uvijek bili tu za dati dobar savjet, saslušati ili pomoći.

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: Nutricionizam

UČINCI POLIFENOLA I FEROCENOM MODIFICIRANIH POLIFENOLA NA STANIČNU LINIJU KERATINOCITA

Alen Supičić, univ. bacc. nutr.
0058215131

Sažetak: U ovom radu ispitani su *in vitro* učinci 5 – 100 μM resveratrola (RSV) i kurkumina (CRC), kao i ferocenom modificiranih polifenola – derivata resveratrola (RF) i analoga kurkumina (CF) na humane keratinocite (HaCaT). CRC je pokazao najizraženiji citotoksičan učinak (metode *Trypan Blue* i MTT), dok je antiproliferativan učinak CF najmanje izražen ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$). Svi ispitani spojevi smanjili su oksidacijski stres induciran s tBHP (*tert*-butil hidroperoksid), pri čemu je antioksidacijska aktivnost najizraženija za CRC i CF. Analiza stanične smrti protočnom citometrijom pokazala je najveći udio stanica u apoptozi i nekrozi pri tretmanu keratinocita s CRC, dok je *autophagy induction ratio* bio najviši za stanice tretirane sa 100 μM CRC i iznosio je 1,67 ($p < 0,001$). Uvođenje ferocena u strukturu polifenola dovelo je do izmjenjene biološke aktivnosti novosintetiziranih spojeva, pri čemu je njihova citotoksičnost značajno niža u odnosu na RSV i CRC, a antioksidacijska aktivnost zadržana.

Ključne riječi: resveratrol, kurkumin, ferocen, HaCaT, biološka aktivnost

Rad sadrži: 45 stranica, 20 slika, 2 tablice, 88 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Teuta Murati

Pomoć pri izradi: prof. dr. sc. Ivana Kmetič
dr. sc. Marina Miletić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Ivana Kmetič (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Teuta Murati (mentor)
3. izv.prof.dr.sc. Veronika Kovač (član)
4. prof.dr.sc. Irena Landeka Jurčević (zamjenski član)

Datum obrane: 18. prosinac 2024.

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: Nutrition

EFFECTS OF POLYPHENOLS AND FERROCENE-MODIFIED POLYPHENOLS ON KERATINOCYTE
CELL LINE

Alen Supičić, univ. bacc. nutr.
0058215131

Abstract: In this study, the in vitro effects of 5-100 μ M resveratrol (RSV) and curcumin (CRC) as well as ferrocene-modified polyphenols - resveratrol derivatives (RF) and curcumin analogs (CF) - on human keratinocytes (HaCaT) were examined. CRC showed the most pronounced cytotoxic effect (Trypan Blue and MTT methods), while the antiproliferative effect of CF was the least pronounced ($IC_{50} > 100 \mu M$). All tested compounds reduced oxidative stress induced by tBHP (tert-butyl hydroperoxide), with antioxidant activity being most pronounced for CRC and CF. Analysis of cell death by flow cytometry showed the highest percentage of cells in apoptosis and necrosis in keratinocytes treated with CRC, while the autophagy induction ratio was the highest in cells treated with 100 μ M CRC and was 1.67 ($p < 0.001$). The introduction of ferrocene into the polyphenol structures resulted in altered biological activity of the newly synthesized compounds, with their cytotoxicity being significantly lower compared to RSV and CRC, while antioxidant activity was maintained.

Keywords: resveratrol, curcumin, ferrocene, HaCaT, biological activity

Thesis contains: 45 pages, 20 figures, 2 tables, 88 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Teuta Murati, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Ivana Kmetič, PhD, Full professor

Marina Miletić, PhD, Senior scientific assistant

Reviewers:

1. Ivana Kmetič, PhD, Full professor (president)
2. Teuta Murati, PhD, Associate professor (mentor)
3. Veronika Kovač, PhD, Associate professor (member)
4. Irena Landeka Juričević, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: December 18th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. STANIČNA SMRT	2
2.1.1. Autofagij	3
2.1.2. Apoptoza	3
2.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST RESVERATROLA I KURKUMINA	4
2.2.1. Resveratrol	4
2.2.2. Kurkumin	7
2.3. ORGANOMETALNI SPOJEVI	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. MATERIJALI	12
3.1.1. Biološki materijal.....	12
3.1.2. Kemikalije	12
3.1.3. Otopine i puferi	13
3.1.4. Oprema i uređaji	16
3.2. METODE	16
3.2.1. Uzgoj HaCaT stanične linije.....	16
3.2.2. Određivanje vijabilnosti stanica.....	16
3.2.3. Određivanje oksidacijskog stresa.....	18
3.2.4. Detekcija apoptoze protočnom citometrijom	18
3.2.5. Detekcija autofagije protočnom citometrijom.....	19
3.2.6. Obrada podataka.....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. UČINAK RESVERATROLA, FEROCENSKOG DERIVATA RESVERATROLA, KURKUMINA I FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA VIJABILNOST HACAT STANICA POMOĆU METODE <i>TRYPAN BLUE</i>	21
4.1.1. IC vrijednosti za resveratrol, ferocenski derivat resveratrola, kurkumin i ferocenski analog kurkumina određene u kulturi HaCaT stanica <i>Trypan Blue</i> metodom.....	22
4.2. UČINAK RESVERATROLA, FEROCENSKOG DERIVATA RESVERATROLA, KURKUMINA I FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA VIJABILNOST HACAT STANICA POMOĆU METODE MTT	23
4.2.1. IC vrijednosti za resveratrol, ferocenski derivat resveratrola, kurkumin i ferocenski analog kurkumina određene u kulturi HaCaT stanica MTT metodom.....	24
4.3. UČINAK RESVERATROLA, FEROCENSKOG DERIVATA RESVERATROLA, KURKUMINA I FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA STVARANJE REAKTIVNIH KISIKOVIH VRSTA U HACAT STANICAMA	26
4.4. ANALIZA STANIČNE SMRTI APOPTOZOM NAKON TRETMANA HaCaT STANICA RESVERATROLOM, FEROCENSKIM DERIVATOM RESVERATROLA, KURKUMINOM I FEROCENSKIM ANALOGOM KURKUMINA	27

4.4.1. Analiza stanične smrti apoptozom nakon tretmana HaCaT stanica resveratrolom	27
4.4.2. Analiza stanične smrti apoptozom nakon tretmana HaCaT stanica ferocenskim derivatom resveratrola.....	29
4.4.3. Analiza stanične smrti apoptozom nakon tretmana HaCaT stanica kurkuminom .	31
4.4.4. Analiza stanične smrti apoptozom nakon tretmana HaCaT stanica ferocenskim analogom kurkumina	32
4.5. ANALIZA STANIČNE SMRTI AUTOFAGIJOM NAKON TRETMANA HaCaT STANICA KURKUMINOM I FEROCENSKIM ANALOGOM KURKUMINA.....	34
5. ZAKLJUČCI.....	36
6. LITERATURA	38

1. UVOD

Resveratrol (RSV), prirodni polifenol izoliran iz grožđa, stekao je pažnju zbog dokazanih protuupalnih, antioksidacijskih i antitumorskih svojstava. RSV inhibira proliferaciju tumorskih stanica, inducira apoptozu i smanjuje oksidacijski stres (Miki i sur., 2012; Mahyar-Roemer i sur., 2001). Slična svojstva posjeduje i kurkumin (CRC), aktivni sastojak kurkume, koji je prepoznat po svojim protuupalnim i antitumorskim učincima (Maheshwari i sur., 2006). Ovi polifenoli imaju potencijal za terapijsku primjenu u liječenju karcinoma (Shanmugam i sur., 2015; Zhou i sur., 2011), neurodegenerativnih bolesti (Sun i sur., 2010; Chen i sur., 2010) i drugih poremećaja povezanih s oksidacijskim stresom i upalom. Naime, oksidacijski stres igra ključnu ulogu u patogenezi mnogih bolesti, a regulacija stanične smrti može značajno utjecati na razvoj brojnih bolesti. Prema smjernicama Odbora za nomenklaturu stanične smrti (NCCD, engl. *The Nomenclature Committee on Cell Death*) razlikuju se različiti tipovi stanične smrti: nekroza i nekroptoza, autofagija, anoikis, entoza, piroptoza, paraptoza, mitotska katastrofa i dr. (Kroemer i sur., 2009). Polifenoli poput RSV i CRC pokazali su sposobnost regulacije ovih procesa, čineći ih potencijalnim terapijskim sredstvima u liječenju brojnih bolesti (González i sur., 2011).

Sigurnosni profil i dostupnost čine ova dva polifenola prikladnima za primjenu, međutim izazov predstavlja njihova niska bioraspoloživost i brzi metabolizam (Shoba i sur., 1998). Ova ograničenja potaknula su intenzivna istraživanja u području organometalne kemije, koja se bavi sintezom novih organometalnih spojeva. Studije su pokazale da pojedini organometalni spojevi pokazuju bolja farmakokinetička svojstva i izraženiju biološku aktivnost u odnosu na ishodne spojeve. Razumijevanje bioloških mehanizama polifenolnih spojeva i njihovih sintetskih derivata moglo bi pružiti nove smjernice za razvoj učinkovitijih terapijskih pristupa u liječenju bolesti poput raka, neurodegenerativnih poremećaja i bolesti srca.

Cilj ovoga rada bio je ispitati učinak RSV i CRC na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica (humana stanična linija keratinocita) te ih usporediti s učinkom njihovih ferocenom modificiranih spojeva – ferocenskog derivata resveratrola (RF) i ferocenskog analoga kurkumina (CF). Također, praćen je učinak spojeva na oksidacijski stres te staničnu smrt.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. STANIČNA SMRT

Dosadašnje spoznaje ukazuju da stanice umiru ili kada se izgubi funkcija barijere plazma membrane, ili kada se stanice fragmentiraju u manje dijelove bez gubitka integriteta membrane tj. putem apoptoze (Galluzzi i sur., 2015). U vrijeme kada je apoptoza otkrivena (1972. godine), razlikovalo se dva načina stanične smrti: programirana apoptoza naspram slučajne nekroze (Kerr i sur., 1972). Stanice koje odumiru putem apoptoze morfološki i biokemijski karakteriziraju smanjenje volumena stanica i jezgre (piknoza), kondenzacija kromatina i fragmentacija jezgre (karioreksa), stvaranje apoptotskih tjelešaca, itd., dok je nekroza okarakterizirana bubrenjem citoplazme (onkoza) i organela, gubitkom integriteta plazma membrane što rezultira lizom stanica i oslobađanjem unutarstaničnog sadržaja te posljedičnim oštećenjem susjednih stanica. Ubrzo je predložena nova klasifikacija tipova stanične smrti: apoptoza, autofagija (koja je slična apoptozi, ali bez kondenzacije kromatina te uzrokuje vakuolizaciju citoplazme) i nekroza (Schweichel i Merker, 1973). Kako su biokemijske metode napredovale tijekom posljednjih desetljeća, otkriveno je više različitih fenotipova stanične smrti. NCCD, kojeg čini skupina vodećih znanstvenika koji se bave istraživanjem stanične smrti, više puta je preporučio da se svaki (feno)tip stanične smrti evaluira kroz nekoliko biokemijskih testova (Galluzzi i sur., 2015; Kroemer i sur., 2009). Biokemijskim metodama mogu se utvrditi proteini i putevi koji su uključeni u definiranje pojedinog (feno)tipa stanične smrti. Time su postupno otkriveni složeni signalni putevi uključeni u staničnu smrt. Ono što se nekada smatralo nekrozom sada podrazumijeva zbir heterogenih fenotipova. Između različitih fenotipova stanične smrti postoji međusobna komunikacija, a podražaji često induciraju više od jednog fenotipa stanične smrti istovremeno (Galluzzi i sur., 2015).

Biokemijske metode također su omogućile uvid o postojanju dva načina stanične smrti – slučajne stanične smrti i regulirane stanične smrti (Galluzzi i sur., 2015). Slučajna stanična smrt nastupa kada promjene u okolišu stanice premaše mogućnost njene prilagodbe. Niti jedan specifičan protein ili signalni put nije isključivo povezan s ovom vrstom stanične smrti, već umjesto toga dolazi do staničnog kolapsa koji rezultira smrću stanice. S druge strane, regulirana stanična smrt podrazumijeva aktivaciju određenih proteina ili staničnih puteva. Biološki je zanimljivija od slučajne stanične smrti jer proteini uključeni u njene mehanizme mogu imati fiziološki ili patološki značaj. Kao poseban tip regulirane stanične smrti koja se odvija u fiziološkim uvjetima definira se programirana stanična smrt. Nenormalna inhibicija ili aktivacija programirane stanične smrti može rezultirati razvojnim defektima ili patologijama (Fuchs i Steller, 2011).

Prema smjernicama NCCD razlikuju se različiti tipovi stanične smrti: nekroza i nekroptoza, autofagija, anoikis, entoza, piroptoza, paraptoza, mitotska katastrofa i dr. (Kroemer i sur., 2009).

U ovom radu dan je uvid u klasifikaciju, mehanizme i obilježja autofagije i apoptoze.

2.1.1. Autofagija

Autofagija je katabolički intracelularni proces putem kojeg tijelo uklanja nefunkcionalne unutarnje organele, netopive proteine, patogene, pa čak i cijele stanice, obuhvaćajući ih dvostrukom membranskom vezikulom. Vezikula se spaja s lizosomom, formirajući autofagosom, kako bi reciklirala svoj sadržaj. Ovaj proces omogućava stanicama pravilno funkcioniranje i eliminaciju nefunkcionalnih organela i proteina (Rosenfeldt i Ryan, 2009). Autofagija se inducira kao odgovor na nedostatak nutrijenata, kada je razina ATP ograničena ili kada je aktivirana AMP kinaza (Green i Levine, 2014). AMP kinaza također može izravno fosforilirati i aktivirati tumorski supresor p53, koji kontrolira druge ciljane gene, uzrokujući različite ishode poput apoptoze, zaustavljanja staničnog ciklusa i starenja stanica (Lee i sur., 2012). S obzirom na fiziološke funkcije i način prijenosa citoplazmatskog materijala do lizosoma razlikuju se tri oblika autofagije: mikroautofagija, makroautofagija i autofagija posredovana šaperonom. Makroautofagija (u daljnjem tekstu, autofagija) je najviše istražen oblik autofagije (Mizushima, 2007). Glavna svrha autofagije je isporučiti citosolni materijal u lizosome putem autofagosoma, što dovodi do razgradnje npr. proteina koji se razlažu na aminokiseline, a koje se potom mogu koristiti u staničnim procesima neophodnim za preživljavanje stanice u uvjetima nedostatka nutrijenata. Postoji oblik autofagije koji specifično uklanja oštećene organele iz stanica, a naziva se selektivna autofagija, za razliku od opće autofagije koja se inducira u stanicama pod stresnim uvjetima.

2.1.2. Apoptoza

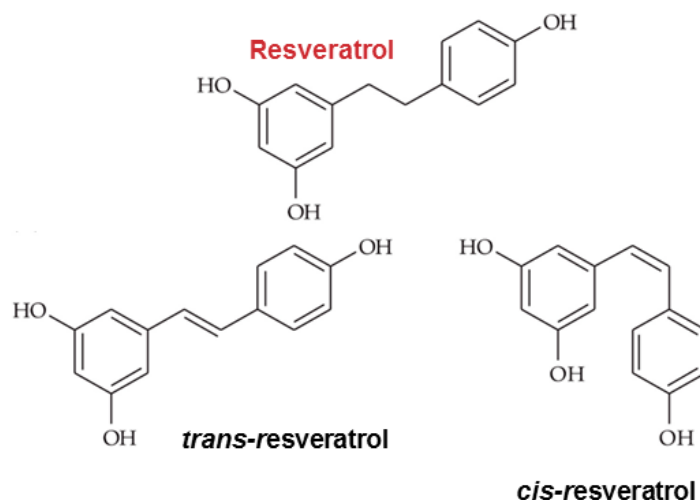
Apoptoza (programirana stanična smrt) je fiziološki proces „samoubojstva“ stanice s ciljem uklanjanja neželjenih, genetski promijenjenih ili oštećenih stanica koje, ako nastave s dijeljenjem, mogu dovesti do štetnih posljedica. Taj tip stanične smrti je ključan u ranom razvoju tkiva, rastu te održavanju stanične homeostaze. Općenito, riječ je o složenom i visoko organiziranom procesu koji slijedi dva glavna puta: unutarnji put posredovan mitohondrijima i vanjski put posredovan receptorima smrti. I fiziološki i patološki podražaji mogu pokrenuti proces apoptoze (Igney i Krammer, 2002). Apoptoza je mehanizam svojstven većini stanica, a može se aktivirati kada je stanica lišena bitnih faktora za preživljavanje ili kao odgovor na stanična oštećenja nastalih zbog utjecaja različitih štetnih podražaja. Osim toga javlja se normalno tijekom razvoja i starenja kao homeostatski mehanizam za održavanje stanične populacije u tkivima. Glavni enzimi koji sudjeluju u procesu apoptoze su cisteinil-aspartatno-specifične endoproteaze ili kaspaze. Kaspaze se sintetiziraju kao neaktivni zimogeni, često nazvani pro-kaspaze (Miletić i sur., 2021). Mnoge vrste podražaja aktiviraju kaspaze, uključujući

nedostatak faktora rasta, ionizirajuće zračenje i izlaganje citokinima. Razlikuju se dva puta aktivacije kaspaza, intrinzični i ekstrinzični put. Ekstrinzični put prima i obrađuje izvanstanične signale koji induciraju smrt i koji djeluju preko receptora na površini stanica. Ligandi koji se vežu na receptore pripadaju skupini čimbenika nekroze tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor*, TNF), stvarajući DISC (engl. *Death-Inducing Signaling Complex*) koji signalizira pokretanje stanične smrti. Slijedi aktivacija kaspaze-3 i -8, što dovodi do apoptoze (Miletić i sur., 2021). Aktivacija intrinzičnoga (mitohondrijskoga puta) potaknuta je oštećenjima uzrokovanim zračenjem ili kemoterapijom. Takav stres uzrokuje permeabilizaciju mitohondrija i oslobađanje apoptogenih proteina iz mitohondrija u citosol što posljedično aktivira kaspazu-3 i -9 (Miletić i sur., 2021). Apoptoza i nekroza su dva procesa koji se mogu odvijati neovisno, uzastopno, ali i istovremeno. U malim dozama, različiti štetni podražaji kao što su toplina, zračenje, hipoksija mogu potaknuti apoptozu, ali ti isti podražaji mogu rezultirati nekrozom pri višim dozama (Elmore, 2007).

2.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST RESVERATROLA I KURKUMINA

2.2.1. Resveratrol

RSV je prvi put izoliran iz korijena bijelog kukurijeka (Gerszon i sur., 2014), a u visokim dozama nalazi se u grožđu i vinu. RSV (3,5,4'-trihidroksi-*trans*-stilben) pripada skupini neflavonoidnih polifenola poznatih kao stilbeni. Njegova kemijska struktura sastoji se od dva fenolna prstena povezana etilenskim mostom. Postoji u dva izomerna oblika: *cis* i *trans* (slika 1). *Trans*-RSV, koji se često koristi u istraživanjima, pojavljuje se kao bijeli kristalni prah s molarnom masom od 228,25 g mol⁻¹, a njegova temperatura taljenja iznosi između 253 i 255 °C. Ovaj oblik je komercijalno dostupan, dok se *cis* oblik može dobiti izlaganjem UV (ultravioletnom) zračenju (Nour i sur., 2012). Također, *trans*-RSV se često koristi zbog svoje stabilnosti i bioaktivnosti, osobito u prehrambenim proizvodima (Zhang i sur., 2021).



Slika 1. Kemijska struktura resveratrola (prema Zhang i sur., 2021)

Zanimanje za RSV kao terapijsko sredstvo započelo je krajem XX i početkom XXI stoljeća, kada je prepoznat kao korisna komponenta vina s kardioprotektivnim učincima (Hung i sur., 2000). RSV je također povezan s tzv. „francuskim paradoksom“ - iako Francuzi prehranom unose velike količine masnoća, incidencija kardiovaskularnih bolesti ne odražava učinke takvog unosa, a to se pripisuje upravo visokom unosu RSV kroz veliku količinu vina koje konzumiraju (Renaud i de Lorgeril, 1992). Istraživanje blagotvornih učinaka RSV započelo je tek kada su Jang i sur. (1997) identificirali da RSV može djelovati kao kemoprotektivno sredstvo u različitim fazama progresije raka. Također je dokazano da RSV može ublažiti simptome mnogih bolesti poput pretilosti (Baur i sur., 2006), dijabetesa (Movahed i sur., 2013), kardiovaskularnih bolesti (Gál i sur., 2023), Alzheimerove bolesti (Porquet i sur., 2014) i mišićne distrofije (Hori i sur., 2011) te je dokazano da poboljšava pamćenje (Witte i sur., 2014).

2.2.1.1. Protuupalna svojstva resveratrola

RSV ima sposobnost smanjenja razine proupalnih citokina poput TNF- α , interleukina (IL)-6, MCP-1 (engl. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) i IL-8 (Wakabayashi i Takeda, 2013), te povećanja razine protuupalnih citokina (Das i Das, 2007) u različitim stanicama, tkivima i krvnoj plazmi. RSV ima sposobnost inhibicije NF- κ B (engl. *nuclear factor- κ B*) signalnog puta, posebice kroz supresiju aktivnosti NF- κ B i I κ B kinaze, te fosforilacije JAK/STAT puteva (Dvorakova i Landa, 2017). NF κ B je transkripcijski faktor koji odgovara na različite stanične podražaje te je važan regulator pro-upalnih puteva zbog svoje uloge u ekspresiji različitih citokina i kemokina. Uz to, RSV može aktivirati SIRT-1 (sirtuin 1), čime se posljedično ispoljavaju protuupalni učinci (Saiko i sur., 2008).

2.2.1.2. Antioksidacijski učinci resveratrola

Osim što modulira upalne procese, RSV može pokazivati korisne učinke na zdravlje smanjujući oksidacijski stres. Oksidacijski stres javlja se kao posljedica neravnoteže između stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i njihove eliminacije (Aranda-Rivera i sur., 2022). Endogeni izvori ROS uključuju mitohondrije, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), endoplazmatski retikulum, ksantin oksidaze, i dr., dok egzogeni ROS može nastati uslijed izloženosti ultraljubičastom (UV) ili ionizirajućem zračenju, kontaminantima i dr. ROS su slobodni radikali poput hidroksilnog (OH \cdot) i superoksidnog (O $_2^{\cdot-}$) aniona, ali i reaktivni neradikalni derivati kao singletni kisik (1 O $_2$) i vodikov peroksid (H $_2$ O $_2$) (Aranda-Rivera i sur., 2022). Prekomjerno nakupljanje ROS može inducirati oksidacijske modifikacije staničnih makromolekula poput proteina, lipida i nukleinskih kiselina (Seyyedebrahimi i sur., 2018). Oksidacijski stres oštećuje te makromolekule i ometa njihovu funkciju, što za posljedicu ima mnoge bolesti koje su povezane uz starenje, uključujući kroničnu upalu, rak, dijabetes,

kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (Liguori i sur., 2018; Reuter i sur., 2010).

RSV ima sposobnost smanjivanja oksidacijskog stresa putem različitih mehanizama. Pokazuje sposobnost neutralizacije slobodnih radikala inhibiranjem stvaranja kisikovih slobodnih radikala putem sprječavanja aktivacije NADPH oksidaza i naknadne proizvodnje ROS (Gerszon i sur., 2014). RSV dovodi do povećane ekspresije mRNA antioksidacijskih enzima poput katalaze i superoksid dismutaze (Inglés i sur., 2014). Općenito, smatra se da RSV štiti od oksidacijskog stresa smanjenjem proizvodnje ROS i reaktivnih dušikovih vrsta (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS), direktnim hvatanjem slobodnih radikala, poboljšanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima i promicanjem antioksidacijskih molekula putem različitih signalnih puteva (González-Garzón i sur., 2023). Istraživanja su pokazala da RSV smanjuje oksidacijski stres zahvaljujući sposobnosti hvatanja slobodnih radikala putem fenolnih hidroksilnih skupina. Konkretno, njegove tri fenolne skupine omogućuju učinkovitu donaciju vodikovih atoma, čime neutraliziraju ROS, te se posljedično smanjuju oksidacijska oštećenja na molekulama lipida, proteina i DNK (Gu i sur., 2021).

2.2.1.3. Uloga resveratrola u procesima starenja

Starenje je sveprisutan biološki proces koji dovodi do progresivnog i nepovratnog opadanja fizičkih funkcija u svim organskim sustavima, izazvan nakupljanjem oštećenja kao odgovor na razne stresore. Starenje stanica karakterizira porast ROS, oštećenja DNK te nakupljanje nefunkcionalnih organela, oksidiranih proteina i lipida. Ovi čimbenici zajedno doprinose postupnom smanjenju normalne stanične funkcije i razvoju bolesti povezanih sa starenjem (Guo i sur., 2022). Starenje je jedan od vodećih faktora rizika za većinu kroničnih bolesti, pa se smatra da će razumijevanje procesa starenja omogućiti identifikaciju terapijskih ciljeva za bolesti povezane sa starenjem te razvoj farmakoloških sredstava koja bi mogla dobiti odobrenje za kliničku upotrebu u budućnosti. Brojna istraživanja pokazala su pozitivne učinke RSV na produljenje životnog vijeka, npr. kod modelnih organizama poput *S. cerevisiae* (Howitz i sur., 2003), *Drosophila melanogaster* (Wood i sur., 2004), te miševa (Baur i sur., 2006). Za RSV je također dokazano da uzrokuje smanjenje upala i oštećenja vaskularnog endotela (Pearson i sur., 2008).

Jedno od mogućih objašnjenja za sposobnost RSV da produlji životni vijek u nekim sustavima je njegova aktivacija NAD-ovisnog histon deacetilaznog enzima SIRT1 (Vetterli i Maechler, 2011). Također, dokazano je i da je RSV regulator ekspresije i aktivnosti drugih gena povezanih sa starenjem, uključujući SIRT3, SIRT4, Forkhead box O (FOXO1, FOXO3a) (Das i sur., 2010). Istraživanja su pokazala da RSV može imati učinke slične inzulinu, smanjujući razinu glukoze u krvi i lipida kod štakora s induciranim dijabetesom (Thirunavukkarasu i sur., 2007). RSV štiti kardiovaskularni sustav povećanjem ekspresije endotelne sintaze dušikovog oksida (eNOS),

koja je odgovorna za zaštitu kardiovaskularnog integriteta (Wallerath i sur., 2002). Potvrđen je pozitivan učinak RSV u borbi protiv neurodegenerativnih bolesti, uključujući Alzheimerovu i Parkinsonovu bolest (Sun i sur., 2010). Također, može prevenirati agregaciju trombocita, trombozu (Delmas i sur., 2005) te upale (González i sur., 2011).

2.2.1.4. Resveratrol i stanična smrt

Cilj brojnih studija bio je ispitati učinak RSV na aktivaciju stanične smrti. Tako je istraživanje koje su proveli Zhou i sur. (2011) pokazalo da tretman humanih stanica raka gušterače (Capan-2 i Colo357) sa 100-200 μM RSV tijekom 12-24 sata uzrokuje značajne pro-apoptotične učinke (povećana ekspresija kaspaze-3, praćena povišenim razinama proteina p53 i Mapk).

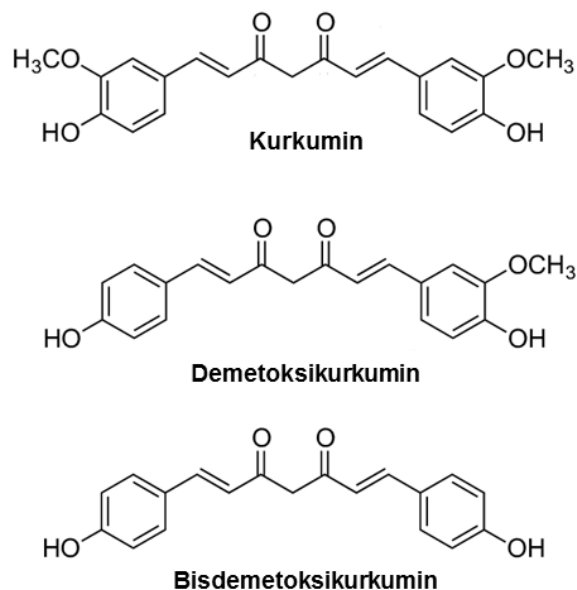
Pri tretmanu humanih HCT116 stanica kolorektalnog karcinoma, Mahyar-Roemer i sur. (2001) dokazali su da je 10-20 μM RSV dovoljan da inducira apoptozu tijekom 48 sati. Slični rezultati su opaženi primjenom humanih staničnih linija kolorektalnog karcinoma (HT-29 i COLO 201) tretiranih s 25-150 μM RSV tijekom 24-72 sata (Miki i sur., 2012). Istraživanja sugeriraju da RSV blokira mTOR (engl. *the mammalian target of rapamycin*) signalni put putem aktivacije AMPK (engl. *AMP-activated protein kinase*), uzrokujući inhibiciju mTOR-a i time aktivaciju autofagije (Liu i sur., 2010).

2.2.2. Kurkumin

Kurkumin (1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion; CRC) (slika 2), također poznat kao diferuloilmetan, prirodni je polifenol dobiven iz korijena višegodišnje biljke kurkume (*Curcuma longa* L.), zajedno s dva druga kurkuminoida, demetoksikurkuminom (DMC) i bisdemetoksikurkuminom (BDMC). Stoljećima se kurkuma koristila u Ayurvedskoj medicini za liječenje niza poremećaja, poput respiratornih tegoba, anoreksije, otvorenih rana, infekcija, upala i različitih kožnih oboljenja. Osim toga, dobro je poznata po upotrebi u prehrambenim pripravcima i kozmetičkim proizvodima. CRC ima molekulska formulu $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$ i molekulska težinu od $368.37 \text{ g mol}^{-1}$. Komercijalno dostupni CRC sastoji se od 77 % CRC, 17 % DMC-a i 3 % BDMC-a (Goel i sur., 2008).

Zbog svoje dvostruke uloge kao spoja koji sprječava inicijaciju tumora i supresora progresije tumora, CRC i njegovi analozi sve su češće predmet istraživanja u onkologiji (Duvoix i sur., 2005). Sigurnosni profil i dostupnost za dugotrajnu upotrebu čine CRC prikladnim za primjenu, dok izazov predstavlja niska bioraspodjelivost kurkuminoida. Slaba apsorpcija i niska topljivost u vodenim otapalima znače da samo mali dio unesenih kurkuminoida prolazi kroz stanične membrane. Farmakokinetičke studije su procijenile da čak i kod primjene ekstremno visokih doza (2 g kg^{-1}) CRC štakorima, koncentracije CRC u plazmi nisu premašile $3,66 \mu\text{M}$, dok su kod ljudi bile gotovo nedetektabilne (Shoba i sur., 1998). Trenutno se provode brojna istraživanja

kako bi se postigla formulacija CRC koja će osigurati razine u tijelu koje mogu imati farmakološki učinak.



Slika 2. Strukturne formule kurkumina, dimetoksikurkumina i bis-dimetoksikurkumina (prema Bezáková i sur., 2014)

2.2.2.1. Protuupalna svojstva kurkumina

CRC djeluje na više molekula i enzima uključenih u upalni odgovor, uključujući prostaglandine (PG), lipoksigenazu (LOX), NFκB i TNF-α. Dokazano je da CRC inhibira sintezu PG, čija se prekomjerna produkcija povezuje s upalima te rakom. CRC ima visoki afinitet prema PGE2 sintazi-1, pri čemu su mikromolarne razine dovoljne da postignu učinkovit inhibitorski učinak (Koeberle i sur., 2009). Također je dokazano da CRC izravno inhibira ekspresiju enzima COX-2, koji je visoko eksprimiran u adenokarcinomima i uključen u pretvorbu arahidonske kiseline u PG (Goel i sur., 2001). Istraživanja su pokazala da CRC cilja LOX-12 i LOX-15, enzime koji su uključeni u sintezu PG i povezani su s upalom (Bezáková i sur., 2014). CRC je pokazao sposobnost supresije transkripcije TNF-α, kao i blokiranja TNF-α signaliziranja *in vitro* i *in vivo*, dodatno doprinoseći njegovom protuupalnom djelovanju (Aggarwal i sur., 2013).

2.2.2.2. Antioksidacijska svojstva kurkumina

CRC ima sposobnost neutraliziranja slobodnih radikala. U istraživanju provedenom na miševima, CRC je značajno povećao aktivnost detoksikacijskih enzima glutation S-transferaze i kinon reduktaze u jetri i bubrezima (Iqbal i sur., 2003). Također, istraživanja su pokazala da CRC aktivira transkripcijski faktor Nrf2 (engl. *Nuclear-factor Erythroid 2-Related Factor 2*), koji potiče ekspresiju različitih antioksidacijskih enzima, uključujući hem oksigenazu-1. Aktivacijom Nrf2, CRC pomaže stanicama u obrani od oksidacijskog stresa i smanjenju oštećenja izazvanih

slobodnim radikalima. CRC stoga može spriječiti karcinogenezu aktiviranjem Nrf2, koji unutar stanice inducira antioksidacijske puteve (Balogun i sur., 2003). Također je dokazano da CRC može zaštititi stanice od oštećenja uzrokovanih lipidnom peroksidacijom na način da unutar bioloških membrana hvata slobodne radikale i tako štiti stanice od oksidacijskih oštećenja (Menon i Sudheer, 2007). CRC pokazuje svoju aktivnost hvatanja radikala djelovanjem kao donor H-atoma. U otopinama s neutralnim ili kiselim pH, CRC pretežno postoji u svom keto obliku i sposoban je donirati H-atom iz fenolne skupine, čime dobiva sposobnost hvatanja ROS (Ak i Gülçin, 2008).

2.2.2.3. Uloga kurkumina u procesima starenja

Učinak unosa CRC intenzivno je istraživao na različitim životinjskim modelima, a rezultati su pokazali da njegova primjena uzrokuje smanjenje oksidacijskog stresa i upale. Primjenom CRC kod miševa značajno se smanjila disfunkcija vaskularnog endotela (Fleenor i sur., 2013). Dodatno, CRC stabilizira membrane lizosoma i smanjuje funkciju lizosomskih kiselih hidrolaza, čime sprječava abnormalno nakupljanje različitih komponenti vezivnog tkiva u endotelu. Kod starijih osoba s dijabetesom i kardiomiopatijom CRC je smanjio hipertrofiju srca koja je povezana sa starenjem putem supresije globalnog transkripcijskog aktivatora p300 (Wongcharoen i Phrommintikul, 2009).

CRC povećava vijabilnost stanica retinalnog pigmentnog epitela regulirajući njihovu proliferaciju, apoptozu i oksidacijski stres (Zhu i sur., 2015). Ovi podaci upućuju na mogućnost primjene CRC kao inovativnog pristupa u liječenju očnih bolesti (npr. suhoća očiju, konjunktivitis, glaukom) (Kumar i sur., 2018).

Disfunkcija cerebrovaskularnog endotela povezana sa starenjem dovodi do kronične cerebralne ishemije, kognitivnih oštećenja i neurodegenerativnih poremećaja (Chen i sur., 2010). Jedan od glavnih patoloških mehanizama ovog učinka je stvaranje ROS. Istraživanja su pokazala da CRC smanjuje stvaranje ROS i potiče opuštanje cerebrovaskularnog endotela, što u konačnici poboljšava cerebrovaskularnu funkciju (Pu i sur., 2013).

2.2.2.4. Kurkumin i stanična smrt

U brojnim studijama istraživao je potencijal CRC u prevenciji mnogih vrsta tumora, uključujući tumor dojke, pluća, prostate, cerviksa, kao i leukemije i limfoma. U stanicama raka dojke, CRC inhibira gene koji su aktivirani putem estrogenog receptora kao i MMP-2 (engl. *Matrix Metalloproteinase 2*, ima uloga u proliferaciji, migraciji i angiogenezi tijekom zacjeljivanja rana i progresije raka), čime se smanjuje invazivni potencijal tumorskih stanica, a time se ograničava njihova sposobnost širenja i stvaranja metastaza (Shao i sur., 2002).

Antikancerogena aktivnost CRC pripisuje se njegovoj sposobnosti inhibiranja onkogenih

signalnih puteva, putem transkripcijskih faktora kao što je NF- κ B te poticanju signalizacije supresora tumora. NF- κ B posreduje u nizu staničnih procesa, kao što su proliferacija, upala i metastaziranje. CRC potiče apoptozu u nizu staničnih linija karcinoma aktiviranjem p53 i inhibiranjem NF- κ B, iako je u stanicama raka pluća pronađeno da CRC inducira apoptozu putem puta neovisnog o p53 (Shanmugam i sur., 2015).

CRC inducira apoptozu u HT-29 stanicama (stanice kolorektalnog adenokarcinoma) smanjujući mitohondrijski potencijal i dovodeći do ruptуре mitohondrijske membrane te oslobađanja citokroma c u citosol, čime se pokreće apoptoza. CRC također povećava razine pro-apoptotskih proteina Bax i Bad, te smanjuje razine anti-apoptotskih proteina Bcl-2 i Bcl-xL, što dovodi do aktivacije efektorske kaspaze-3 (Wang i sur., 2009).

Brojne studije pokazale su indukciju ili inhibiciju autofagije uzrokovanu s CRC u raznim *in vitro* i *in vivo* modelima. Molekularni mehanizmi kojima CRC inducira autofagiju su raznoliki. Mnogi signalni putevi aktiviraju se u različitim tumorskim stanicama, uključujući inaktivaciju PI3K/Akt/mTOR signalnog puta, aktivaciju puta AMPK i ekstracelularno signalizirane kinaze 1 i 2 (ERK1/2) i stvaranje ROS (Aoki i sur., 2007). Dokazano je da CRC inhibira rast U87-MG i U373-MG stanica malignog glioma induciranjem zastoja staničnog ciklusa i autofagije putem inhibicije Akt/mTOR/p70S6K puta i stimulacijom ERK1/2 puta (Aoki i sur., 2007). U humanim A375 i C8161 stanicama melanoma, CRC inhibira njihovu proliferaciju i potiče autofagiju deaktivacijom PI3K/Akt/mTOR/P70S6K puta (Zhao i sur., 2016). Nadalje, izlaganje CRC izazvalo je apoptozu i stimuliralo autofagiju u staničnoj liniji raka želuca MKN-28, što je također povezano s inhibicijom PI3K/Akt/mTOR signalnog puta (Li i sur., 2017).

CRC aktivira AMPK signalni put čime pokreće autofagiju u A549 stanicama humanog adenokarcinoma pluća, selektivno inhibirajući njihov rast bez toksičnih učinaka na normalne plućne fibroblaste IMR-90 (Xiao i sur., 2013). Istraživanje Mosieniaka i sur. (2012) pokazalo je da CRC potiče autofagiju u HCT116 stanicama (stanice humanog kolorektalnog karcinoma), što dovodi do staničnog starenja praćenog stvaranjem autofagosoma i povećanom ekspresijom proteina LC3-II. Nadalje, autofagija i apoptoza zabilježeni su u MCF-7 stanicama raka dojke tretiranih s CRC kao rezultat povećane ekspresije Beclin-1 (Akkoç i sur., 2015).

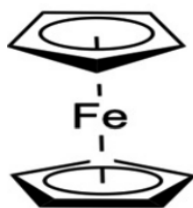
2.3. ORGANOMETALNI SPOJEVI

Organometalni spojevi su metalni kompleksi organskih spojeva. Posjeduju veću raznolikost stereokemije u usporedbi s organskim spojevima, s rasponom od linearnih do oktaedarskih struktura. Metalni atomi u njihovoj strukturi su u niskom oksidacijskom stanju, bez naboja, kinetički stabilni i visoko lipofilni. Organometalni spojevi pružaju obilje mogućnosti za stvaranje novih kategorija farmaceutskih spojeva, potencijalno pokazujući jedinstvene mehanizme djelovanja specifične za metale (Gasser i sur., 2011).

Organometalni spojevi koji se koriste u medicinske svrhe sadrže Fe, Ru, Co, Zr, Pt, Ti, V, Nb i Mo. Među njima, spojevi platine su najčešće korišteni. Usprkos velikom uspjehu, spojevi platine imaju dvije glavne nuspojave: neučinkovitost protiv tumora otpornih na platinu i ozbiljne nuspojave poput nefrotoksičnosti. Zbog specifične kemijske strukture kompleksa platine, postoje ograničene mogućnosti za racionalne modifikacije koje bi povećale specifičnost za tumor i smanjile neželjene nuspojave (Gasser i sur., 2011).

Nasuprot tome, ferocen ima manje nuspojave. Povijesno gledano, terapijski potencijal ferocena proučavan je jer je to bila prva organometalna tvar za koju su zabilježeni antiproliferativni učinci (Ornelas, 2011).

Ferocen (Slika 3) je prvi put identificiran 1951. godine od strane Woodwarda i suradnika (Görmen i sur., 2010). Kasnije su Görmen i njegovi suradnici, odredili preciznu strukturu ovog spoja te ga nazvali ferocenom zbog njegove sličnosti s benzenom. Moderna organometalna kemija razvila se kao rezultat razjašnjenja strukture ferocena, što je bilo značajno otkriće u povijesti kemije. Danas termini poput „sendvič spojevi” i „metaloceni” opisuju znatno širi raspon spojeva koji sadrže različite metale, uključujući ferocen i njegove derivate.



Slika 3. Strukturna formula ferocena (Jagdale i sur., 2024)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biološki materijal

U istraživanju je korištena humana stanična linija keratinocita (HaCaT) koja raste u monosloju.

3.1.2. Kemikalije

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM-HG) (minimalni esencijalni medij s L-glutaminom, $C_3H_3NaO_3$, $NaHCO_3$ i 4500 mg L^{-1} glukoze), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
<i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS – fetalni goveđi serum), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
0.25 % tripsin – EDTA, GIBCO, SAD
resveratrol (RSV), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
ferocenski triacilni derivat resveratrola (RF), sinteza provedena u Laboratoriju za organsku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta (slika 4)
kurkumin (CRC), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
ferocenski diketonski analog kurkumina (CF), sinteza provedena u Laboratoriju za organsku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta (slika 5)
MTT (engl. <i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
boja tripan plavo (engl. <i>Trypan Blue</i>), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
apsolutni etanol, Kemika, Zagreb, Hrvatska
DMSO (dimetilsulfoksid), Kemika, Zagreb, Hrvatska
Guava ICF (engl. <i>Instrument cleaning fluid</i>), Millipore, Merck, Darmstadt, Njemačka
<i>Muse® Autophagy LC3-antibody based kit</i> , kat. broj MCH 200109, Luminex, Austin, Texas, SAD
<i>Muse® Annexin V & Dead Cell Assay kit</i> , kat. broj MCH 100105, Luminex, Austin, Texas, USA
<i>DCFDA/H₂DCFDA – Cellular ROS Assay Kit</i> (ab113851), Abcam, Cambridge, UK
PBS (engl. <i>Phosphate Buffer Saline</i>) pufer
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
destilirana voda (dH_2O)

3.1.3. Otopine i puferi

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 ₂ O	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 ₂ O	103,79
L-treonin	95
L-triptofan	16
L-valin	94
vitamini	
D- ½Ca pantotenska kiselina	4
folna kiselina	4
kolin klorid	4
<i>myo</i> -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 ₂ O	0,1
MgSO ₄	97,67
KCl	400
NaHCO ₃	3700
NaCl	6400

Na ₂ HPO 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 ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
dH ₂ O	do 1000 mL

0,4 %-tna otopina Trypan Blue

Trypan Blue	0,08 g
PBS pufer	20 mL

- profiltrirati

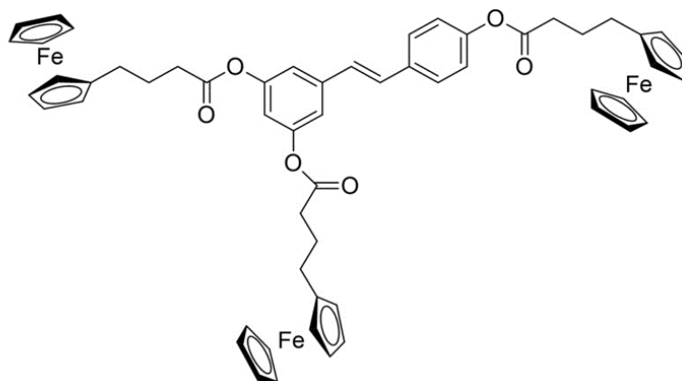
MTT stock otopina

MTT	25 mg
PBS pufer	5 mL

- sterilno profiltrirati

Ishodna otopina RSV	
RSV	13,6944 mg
DMSO	3 mL
pripremljene su otopine RSV-a tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija od 2,5; 5, 20, 50, 100 µM	

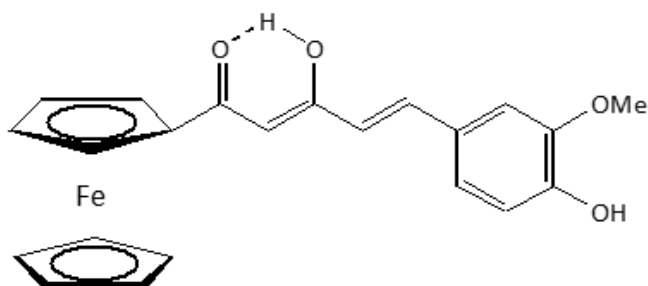
Ishodna otopina RF	
RF	59,4348 mg
DMSO	3 mL
pripremljene su otopine RF tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija od 2,5; 5, 20, 50, 100 µM	



Slika 4. Ferocenski triacilni derivat resveratrola (RF)

Ishodna otopina CRC	
CRC	22,1028 mg
DMSO	3 mL
Pripremljene su otopine CRC tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija 2,5; 5, 20, 50, 100 μ M	

Ishodna otopina CF	
CF	24,2544 mg
DMSO	3 mL
Pripremljene su otopine CF tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija 2,5; 5, 20, 50, 100 μ M	



Slika 5. Ferocenski diketonski analog kurkumina (CF)

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) HMC SafeGUARD Pro 1200, HMC Europe, Njemačka
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
<i>Guava</i> [®] <i>Muse</i> [®] <i>Cell Analyzer</i> , Luminex, SAD
Vibracijska mješalica, Tehnica Železniki, Slovenija
Microplate Reader Infinite 200 PRO, TECAN, Austrija
centrifuga Centric 322A, Tehnica Železniki, Slovenija
hladnjak -80 °C, New Brunswick Scientific, UK

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj HaCaT stanične linije

Stanice humanih keratinocita (HaCaT stanična linija) uzgajaju se u monosloju pričvršćene za podlogu za rast. Proces se provodi u T-bocama unutar inkubatora u kontroliranim uvjetima - temperaturi od 37 °C, 5 % ugljikovog dioksida i 95 % zraka. Tijekom subkultivacije osiguravaju se sterilni uvjeti radom u laminaru, dok se gustoća i morfologija stanica redovito prate inverznim svjetlosnim mikroskopom. Prije subkultivacije uklanja se stari medij, a stanice, zbog njihove adhezivnosti, trebaju biti odvojene od podloge upotrebom otopine tripsina. U početku se dodaje 1 mL tripsina kako bi se uklonili ostaci seruma, koji sadrži inhibitor enzima. Nakon toga dodaje se dodatnih 1 mL tripsina, a T-boca se stavlja u inkubator na 5–10 minuta radi odvajanja stanica od podloge. Kada se stanice odvoje od površine T-boce, dodaje se 9 mL medija za uzgoj obogaćenog s 10 % FBS, čime se zaustavlja aktivnost tripsina i omogućuje resuspendiranje stanica pipetiranjem. Broj stanica određuje se pomoću Fuchs-Rosenthalove komorice, brojanjem pod svjetlosnim mikroskopom (poglavlje 3.2.2.1.). Na temelju dobivenog broja izračunava se volumen stanične suspenzije potreban za postizanje željene koncentracije stanica (2×10^5 stanica mL⁻¹ medija za uzgoj) te se dodatkom svježeg medija nastavlja uzgoj stanične linije.

3.2.2. Određivanje vijabilnosti stanica

Kako bi se istražio učinak RSV, RF, CRC i CF na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica, provedene su metode *Trypan Blue* (poglavlje 3.2.2.1.) i MTT (poglavlje 3.2.2.2.).

3.2.2.1. Trypan Blue metoda

Trypan Blue je molekula mase oko 960 Daltona koja ulazi isključivo u stanice s oštećenim membranama. Prilikom određivanja stanične vijabilnosti metodom *Trypan Blue* prati se integritet stanične membrane kao indikator vijabilnosti stanica.

Kako bi se odredio učinak RSV, RF, CRC i CF na proliferaciju HaCaT stanica *Trypan Blue* metodom, u jažice 6-*well* ploča naciepljuje se po 4 mL stanične suspenzije u koncentraciji 2×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj te se ploče smještaju u inkubator. Nakon 24 sata stanice se tretiraju s 10 μL otopine RSV, RF, CRC ili CF kako bi se u mediju za uzgoj postigle koncentracije od 5, 20, 50 i 100 μM . Proliferacija stanica određena je 48 sati nakon tretmana spojevima metodom *Trypan Blue* na način da se iz jažica uklonio medij za uzgoj, a stanice odvojile od površine T-boce dodatkom 0,5 mL tripsina. Djelovanje tripsina inhibirano je dodatkom 0,5 mL medija za uzgoj. Iz stanične suspenzije uzima se 20 μL uzorka kojem se dodaje 20 μL *Trypan Blue* otopine. Potom se 20 μL obojenog uzorka stavlja na Fuchs-Rosenthalovu komoricu te se stanice broje pod svjetlosnim mikroskopom. Žive stanice ostaju neobojane, dok mrtve stanice postaju plavo obojane. Fuchs-Rosenthalova komorica sastoji se od 16 kvadrata; broje se stanice u 4 središnja kvadrata, pri čemu se u svakom kvadratu broje sve stanice unutar njega, uključujući stanice na donjem i desnom rubu, kako bi se izbjeglo ponovno brojanje istih stanica. Površina svakog kvadrata komorice iznosi 0,0625 mm^2 , a dubina je 0,2 mm. Broj živih stanica u uzorku (st mL^{-1}) izračunava se množenjem prosječnog broja živih stanica izbrojenih u 4 središnja kvadrata s 10^4 . Ova metoda omogućava jednostavnu i brzu procjenu stanične vijabilnosti, pružajući uvid u postotak živih naspram mrtvih stanica u uzorku, što je ključno za analizu učinaka različitih tretmana na stanice i praćenje njihovog odgovora kroz vrijeme.

3.2.2.2. MTT metoda

Tetrazolijeva sol MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrN}_5\text{S}$) je tvar žute boje topljiva u vodi (Grela i sur., 2018). U žive stanice MTT ulazi putem endocitoze, gdje ga mitohondrijske dehidrogenaze, prvenstveno sukcinat dehidrogenaza, reduciraju u ljubičaste kristale formazana. Kristali formazana se otapaju dodatkom organskog otapala, najčešće DMSO. Redukcija MTT u formazan odvija se isključivo u aktivnim mitohondrijima, stoga, sa smrću stanice, nestaje i mogućnost pretvorbe MTT u formazan (Ghasemi i sur., 2021). Kako bi se odredio učinak polifenola i njihovih ferocenskih derivata/analogia na proliferaciju HaCaT stanica MTT metodom, u jažice 96-*well* ploča naciepljuje se po 100 μL stanične suspenzije u koncentraciji $2,5 \times 10^5$ stanica mL^{-1} medija za uzgoj s dodatkom RSV, RF, CRC i CF u koncentracijama od 5 – 100 μM . Nakon 48 h inkubacije na 37 °C, vijabilnost stanica određuje se primjenom MTT metode.

Postupak započinje dodavanjem 10 μL otopine MTT u jažice ploče s uzgojenim stanicama, a

postupak se provodi u laminaru. Ploče se potom inkubiraju na 37 °C u kontroliranim uvjetima. Nakon trosatne inkubacije, otopina MTT se uklanja iz jažica. Kristali formazana se potom otapaju u DMSO, u volumenu jednakom onome u kojem su stanice bile naciepljene (100 µL). Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri 540 nm u odnosu na slijepu probu.

3.2.3. Određivanje oksidacijskog stresa

Jedna od uobičajenih metoda za kvantifikaciju ROS u stanicama je DCFH-DA metoda. Mjerenje ROS provedeno je korištenjem DCFDA/H₂DCFDA – *Cellular ROS Assay* kita, pri čemu se koristi DCFH-DA (2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat), fluorogena boja koja detektira ROS unutar stanica. Princip metode temelji se na ulasku DCFH-DA u stanice gdje se djelovanjem esteraza deacetilira do nefluorescentnog spoja, koji potom prisutni ROS oksidiraju u intenzivno fluorescentni DCF (2',7'-diklorofluorescein). Na 96-*well* ploču tamnog dna naciepljeno je po 100 µL suspenzije HaCaT stanica (2,5×10⁵ stanica mL⁻¹) u DMEM mediju s dodatkom 10 % FBS i odgovarajuće koncentracije odabranog spoja. Otopine spojeva pripremljene su u EtOH (RSV) ili DMSO (RF, CRC, CF) tako da se postignu koncentracije od 2,5; 5, 20 i 50 µM. Nakon inkubacije od 24 sata stanice se ispiru puferom, a potom se dodaje 100 µL DCFH-DA otopine u koncentraciji od 25 µM i inkubiraju 45 minuta na 37 °C. Nakon ponovnog ispiranja puferom, stanice se tretiraju 50 µM tBHP. Slijedi 3-satna inkubacija pri 37 °C, nakon čega se intenzitet fluorescencije mjeri pri $\lambda_{ex/em} = 485/535$ nm. Kontrolni uzorci tretirani su istim volumenom EtOH/DMSO, a kao pozitivna kontrola primjenjuje se tBHP u koncentraciji od 50 µM.

3.2.4. Detekcija apoptoze protočnom citometrijom

Jedna od pouzdanih metoda za detekciju apoptoze temelji se na mjerenju vezanja aneksina V na fosfatidilserin (PS), čime se omogućuje prepoznavanje PS na površini apoptotičkih stanica. U ovoj metodi koristi se fluorescentno obilježen aneksin V zajedno s markerom stanične smrti, 7-amino aktinomycinom D (7-AAD). Aneksin V je protein ovisan o Ca²⁺ koji ima visoku sklonost vezanja za PS, prirodno prisutan na unutarnjoj strani stanične membrane. U ranim stadijima apoptoze PS prelazi na vanjski dio membrane, što omogućava aneksinu V da se veže na njega, označavajući time stanice koje su u ranoj fazi apoptoze. Istovremeno, fluorescentni marker 7-AAD ne ulazi u zdrave stanice s netaknutim membranama, ali lako prodire u stanice u kasnoj apoptozi ili one mrtve, gdje se zadržava. U kasnoj apoptozi dolazi do gubitka integriteta membrane. Ovom metodom može se procijeniti broj živih, mrtvih te stanica u ranoj i kasnoj apoptozi (Worsley i sur., 2022).

Suspenzija HaCaT stanica u koncentraciji 2×10⁴ stanica mL⁻¹ medija s 10 % FBS, u ukupnom volumenu od 4 mL po jažici, naciepljuje se na *multiwell* ploču sa 6 jažica. Nakon 24 sata

inkubacije, stanice se tretiraju s 20 μL RSV, CRC, RF i CF kako bi se postigle koncentracije od 5, 20, 50 i 100 μM u mediju. Nakon što su stanice izložene odabranim koncentracijama spojeva tijekom 48 sati, analiza živih, mrtvih i apoptotičkih stanica provodi se protočnom citometrijom. Postupak započinje uklanjanjem medija za uzgoj iz jažica, nakon čega se na stanice dodaje 500 μL tripsina i ploče se kratko inkubiraju kako bi se stanice odvojile od podloge. U odvojene stanice vraća se 500 μL prethodno uklonjenog medija za uzgoj. Za protočnu citometriju priprema se uzorak miješanjem 100 μL stanične suspenzije sa 100 μL *Guava[®] Muse[®] Annexin V & Dead Cell* reagensa. Uzorak se potom inkubira 20 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićen od svjetlosti. Nakon toga, uzorak se nanosi na *Guava[®] Muse[®] Cell Analyzer*, a rezultati analize očitavaju se izravno na uređaju, prikazujući podatke o postotku živih, mrtvih te stanica u ranoj i kasnoj apoptozi.

3.2.5. Detekcija autofagije protočnom citometrijom

Za analizu stanične smrti autofagijom korišten je *Muse[®] Autophagy LC3-antibody based kit*, koji omogućava kvantitativno mjerenje stanica u autofagiji putem fluorescentnog obilježavanja LC3 proteina. Po 2 mL stanične suspenzije u koncentraciji od 2×10^4 stanica mL^{-1} medija za uzgoj dodaje se u svaku jažicu *multiwell* ploče sa 6 jažica. Nakon početne inkubacije u inkubatoru u trajanju od 24 sata, stanice se tretiraju s 10 μL CRC (otopljenog u DMSO) kako bi se u mediju postigle koncentracije u rasponu od 5 – 100 μM . Isti postupak se ponavlja za CF. Nakon 48 sati inkubacije, protočnom citometrijom uz primjenu *Muse[®] Autophagy LC3-antibody based kit* određuje se *autophagy induction ratio*.

Postupak započinje uklanjanjem medija za uzgoj iz jažica te se stanice ispiru sterilnim PBS (500 μL). U jažice se potom dodaje 500 μL PBS s 5 μL reagensa A (ArA), nakon čega slijedi inkubacija od 4 sata. Po završetku inkubacije, stanice se opet ispiru s PBS i tretiraju s 500 μL tripsina, koji omogućuje njihovo odvajanje od površine *multiwell* ploče. Tripsinizirane stanice se potom prebacuju u epruvete od 2 mL, gdje se dodaje 500 μL PBS za ispiranje. Epruvete se zatim centrifugiraju pri 2500 okretaja min^{-1} , 5 minuta na 4 °C. Nakon uklanjanja supernatanta, stanice se boje s 5 μL Anti-LC3 i 95 μL reagensa B (ArB), pri čemu se ostavljaju u mraku na ledu 30 minuta. Po završetku bojanja, stanice se opet centrifugiraju pri istim uvjetima te se supernatant uklanja, a stanice se ispiru 1 x *Assay Buffer* (1xAB). Još jedno centrifugiranje (2500 okretaja min^{-1} , 5 minuta, 4 °C) omogućuje uklanjanje pufera, nakon čega se stanice resuspendiraju u 200 μL 1xAB. Uzorak se analizira protočnom citometrijom na uređaju *Guava[®] Muse[®] Cell Analyzer*. Prikupljeni podaci i pridruženi softver omogućuju uvid u razinu autofagije, temeljeći procjenu na intenzitetu fluorescencije uzorka u usporedbi s kontrolnim uzorcima.

3.2.6. Obrada podataka

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 pogreškama $S_{\bar{x}}$:

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

N = ukupni broj uzoraka u skupini

x_i = pojedinačne vrijednosti uzoraka

Statistička analiza provedena je Studentovim t -testom izračunavajući t vrijednost prema izrazu:

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

Statistički značajnim smatrane su razlike između skupina za koje je stupanj vjerojatnosti $p < 0,5$.

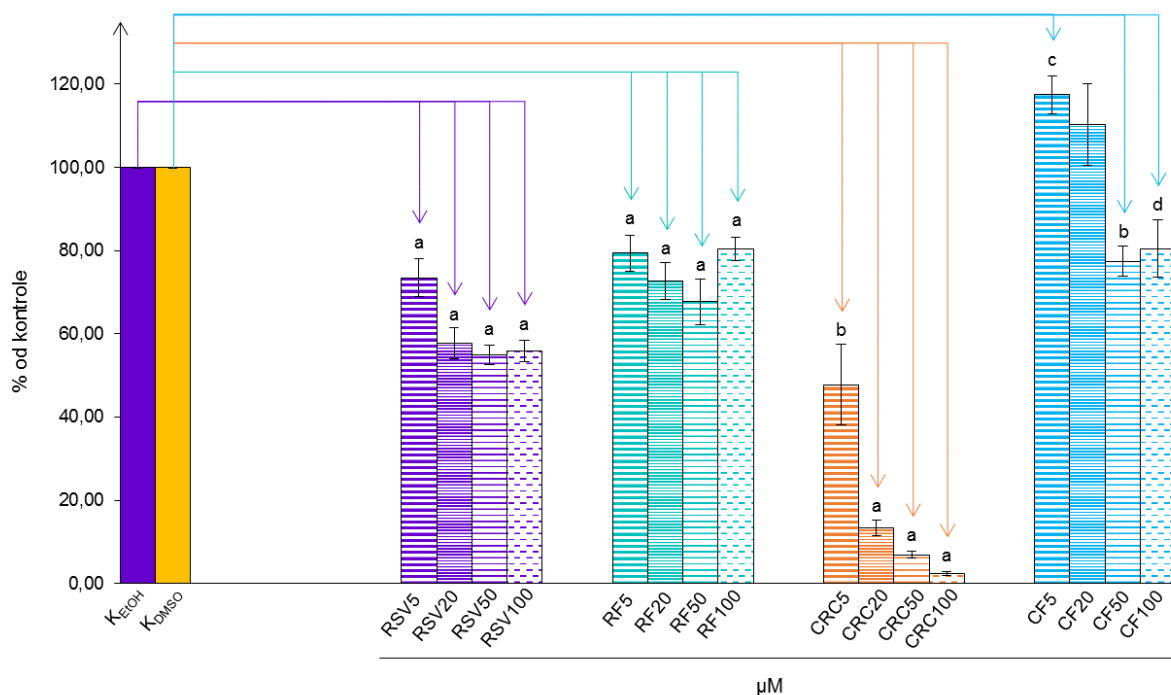
4. REZULTATI I RASPRAVA

Usporedba *in vitro* učinaka polifenola RSV i CRC, kao i ferocenom modificiranih polifenola – RF i CF, na vijabilnost i proliferaciju humanih keratinocita utvrđena je metodom *Trypan Blue* i enzimsko-kolorimetrijskim testom MTT.

Učinak prirodnih i sintetskih spojeva na oksidacijski stres induciran s tBHP određen je korištenjem DCFDA/H₂DCFDA – *Cellular ROS Assay* kita i mjerenjem fluorescencije, dok je analiza stanične smrti nakon tretmana HaCaT stanica s RSV, RF, CRC i CF provedena metodom protočne citometrije.

4.1. UČINAK RESVERATROLA, FEROCENSKOG DERIVATA RESVERATROLA, KURKUMINA I FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA VIJABILNOST HACAT STANICA POMOĆU METODE *TRYPAN BLUE*

Učinak RSV, RF, CRC i CF u koncentracijama od 5 – 100 μM na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica analiziran je metodom *Trypan Blue* 48 sati nakon tretmana te su statistički obrađeni podaci, dobiveni iz 4 do 13 mjerenja po uzorku, prikazani na slici 6.



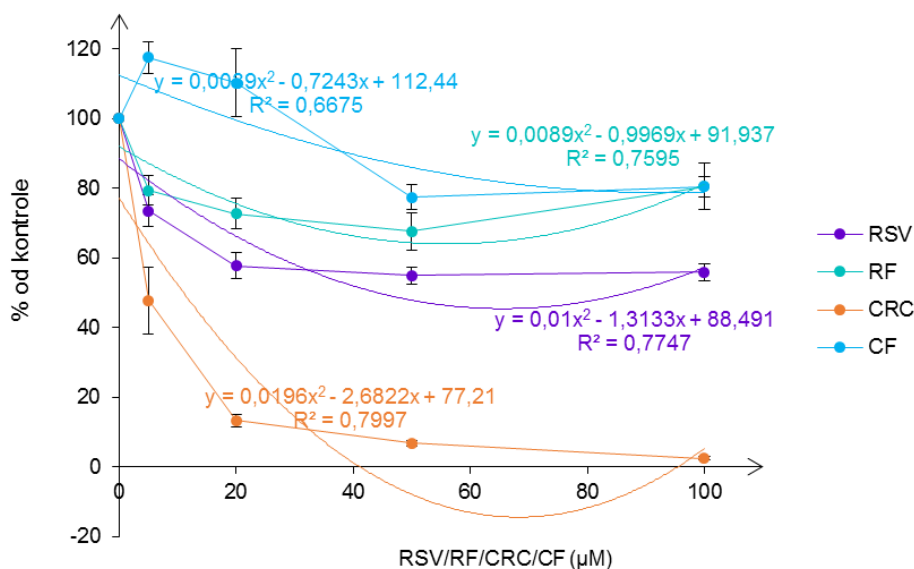
Slika 6. Učinak 5 – 100 μM resveratrola (RSV), ferocenskog derivata resveratrola (RF), kurkumina (CRC) i ferocenskog analoga kurkumina (CF) na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica određen 48 sati nakon tretmana, koristeći metodu *Trypan Blue*. Podaci su prikazani kao postotak preživjelih stanica u odnosu na odgovarajuću kontrolu (K_{EIOH}/K_{DMSO}). Statistički značajna razlika u odnosu na K_{EIOH}/K_{DMSO} (Student *t*-test): ^a*p* < 0,001, ^b*p* < 0,005, ^c*p* < 0,025 i ^d*p* < 0,05

Rezultati su prikazani kao postotak preživjelih stanica u odnosu na kontrolu (stanice tretirane s

EtOH, obzirom da je otopina RSV pripravljena u EtOH – K_{EtOH} ; stanice tretirane s DMSO, obzirom da su otopine RF, CRC i CF pripravljene u DMSO – K_{DMSO}). Rezultati pokazuju statistički značajno smanjenje vijabilnosti stanica ($p < 0,05$ – $p < 0,001$) kod svih ispitanih koncentracija svih spojeva, osim pri tretmanu s CF u koncentracijama 5 i 20 μM , gdje je došlo do povećane proliferacije keratinocita (slika 6).

4.1.1. IC vrijednosti za resveratrol, ferocenski derivat resveratrola, kurkumin i ferocenski analog kurkumina određene u kulturi HaCaT stanica *Trypan Blue* metodom

Učinak različitih koncentracija RSV, RF, CRC i CF na preživljavanje stanica 48 sati nakon tretmana analiziran je metodom *Trypan Blue*. Rezultati ukazuju na pad vijabilnosti stanica s porastom koncentracije RSV, RF, CRC, dok je tretman HaCaT stanica nižim dozama CF (5 i 20 μM) rezultirao izraženijom proliferacijom (slike 6 i 7). Međutim, usporedba učinka RSV i RF pokazuje da RF ima manje izražen citotoksičan učinak, što rezultira većom vijabilnošću stanica u odnosu na RSV. Isti trend može se vidjeti kad usporedimo učinak CRC i CF – ferocenom modificirani analog pokazuje manju citotoksičnost u usporedbi s CRC. Usporedbom sva 4 ispitana spoja vidljivo je da CRC ima najveću citotoksičnost i to pri svim koncentracijama, dok je antiproliferativan učinak CF najmanje izražen.



Slika 7. Proliferacija HaCaT stanica 48 sati nakon tretmana različitim koncentracijama (5 – 100 μM) resveratrola (RSV), ferocenskog derivata resveratrola (RF), kurkumina (CRC) i ferocenskog analoga kurkumina (CF) u odnosu na odgovarajuću kontrolu (K_{EtOH}/K_{DMSO}) određena metodom *Trypan Blue*. Podaci predstavljaju srednju vrijednost \pm standardna pogreška. Jednadžbe se odnose na interpolirane polinomne krivulje s pripadajućim R^2 vrijednostima

Interpolacijom polinomnih krivulja koje optimalno prate izmjerene podatke dobivene su jednadžbe iz kojih su izračunate IC₂₀, IC₅₀ i IC₈₀ vrijednosti te su prikazane u tablici 1. Interpolirane krivulje (slika 7) odabrane su na temelju koeficijenta determinacije (R²), čija je vrijednost što bliža 1 unutar raspona 0 ≤ R² ≤ 1, čime je postignuta optimalna aproksimacija. IC₂₀, IC₅₀ i IC₈₀ vrijednosti označavaju koncentracije ispitivanih spojeva koji uzrokuju 20 %, 50 % i 80 %-tnu inhibiciju staničnog rasta. IC₂₀ za RSV određen na HaCaT stanicama *Trypan Blue* metodom iznosi 6,82 μM, za RF doseže vrijednost od 13,63 μM, dok za CF iznosi 75,40 μM što ukazuje da uvođenje ferocena u strukture ispitivanih polifenola smanjuje citotoksičnost RF i CF. Rezultati pokazuju da su za ferocenom modificirane polifenole određene veće IC vrijednosti u usporedbi s ishodnim spojevima što sugerira na njihovu manju citotoksičnost (slika 7 i tablica 1).

Tablica 1. Koncentracije resveratrola (RSV), ferocenskog derivata resveratrola (RF), kurkumina (CRC) i ferocenskog analoga kurkumina (CF) koje uzrokuju smanjenje vijabilnosti HaCaT stanica za 20 %, 50 % i 80 % nakon 48-satnog tretmana, utvrđene *Trypan Blue* metodom

Trypan Blue	IC vrijednosti /μM				
	HaCaT				
		RSV	RF	CRC	CF
	IC ₂₀	6,82	13,63	n.o.	75,40
	IC ₅₀	44,15	n.o.	11,03	n.o.
IC ₈₀	n.o.	n.o.	26,44	n.o.	

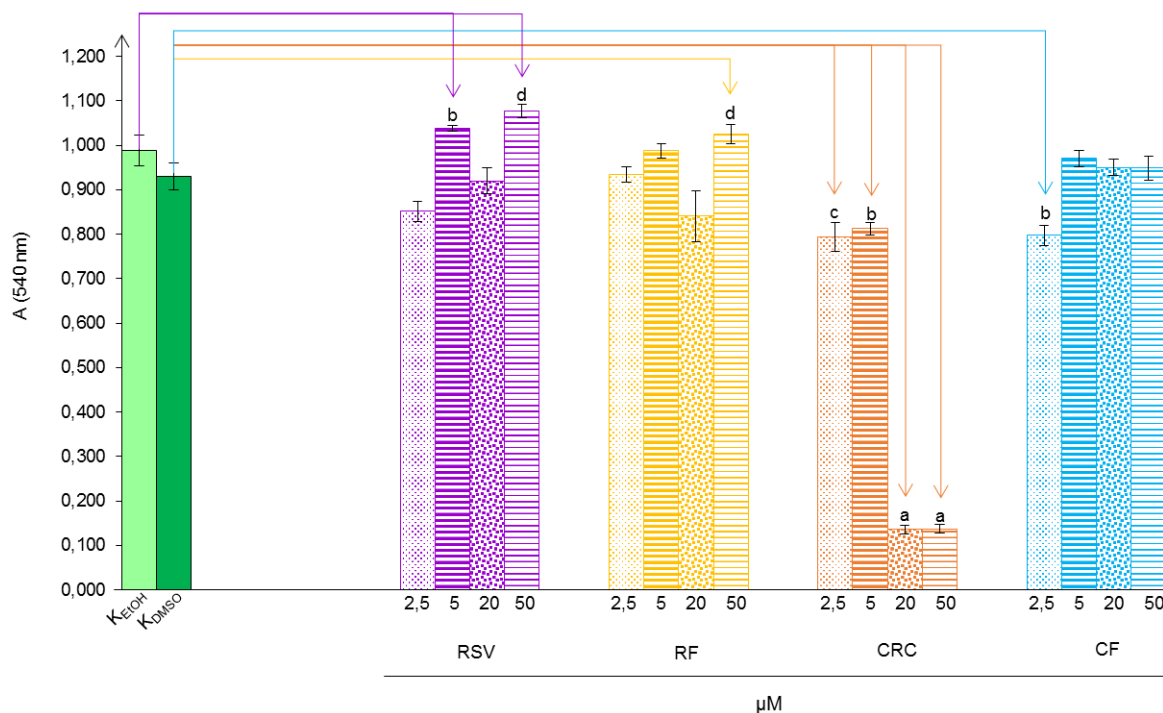
n.o. – nije moguće izračunati iz jednadžbi interpoliranih polinomnih krivulja

4.2. UČINAK RESVERATROLA, FEROCENSKOG DERIVATA RESVERATROLA, KURKUMINA I FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA VIJABILNOST HACAT STANICA POMOĆU METODE MTT

Učinak 2,5 – 50 μM RSV, RF, CRC i CF na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica analiziran je metodom MTT 48 sati nakon tretmana ovim spojevima. Statistički obrađeni rezultati prikazani su na Slici 8 kao srednje vrijednosti apsorbancije pri 540 nm ± standardna pogreška (izračunati iz 4 – 7 mjerenja).

Iz slike 8 može se uočiti da RSV i RF podjednako djeluju na staničnu vijabilnost, dok je CRC u odnosu na CF pokazao znatno izraženiji citotoksičan učinak. RSV je uzrokovao pad vijabilnosti pri koncentracijama od 2,5 μM i 20 μM, a RF pri koncentraciji od 20 μM. Statistički značajan ($p < 0,025 - p < 0,001$) pad vijabilnosti CRC je uzrokovao pri svim ispitanim koncentracijama. CF je uzrokovao pad vijabilnosti samo pri koncentraciji od 2,5 μM ($p < 0,01$), dok je pri ostalim

koncentracijama vijabilnost stanica poboljšana.



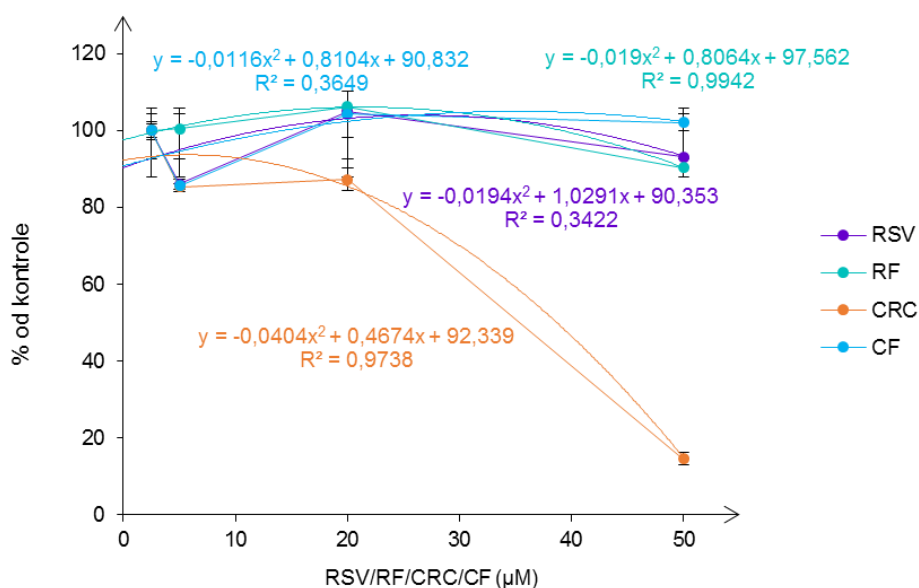
Slika 8. Učinak 2,5 – 50 µM resveratrola (RSV), ferrocenskog derivata resveratrola (RF), kurkumina (CRC) i ferrocenskog analoga kurkumina (CF) na vijabilnost i proliferaciju HaCaT stanica određen 48 sati nakon tretmana, koristeći metodu MTT. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije izmjene na 540 nm ± standardna pogreška. K_{EtOH} - stanice tretirane s 5 µL etanola mL⁻¹ medija za uzgoj (za RSV); K_{DMSO} - stanice tretirane s 5 µL DMSO mL⁻¹ medija za uzgoj (za RF, CRC i CF). Statistički značajna razlika u odnosu na odgovarajuću kontrolu (K_{EtOH}/K_{DMSO}) (Student *t*-test): ^a*p* < 0,001, ^b*p* < 0,01, ^c*p* < 0,025, ^d*p* < 0,05

Liu i sur. (2011) su proveli istraživanje o učinku RSV na vijabilnost HaCaT stanica tretiranih UVA zrakama. Jedna od metoda koju su koristili je bila MTT metoda, a koncentracija RSV korištena u istraživanju iznosila je 45 µM. Ustanovljeno je da RSV pruža zaštitu UVA ozračenih stanica, u usporedbi s ozračenim stanicama koje nisu bile tretirane s RSV. Tretman s RSV, proveden i prije i nakon izlaganja UVA zrakama, značajno je povećao vijabilnost keratinocita. Istraživanje koje su proveli Woźniak i sur. (2021) gdje je promatrana vijabilnost različitih staničnih linija kože, uključujući i HaCaT stanice, pri tretmanu s CRC (5 i 10 µM) pokazalo je blagi pad vijabilnosti HaCaT stanica u odnosu na kontrolu. Ovo istraživanje je također pokazalo blaži učinak CRC u dozama ≤ 5 µM na preživljavanje stanica, dok je pri višim dozama vidljivo značajno citotoksično djelovanje.

4.2.1. IC vrijednosti za resveratrol, ferocenski derivat resveratrola, kurkumin i ferocenski analog kurkumina određene u kulturi HaCaT stanica MTT metodom

Učinak RSV, RF, CRC i CF u koncentracijama 2,5 – 50 µM na preživljavanje keratinocita 48 sati nakon tretmana analiziran je metodom MTT i prikazan na slici 9 kao ovisnost % inhibicije u

staničnom rastu i upotrebljene koncentracije spoja.



Slika 9. Vijabilnost HaCaT stanica 48 sati nakon tretmana različitim koncentracijama (2,5–50 µM) resveratrola (RSV), ferocenskog derivata resveratrola (RF), kurkumina (CRC) i ferocenskog analoga kurkumina (CF) u odnosu na odgovarajuću kontrolu (K_{EtOH}/K_{DMSO}) određena MTT metodom. Podaci predstavljaju srednju vrijednost ± standardna pogreška. Jednadžbe se odnose na interpolirane polinomne krivulje s pripadajućim R² vrijednostima

Rezultati analize vijabilnosti MTT metodom pokazali su najizraženiji citotoksični učinak CRC (slike 8 i 9), dok je antiproliferativan učinak CF bio najmanji, što potvrđuju i izračunate IC₅₀ vrijednosti (tablica 2).

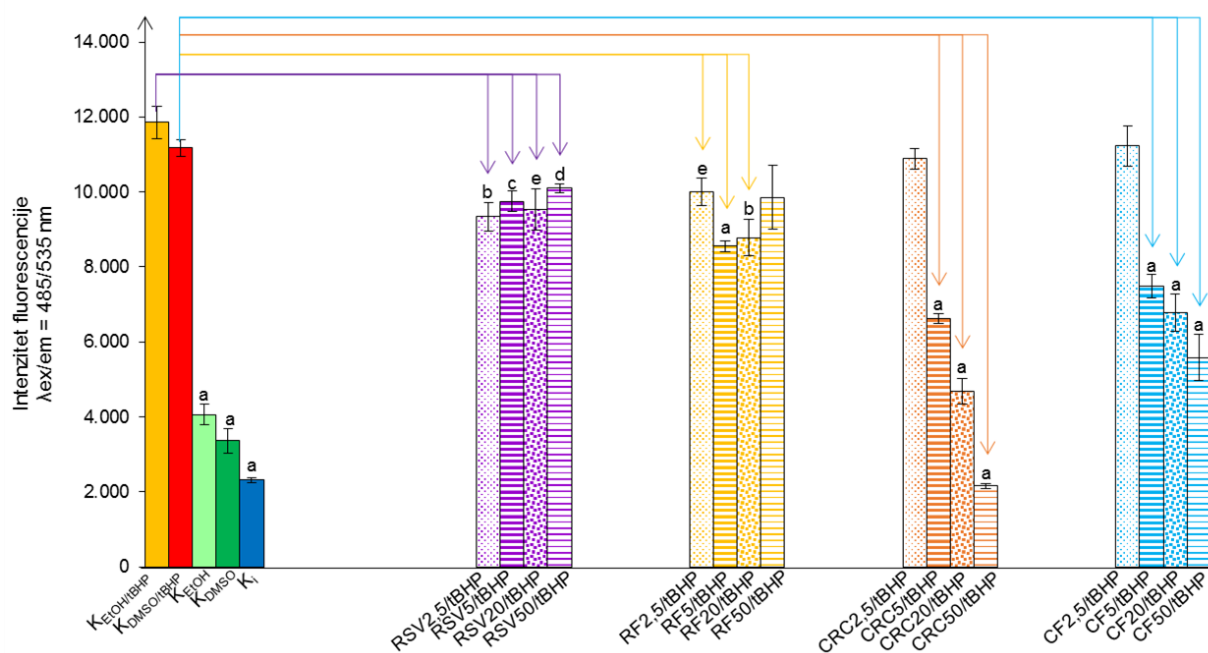
Tablica 2. Koncentracije resveratrola (RSV), ferocenskog derivata resveratrola (RF), kurkumina (CRC) i ferocenskog analoga kurkumina (CF) koje uzrokuju smanjenje vijabilnosti HaCaT stanica za 20 %, 50 % i 80 % nakon 48-satnog tretmana, utvrđene MTT metodom

MTT	IC vrijednosti /µM			
	HaCaT			
	RSV	RF	CRC	CF
IC ₂₀	61,70*	58,30*	24,19	81,34*
IC ₅₀	79,28*	75,57*	38,67	103,78*
IC ₈₀	92,33*	88,55*	48,49	120,53*

*izvan raspona ispitanih koncentracija

4.3. UČINAK RESVERATROLA, FEROCENSKOG DERIVATA RESVERATROLA, KURKUMINA I FEROCENSKOG ANALOGA KURKUMINA NA STVARANJE REAKTIVNIH KISIKOVIH VRSTA U HACAT STANICAMA

U svrhu praćenja učinaka RSV, CRC te njihovih ferocenskih derivata/analog (RF i CF) na intracelularnu razinu ROS s ili bez tretmana stanica s tBHP, korišten je DCFDA/H₂DCFDA – Cellular ROS Assay kit. Svaka koncentracija polifenola/ferocenom modificiranih spojeva ispitana je u 4 do 8 paralela. Na temelju prikaza učinaka RSV, RF, CRC i CF (2.5 – 50 μM) na stvaranje ROS u HaCaT stanicama (slika 10), uočeno je da RSV pri svim ispitivanim koncentracijama značajno smanjuje razinu ROS induciranu s 50 μM tBHP ($p < 0,05$ – $p < 0,005$) za 14,76 – 21,23 % u odnosu na kontrolne stanice (K_{E₁OH/tBHP}).



Slika 10. Učinak 2,5 – 50 μM resveratrola (RSV), ferocenskog derivata resveratrola (RF), kurkumina (CRC) i ferocenskog analoga kurkumina (CF) na razinu ROS (reaktivnih kisikovih vrsta) induciranog s 50 μM tBHP (*tert*-butil hidroperoksid) u HaCaT stanicama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost intenziteta fluorescencije ($\lambda_{ex/em} = 485/535$ nm) \pm standardna pogreška. K_i - netretirane stanice; K_{E₁OH} – stanice tretirane s 5 μL etanola mL⁻¹ medija za uzgoj; K_{DMSO} - stanice tretirane s 5 μL DMSO mL⁻¹ medija za uzgoj; K_{E₁OH/tBHP} - stanice tretirane s 5 μL etanola mL⁻¹ medija za uzgoj te 50 μM tBHP; K_{DMSO/tBHP} - stanice tretirane s 5 μL DMSO mL⁻¹ medija za uzgoj te 50 μM tBHP. Statistički značajna razlika u odnosu na odgovarajući kontrolni uzorak (K_{E₁OH/tBHP} ili K_{DMSO/tBHP}) (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$ ^b $p < 0,005$, ^c $p < 0,01$, ^d $p < 0,025$ i ^e $p < 0,05$

RF je uzrokovao statistički značajno ($p < 0,05$ – $p < 0,001$) smanjenje razine ROS induciranog s tBHP pri svim ispitanim koncentracijama za 10,55 – 23,45 % u odnosu na kontrolne stanice (K_{DMSO/tBHP}), osim 50 μM, pri ostalim koncentracijama je pokazao statistički značajno smanjenje ROS. CRC (5 – 50 μM) je pokazao statistički značajno ($p < 0,001$) smanjene ROS nakon tretmana stanica s tBHP za 40,74 – 80,69 % u odnosu na kontrolni uzorak (K_{DMSO/tBHP}), dok je

pri koncentraciji od 2,5 μM došlo do pada razine ROS, ali taj pad nije bio statistički značajan. Učinak CRC na smanjenje razine ROS bio je najizraženiji u odnosu na preostale ispitane spojeve (slika 10), no ti rezultati se trebaju uzeti s oprezom obzirom na najveći pad vijabilnosti stanica nakon tretmana tim polifenolom (slike 6 i 8). CF je pri koncentracijama 5 – 50 μM uzrokovao značajno ($p < 0,001$) smanjenje ROS induciranog s tBHP za 33,02 – 50,08 % (slika 10).

González-Garzón i sur. (2023) proveli su istraživanje u kojem su jajne stanice ovce tretirane s različitim koncentracijama (0 - 1 μM) RSV. Jajne stanice su zatim oplodene, nastali blastocisti su vitrificirani (postupak zamrzavanja stanica u staklastu čvrstu tvar bez prisutnosti kristalne strukture) na 24 sata te nakon toga zagrijani i obojani sa DCFH-DA bojom kako bi se odredila razina ROS. Rezultati su pokazali smanjenu ($p < 0,05$) proizvodnju ROS ovisno o primjenjenoj dozi. *In vitro* istraživanje iz 2019. godine na RAW264.7 stanicama (mišji makrofazi) koje su proveli Lin i suradnici pokazalo je kako različite koncentracije CRC (0, 5, 10, 20 μM) utječu na stvaranje ROS. Zaključci toga istraživanja upućuju na to da niske i srednje doze CRC mogu povećati sposobnost stanica za eliminaciju ROS, pri čemu je učinak niske doze CRC bio bolji od učinka srednje doze (Lin i sur., 2019).

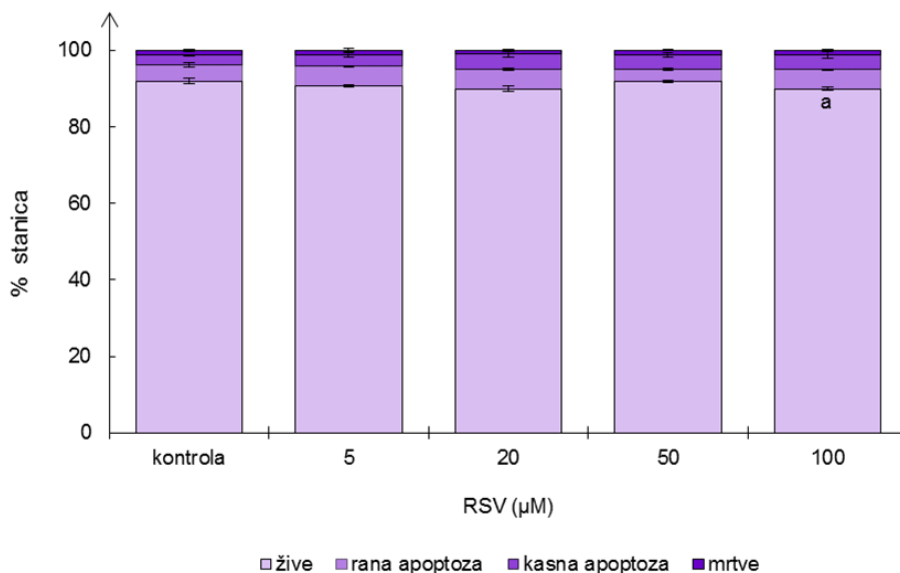
4.4. ANALIZA STANIČNE SMRTI APOPTOZOM NAKON TRETMANA HaCaT STANICA RESVERATROLOM, FEROCENSKIM DERIVATOM RESVERATROLA, KURKUMINOM I FEROCENSKIM ANALOGOM KURKUMINA

Kvantitativna analiza subpopulacija živih, apoptotskih (rana i kasna apoptoza) i nekrotičnih stanica provedena je pomoću *Guava*[®] *Muse*[®] protočnog citometra i *Muse*[®] *Annexin V & Dead Cell Assay* kita. Rezultati su prikazani u reprezentativnim *dot-plot* dijagramima (slike 12, 14, 16, 18) s četiri kvadranta koji klasificiraju stanice prema statusu: u donjem lijevom kvadrantu nalaze se žive stanice (7-AAD (-)/aneksin V (-)), dok su stanice u ranoj fazi apoptoze smještene u donjem desnom kvadrantu (7-AAD (-)/aneksin V (+)). Stanice u kasnoj apoptozi prikazane su u gornjem desnom kvadrantu (7-AAD (+)/aneksin V (+)), dok su mrtve stanice smještene u gornjem lijevom kvadrantu (7-AAD (+)/aneksin V (-)). Također, rezultati tretmana stanica s RSV, RF, CRC i CF nakon 48 sati prikazani su kao postotci živih stanica, mrtvih stanica te stanica u ranoj i kasnoj apoptozi (slike 11, 13, 15, 17).

4.4.1. Analiza stanične smrti apoptozom nakon tretmana HaCaT stanica resveratrolom

Na slici 11 prikazani su udjeli subpopulacija HaCaT stanica – živih, mrtvih, te stanica u ranoj i kasnoj apoptozi – nakon tretmana s različitim koncentracijama RSV od 5 do 100 μM . Iz slike 11 vidljivo je neznatno smanjenje udjela živih stanica s porastom koncentracije RSV. U

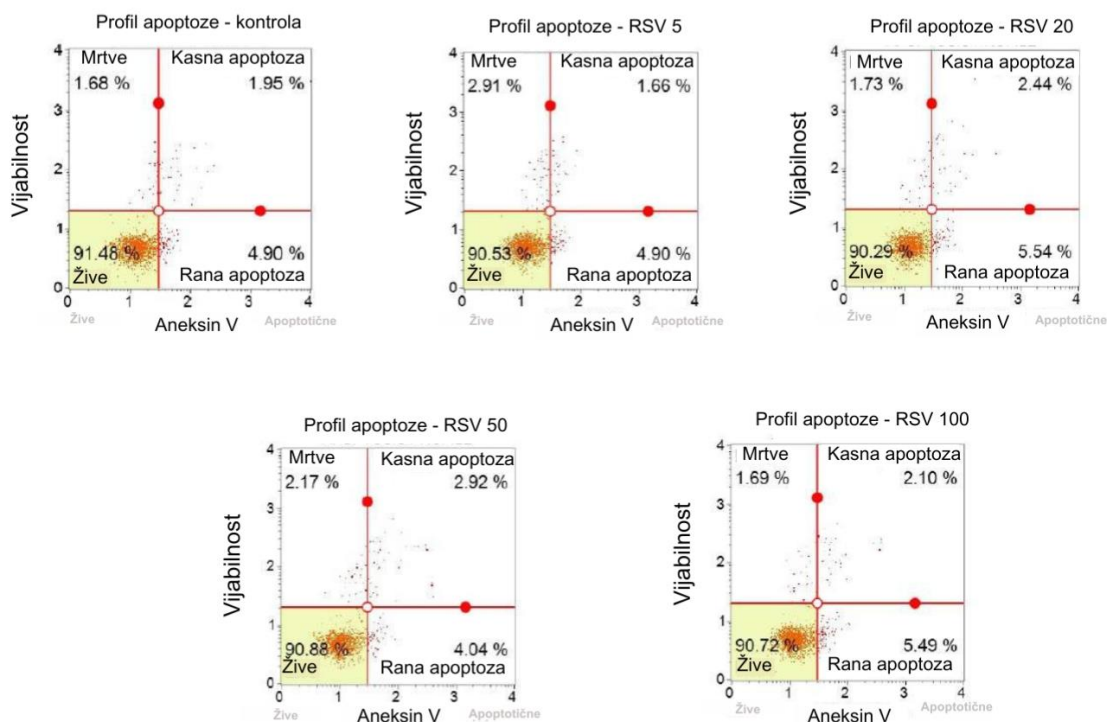
kontrolnom uzorku, koji nije tretiran s RSV, udio živih stanica iznosi 91,99 %, a s povećanjem koncentracije RSV dolazi do blagog pada vijabilnosti, pa tako pri koncentraciji od 5 μM udio živih stanica je 90,67 %, pri koncentraciji od 20 μM je 89,95 %, pri koncentraciji od 50 μM je 91,87 %, dok je jedini statistički značajan ($p < 0,05$) pad udjela živih stanica određen pri koncentraciji od 100 μM gdje je udio živih stanica iznosio 89,91 %.



Slika 11. Udjeli živih stanica, stanica u ranoj fazi apoptoze, stanica u kasnoj apoptozi te mrtvih stanica u HaCaT kulturi nakon tretmana s resveratrolom (RSV 5 – 100 μM). Kontrola – stanice tretirane s 5 $\mu\text{L EtOH mL}^{-1}$ medija za uzgoj. Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolnim uzorkom (Studentov t -test): ^a $p < 0,05$

Cilj brojnih studija bio je ispitati učinak RSV na aktivaciju stanične smrti. Tako je istraživanje koje su proveli Zhou i sur. (2011) pokazalo da tretman humanih stanica raka gušterače (Capan-2 i Colo357) sa 100-200 μM RSV tijekom 12-24 sata uzrokuje značajne pro-apoptotične učinke. Pri tretmanu humanih HCT116 stanica kolorektalnog karcinoma, Mahyar-Roemer i sur. (2001) dokazali su da je 10-20 μM RSV dovoljan da inducira apoptozu tijekom 48 sati. Slični rezultati su opaženi primjenom humanih staničnih linija kolorektalnog karcinoma (HT-29 i COLO 201) tretiranih s 25-150 μM RSV tijekom 24-72 sata (Miki i sur., 2012).

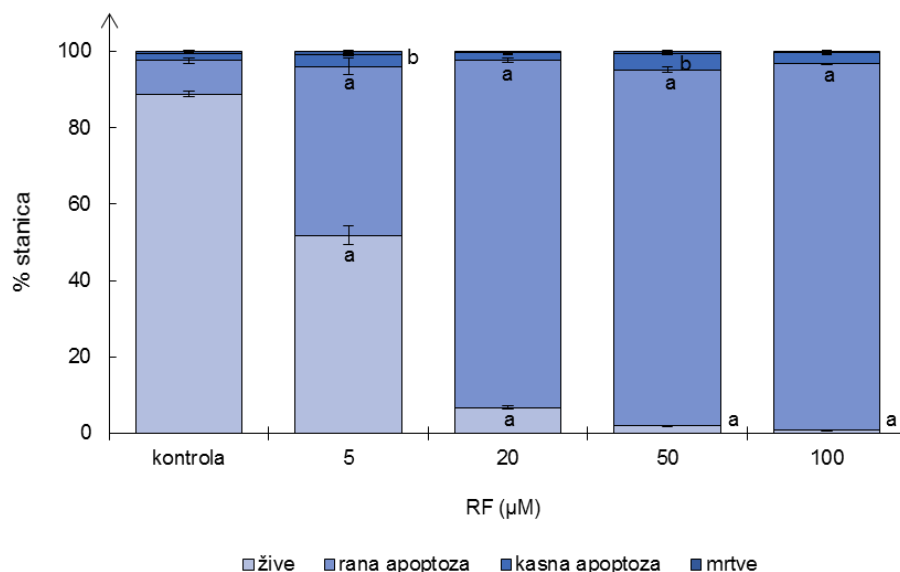
Na slici 12 prikazani su reprezentativni *dot-plot* dijagrami za HaCaT stanice 48 sati nakon tretmana različitim koncentracijama RSV (5-100 μM).



Slika 12. Reprezentativni dot-plot dijagrami s prikazom rezultata tretmana HaCaT stanica s resveratrolom (RSV, 5 do 100 μM) nakon 48 sati, dobiveni metodom protočne citometrije. Kontrolne stanice tretirane su etanolom ($5 \mu\text{L mL}^{-1}$ medija za uzgoj)

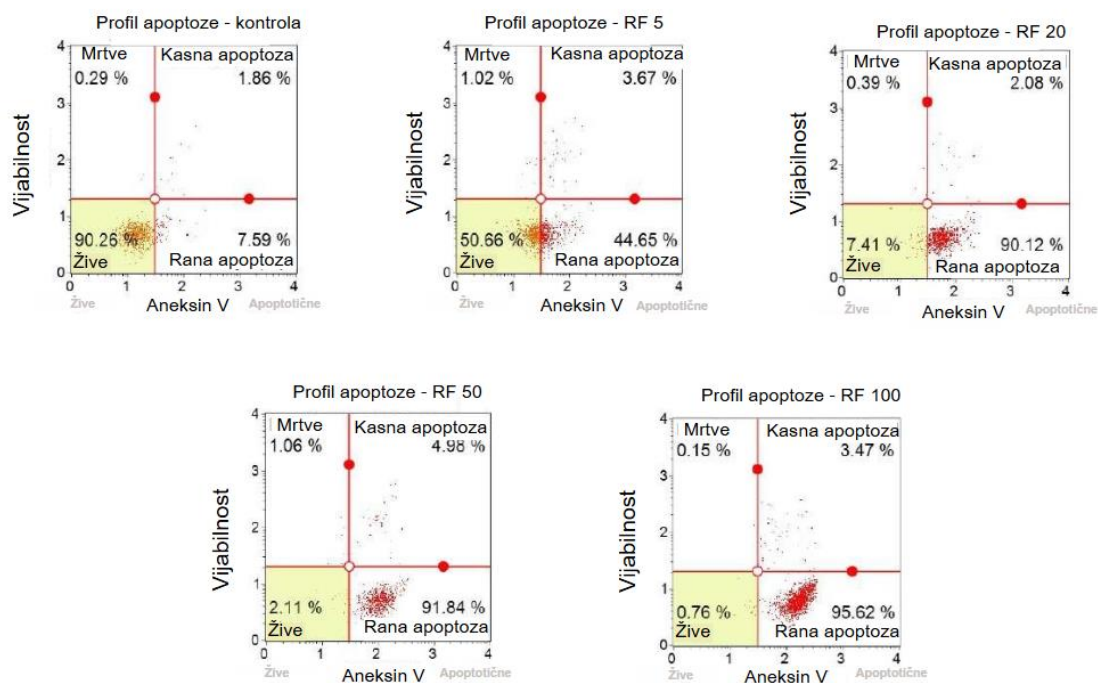
4.4.2. Analiza stanične smrti apoptozom nakon tretmana HaCaT stanica ferocenskim derivatom resveratrola

Udjeli živih, mrtvih, te HaCaT stanica u ranoj i kasnoj apoptozi nakon tretmana s 5 do 100 μM RF prikazani su na slici 13. Rezultati ukazuju na značajno smanjenje udjela živih stanica s povećanjem koncentracije RF. U kontrolnom uzorku koji nije tretiran s RF, udio živih stanica iznosi 88,83 %, a s povećanjem koncentracije RF dolazi do drastičnog ($p < 0,001$) pada udjela živih stanica u populaciji. Pri koncentraciji od 5 μM RF udio živih stanica iznosi 51,84 %, pri koncentraciji od 20 μM 6,69 %, pri koncentraciji od 50 μM 1,90 %, a pri najvećoj ispitanoj koncentraciji RF od 100 μM svega 0,80 %. Tretman HaCaT stanica s RF doveo je do statistički značajnog ($p < 0,001$) povećanja udjela stanica u ranoj apoptozi. U kontrolnom uzorku, udio stanica u ranoj apoptozi iznosi 8,75 %, dok je nakon tretmana stanica s RF u koncentracijama $\geq 20 \mu\text{M}$ udio > 90 %. Udio mrtvih stanica u kulturi neznatno se mijenja s povećanjem koncentracije RF (slika 13).



Slika 13. Udjeli živih stanica, stanica u ranoj fazi apoptoze, stanica u kasnoj apoptozi te mrtvih stanica u HaCaT kulturi nakon tretmana s ferocenskim derivatom resveratrola (RF 5 – 100 µM). Kontrola – stanice tretirane s 5 µL DMSO mL⁻¹ medija za uzgoj. Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolnim uzorkom (Studentov *t*-test): ^a*p* < 0,001, ^b*p* < 0,005

Na slici 14 prikazani su reprezentativni *dot-plot* dijagrami za HaCaT stanice 48 sati nakon tretmana različitim koncentracijama RF (5 - 100 µM). Uvođenje ferocena u strukturu RSV značajno je utjecao i izmijenio udjele subpopulacija živih i (rano)apoptotskih stanica (slike 11, 12, 13 i 14).



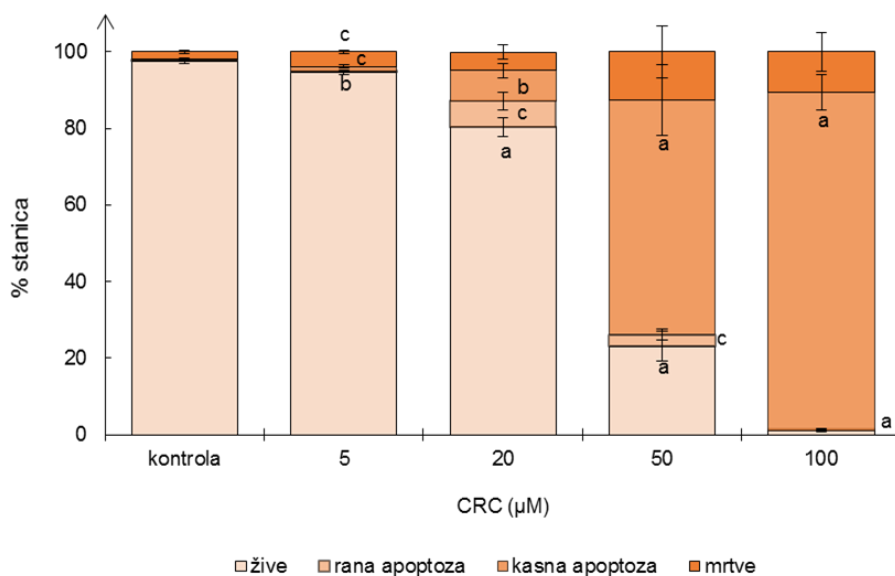
Slika 14. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami s prikazom rezultata tretmana HaCaT stanica s ferocenskim derivatom resveratrola (RF, 5 do 100 µM) nakon 48 sati, dobiveni metodom

protočne citometrije. Kontrolne stanice tretirane su s DMSO ($5 \mu\text{L mL}^{-1}$ medija za uzgoj)

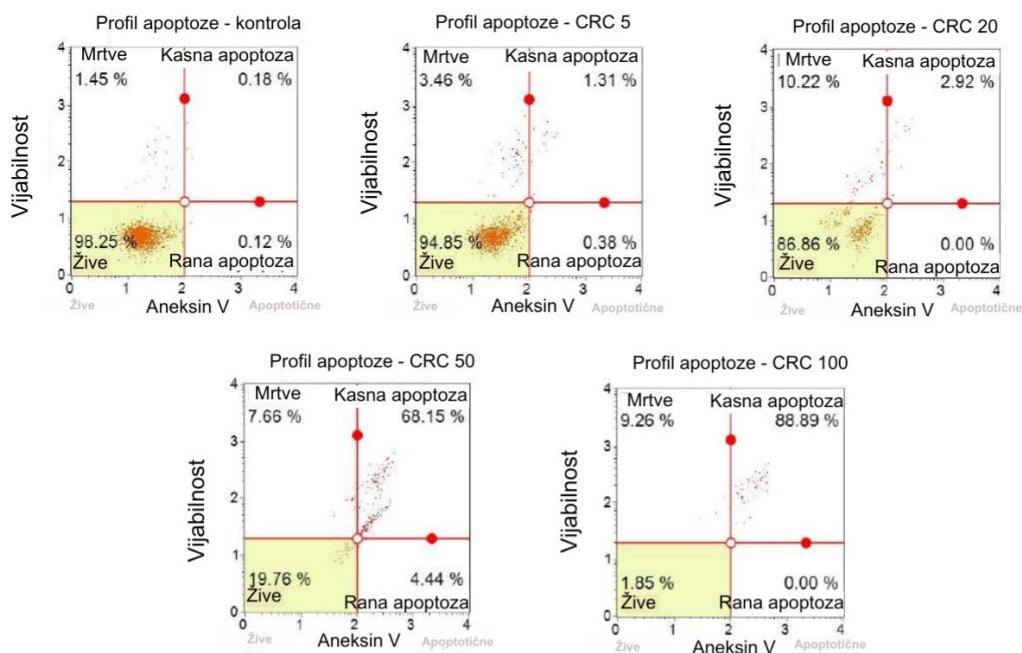
4.4.3. Analiza stanične smrti apoptozom nakon tretmana HaCaT stanica kurkuminom

Na slici 15 prikazani su udjeli različitih subpopulacija HaCaT stanica - živih, mrtvih, te stanica u ranoj i kasnoj fazi apoptoze - nakon izlaganja CRC u koncentracijama od 5 do $100 \mu\text{M}$. Iz rezultata se može primijetiti statistički značajno ($p < 0,01 - p < 0,001$) smanjenje udjela živih stanica u populaciji s porastom upotrebljene koncentracije CRC. U kontrolnom uzorku (bez tretmana s CRC) udio živih stanica iznosi 97,68 %, a pri najmanjoj koncentraciji CRC ($5 \mu\text{M}$) 94,68 %. Najviša ispitana koncentracija CRC rezultirala je s tek 1,08 % živih stanica u populaciji. Tretman HaCaT stanica s $5 - 100 \mu\text{M}$ CRC uzrokovao je povećanje udjela apoptotskih stanica u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Udio stanica u ranoj apoptozi nakon tretmana s $50 \mu\text{M}$ odnosno $100 \mu\text{M}$ CRC iznosi 61,21 % odnosno 88,34 %, dok udio mrtvih stanica iznosi 12,67 % odnosno 10,52 % (slika 15).

Na slici 16 prikazani su reprezentativni *dot-plot* dijagrami za HaCaT stanice 48 sati nakon tretmana različitim koncentracijama CRC ($5 - 100 \mu\text{M}$).



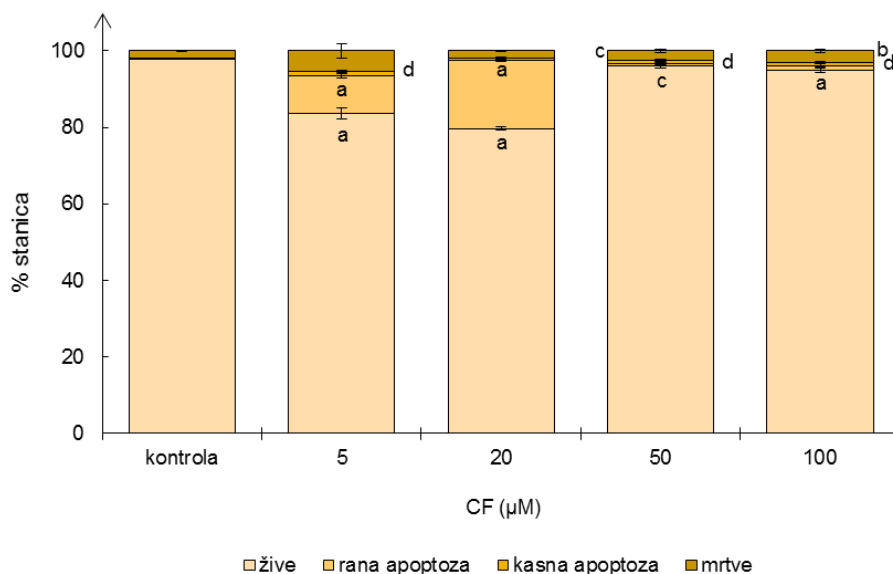
Slika 15. Udjeli živih stanica, stanica u ranoj fazi apoptoze, stanica u kasnoj apoptozi te mrtvih stanica u HaCaT kulturi nakon tretmana s kurkuminom (CRC $5 - 100 \mu\text{M}$). Kontrola – stanice tretirane s $5 \mu\text{L DMSO mL}^{-1}$ medija za uzgoj. Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolnim uzorkom (Studentov *t*-test): ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,01$, ^c $p < 0,025$



Slika 16. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami s prikazom rezultata tretmana HaCaT stanica s kurkuminom (CRC, 5 do 100 μM) nakon 48 sati, dobiveni metodom protočne citometrije. Kontrolne stanice tretirane su s DMSO (5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ medija za uzgoj)

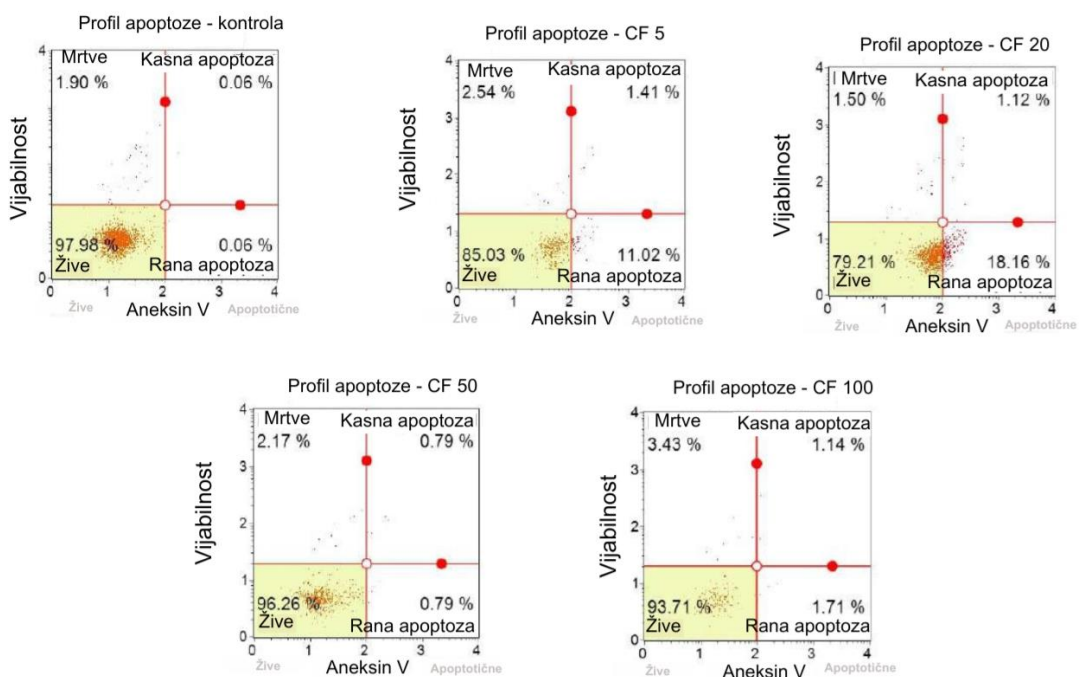
4.4.4. Analiza stanične smrti apoptozom nakon tretmana HaCaT stanica ferocenskim analogom kurkumina

Udjeli živih, mrtvih, te HaCaT stanica u ranoj i kasnoj apoptozi nakon tretmana s 5 do 100 μM CF prikazani su na slici 17. Udjeli stanica u pojedinim subpopulacijama su neznatno promijenjeni (u odnosu na kontrolni uzorak) prilikom tretmana s CF, osim pri nižim ispitanim dozama (5 i 20 μM) kod kojih je uočeno nešto više (rano)apoptotskih stanica (9,81 – 17,88 %). U kontrolnom uzorku, bez tretmana stanica s CF, udio živih stanica iznosi 97,89 %, dok pri tretmanu s 50 μM CF iznosi 96,09 %, a sa 100 μM CF 94,82 % (slika 17).



Slika 17. Udjeli živih stanica, stanica u ranoj fazi apoptoze, stanica u kasnoj apoptozi te mrtvih stanica u HaCaT kulturi nakon tretmana ferocenskim analogom kurkumina (CF 5 – 100 µM). Kontrola – stanice tretirane s 5 µL DMSO mL⁻¹ medija za uzgoj. Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolnim uzorkom (Studentov *t*-test): ^a*p* < 0,001, ^b*p* < 0,01, ^c*p* < 0,025, ^d*p* < 0,05

Na slici 18 prikazani su reprezentativni *dot-plot* dijagrami za HaCaT stanice 48 sati nakon tretmana različitim koncentracijama CF (5-100 µM).



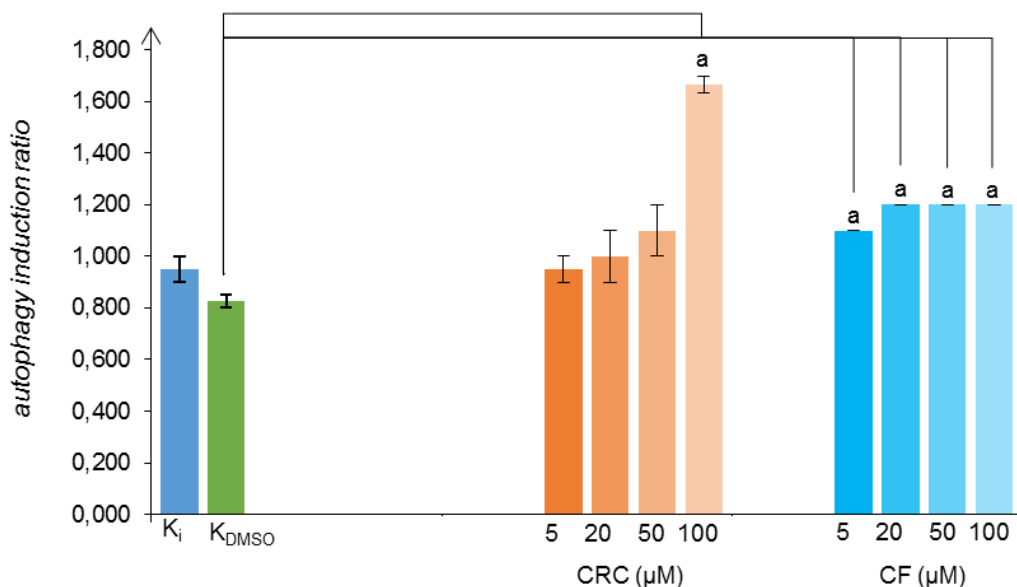
Slika 18. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami s prikazom rezultata tretmana HaCaT stanica s ferocenskim analogom kurkumina (CF, 5 do 100 µM), dobiveni metodom protočne citometrije. Kontrolne stanice tretirane su s DMSO (5 µL mL⁻¹ medija za uzgoj)

4.5. ANALIZA STANIČNE SMRTI AUTOFAGIJOM NAKON TRETMANA HaCaT STANICA KURKUMINOM I FEROCENSKIM ANALOGOM KURKUMINA

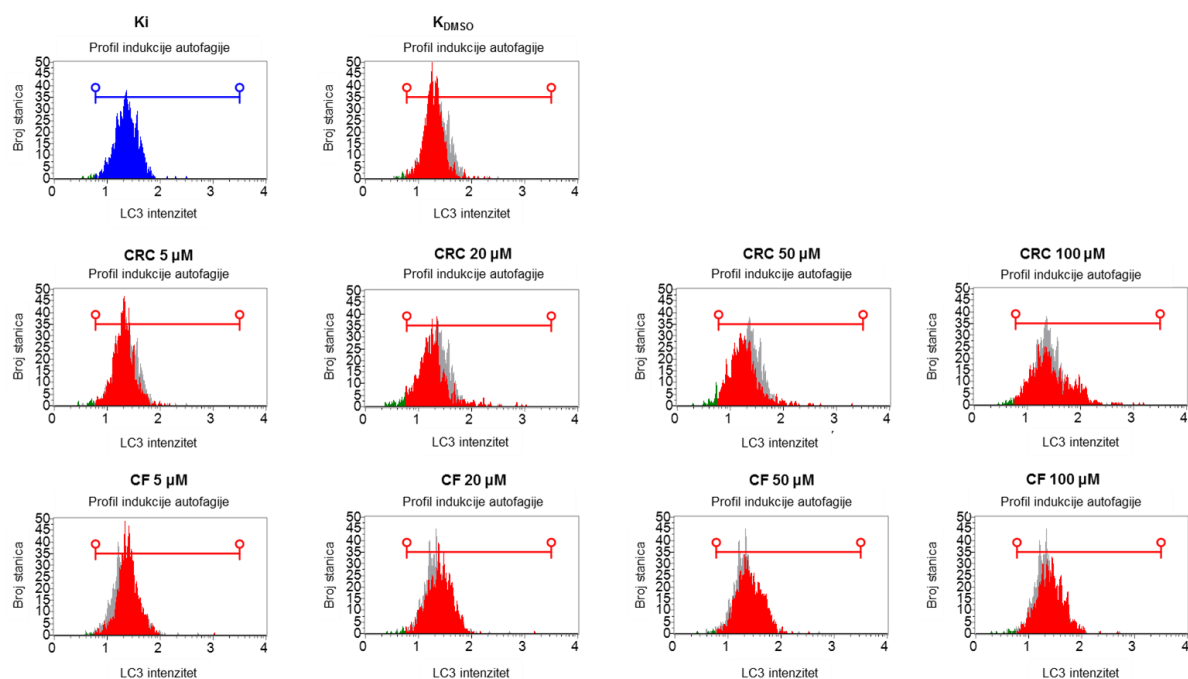
Za analizu stanične smrti autofagijom u ovom istraživanju korišten je *Muse[®] Autophagy LC3-antibody based kit*, a mjerenje je provedeno na uređaju *Guava[®] Muse[®] Cell Analyzer*.

Na slici 19 prikazani su statistički obrađeni rezultati o učinku 5 - 100 μM CRC i CF na indukciju stanične smrti autofagijom u kulturi keratinocita, dok su reprezentativni histogrami (*autophagy induction profile*) za kontrolne uzorke te stanice tretirane s CRC i CF prikazani na slici 20.

U usporedbi s kontrolnim uzorkom (K_{DMSO}), CRC i CF uzrokovali su statistički značajan porast u udjelu stanica koje odumiru autofagijom. *Autophagy induction ratio* za stanice tretirane sa 100 μM CRC iznosio je 1,67 ($p < 0,001$), dok je pri ostalim koncentracijama došlo do indukcije autofagije, no učinak nije bio statistički značajan. Tretman keratinocita s 5 – 100 μM CF rezultirao je blagim, ali statistički značajnim ($p < 0,001$) povećanjem udjela stanica koje odumiru autofagijom.



Slika 19. Evaluacija stanične smrti autofagijom u HaCaT stanicama nakon tretmana s kurkuminom (CRC) i ferocenskim analogom kurkumina (CF) u koncentracijama od 5 - 100 μM . K_i - netretirane stanice; K_{DMSO} – stanice tretirane s 5 μL DMSO mL^{-1} medija za uzgoj. Statistički značajna razlika u odnosu na K_{DMSO} (Student *t*-test): ^a $p < 0,001$



Slika 20. Reprezentativni histogrami (*autophagy induction profile*) dobiveni primjenom Muse[®] *Autophagy LC3-antibody based kit* na uređaju Guava[®] Muse[®] Cell Analyzer za kontrolne uzorke (K_i - netretirane stanice; K_{DMSO} – stanice tretirane s 5 μL DMSO mL⁻¹ medija za uzgoj) i HaCaT stanice tretirane s 5 - 100 μM kurkuminom (CRC) i ferocenskim analogom kurkumina (CF)

U istraživanju provedenom 2017. godine (Zhu i Bu, 2017) analizirao se učinak CRC na odumiranje humanih stanica raka gušterače (PANC1 i BxPC3) autofagijom i apoptozom. U istraživanju promjene u razini autofagije promatrane su imunofluorescentnim testom tako što su se nakon tretiranja različitim koncentracijama CRC stanice fiksirale paraformaldehidom i inkubirale s LC3 antitijelom. Sljedeći dan, drugo antitijelo koje se konjugira s FITC-om (fluorescentna boja) korišteno je za detekciju LC3 fluorescentnom mikroskopijom. Rezultati su pokazali da je razina ekspresije označenih autofagosoma bila najviša u skupini tretiranoj s 40 μg mL⁻¹ CRC u PANC1 stanicama, dok u kontrolnoj skupini nije zabilježen značajan broj obojanih autofagosoma. Slično, autofagija je detektirana u BxPC3 stanicama inkubiranim s CRC u dozi od 1 μg mL⁻¹ tijekom 24 sata, dok u kontrolnoj skupini nije zabilježena.

5. ZAKLJUČCI

1. Rezultati dobiveni *Trypan Blue* metodom ukazuju na pad vijabilnosti HaCaT stanica s porastom koncentracije (5 – 100 μM) RSV, RF i CRC, dok je tretman stanica nižim dozama CF (5 i 20 μM) rezultirao izraženijom proliferacijom. Usporedba učinka RSV i RF pokazuje da RF ima manje izražen citotoksični učinak. Od ispitanih spojeva CRC ima najveću citotoksičnost pri svim koncentracijama s IC_{50} vrijednošću 11,03 μM , dok je antiproliferativan učinak CF najmanje izražen ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$).

2. Metoda MTT pokazala je da RSV i RF podjednako djeluju na staničnu vijabilnost, dok je CRC u odnosu na CF pokazao znatno izraženiji citotoksičan učinak. Statistički značajan ($p < 0,025$ – $p < 0,001$) pad vijabilnosti CRC je uzrokovao pri svim ispitanim koncentracijama (5 – 100 μM). CF je uzrokovao pad vijabilnosti samo pri koncentraciji od 2,5 μM ($p < 0,01$), dok je pri ostalim koncentracijama vijabilnost stanica poboljšana.

3. Analiza učinka 2,5 – 50 μM RSV, RF, CRC i CF na stvaranje ROS u HaCaT stanicama pokazala je da RSV pri svim ispitivanim koncentracijama značajno ($p < 0,05$ – $p < 0,005$) smanjuje razinu ROS inducirano s 50 μM tBHP u odnosu na kontrolne stanice ($K_{\text{EtOH/tBHP}}$). RF je uzrokovao statistički značajno ($p < 0,05$ – $p < 0,001$) smanjenje razine ROS pri svim ispitanim koncentracijama za 10,55 – 23,45 % u odnosu na $K_{\text{DMSO/tBHP}}$, osim 50 μM . CRC (5 – 50 μM) je pokazao statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenje ROS nakon tretmana stanica s tBHP, dok je pri koncentraciji od 2,5 μM došlo do pada razine ROS, ali taj pad nije bio statistički značajan. Učinak CRC na smanjenje razine ROS bio je najizraženiji u odnosu na preostale ispitane spojeve, no ti rezultati se trebaju uzeti s oprezom obzirom na najveći pad vijabilnosti stanica nakon tretmana tim polifenolom. CF je pri koncentracijama 5 – 50 μM uzrokovao značajno ($p < 0,001$) smanjenje ROS inducirano s tBHP za 33,02 – 50,08 %.

4. Analizom stanične smrti keratinocita putem apoptoze tretiranih s 5 – 100 μM RSV, RF, CRC i CF uočen je najveći udio stanica u (ranoj i kasnoj) apoptozi i nekrozi prilikom tretmana stanica s CRC. Tretman HaCaT stanica s RF doveo je do izraženog i statistički značajnog ($p < 0,001$) povećanja udjela stanica u ranoj apoptozi.

5. Analiza stanične smrti keratinocita autofagijom tretiranih s 5 – 100 μM CRC i CF rezultirao je blagim, ali statistički značajnim ($p < 0,001$) povećanjem udjela stanica koje odumiru autofagijom nakon tretmana s CF, dok je *autophagy induction ratio* za stanice tretirane sa 100 μM CRC bio najviši i iznosio je 1,67 ($p < 0,001$).

6. Uvođenje ferocena u strukture ispitivanih polifenola dovelo je do izmjenjene biološke aktivnosti novosintetiziranih derivata/analogi, pri čemu je njihova citotoksičnost značajno niža u odnosu na RSV i CRC, a antioksidacijska aktivnost zadržana.

6. LITERATURA

Aggarwal BB, Gupta SC, Sung B. (2013) Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. *Br J Pharmacol* **169**, 1672-92. <https://doi.org/10.1111/bph.12131>

Ak T, Gülçin I (2008) Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact* **174**, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.003>

Akkoç Y, Berrak Ö, Arısan ED, Obakan P, Çoker-Gürkan A, Palavan-Ünsal N (2015) Inhibition of PI3K signaling triggered apoptotic potential of curcumin which is hindered by Bcl-2 through activation of autophagy in MCF-7 cells. *Biomed Pharmacother* **71**, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.02.029>

Aoki H, Takada Y, Kondo S, Sawaya R, Aggarwal BB, Kondo Y (2007) Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas *in vitro* and *in vivo* through induction of autophagy: Role of akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Pharmacol* **72**, 29–39. <https://doi.org/10.1124/mol.106.033167>

Aranda-Rivera AK, Cruz-Gregorio A, Arancibia-Hernández YL, Hernández-Cruz EY, Pedraza-Chaverri J (2022) RONS and Oxidative Stress: An Overview of Basic Concepts. *Oxygen* **2**, 437–478. <https://doi.org/10.3390/oxygen2040030>

Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, i sur. (2003) Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene *via* regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive. *Biochem J* **371**, 887-895. <https://doi.org/10.1042/bj20021619>

Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, i sur. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444**, 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature05354>

Bezáková L, Košťálová D, Obložinský M, Hoffman P, Pekárová M, Kollárová R i sur. (2014) Inhibition of 12/15 lipoxygenase by curcumin and an extract from *Curcuma longa* L. *Ceska Slov Farm* **63**, 26-31.

Chen RL, Balami JS, Esiri MM, Chen LK, Buchan AM (2010) Ischemic stroke in the elderly: An overview of evidence. *Nat Rev Neurol* **6**, 256–265. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.36>

Das DK, Mukherjee S, Ray D (2010) Resveratrol and red wine, healthy heart and longevity. *Heart Fail Rev* **15**, 467–477. <https://doi.org/10.1007/s10741-010-9163-9>

Das S, Das DK (2007) Anti-Inflammatory Responses of Resveratrol. *Inflamm Allergy Drug Targets* **6**, 168-173. <https://doi.org/10.2174/187152807781696464>

Delmas D, Jannin B, Latruffe N (2005) Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol Nutr Food Res* **49**, 377–395. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400098>

Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, i sur. (2005)

Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett* **223**, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.09.041>

Dvorakova M, Landa P (2017) Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. *Pharmacol Res* **124**, 126–145. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.08.002>

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

Fleenor BS, Sindler AL, Marvi NK, Howell KL, Zigler ML, Yoshizawa M, i sur. (2013) Curcumin ameliorates arterial dysfunction and oxidative stress with aging. *Exp Gerontol* **48**, 269–276. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.10.008>

Fuchs Y, Steller H (2011) Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* **147**, 742–758. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.033>

Gál R, Halmosi R, Gallyas F, Tschida M, Mutirangura P, Tóth K, i sur. (2023) Resveratrol and beyond: The Effect of Natural Polyphenols on the Cardiovascular System: A Narrative Review. *Biomedicines* **11**, 2888. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11112888>

Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, i sur. (2015) Essential versus accessory aspects of cell death: Recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ* **22**, 58–73. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>

Gasser G, Ott I, Metzler-Nolte N (2011) Organometallic anticancer compounds. *J Med Chem* **54**, 3–25. <https://doi.org/10.1021/jm100020w>

Gerszon J, Rodacka A, Puchala M (2014) Antioxidant properties of resveratrol and its protective effects in neurodegenerative diseases. *Adv Cell Biol* **2014**, 97–117. <https://doi.org/10.2478/acb-2014-0006>

Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I (2021) The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int J Mol Sci* **22**. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>

Goel A, Boland CR, Chauhan DP (2001) Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells q. *Cancer Lett* **172**, 111–118. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(01\)00655-3](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(01)00655-3)

Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB (2008) Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* **75**, 787–809. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.08.016>

González R, Ballester I, López-Posadas R, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustín O, i sur. (2011) Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit Rev Food Sci Nutr* **51**, 331–362. <https://doi.org/10.1080/10408390903584094>

González-Garzón AC, Ramón-Ugalde JP, Ambríz-García DA, Vazquez-Avenidaño JR, Hernández-Pichardo JE, Rodríguez-Suastegui JL, i sur. (2023) Resveratrol Reduces ROS by Increasing GSH in Vitrified Sheep Embryos. *Animals* **13**. <https://doi.org/10.3390/ani13233602>

Görmen M, Pigeon P, Top S, Hillard EA, Huché M, Hartinger CG, i sur. (2010) Synthesis, cytotoxicity, and COMPARE analysis of ferrocene and [3]ferrocenophane tetrasubstituted olefin derivatives against human cancer cells. *ChemMedChem* **5**, 2039–2050. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000286>

Green DR, Levine B (2014) To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. *Cell* **157**, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.049>

Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A (2018) Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochem* **120**, 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>

Gu T, Wang N, Wu T, Ge Q, Chen L (2021) Antioxidative Stress Mechanisms behind Resveratrol: A Multidimensional Analysis. *J Food Qual* **2021**. <https://doi.org/10.1155/2021/5571733>

Guo J, Huang X, Dou L, Yan M, Shen T, Tang W, i sur. (2022) Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. *Signal Transduct Target Ther* **7**, 391. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01251-0>

Hori YS, Kuno A, Hosoda R, Tanno M, Miura T, Shimamoto K, i sur. (2011) Resveratrol ameliorates muscular pathology in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *J Pharmaol Exp Ther* **338**, 784–794. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.183210>

Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, i sur. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425**, 188–191. <https://doi.org/10.1038/nature01960>

Hung L-M, Chen J-K, Huang S-S, Lee R-S, Su M-J (2000) Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res* **47**, 549-555. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(00\)00102-4](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(00)00102-4)

Igney FH, Krammer PH (2002) Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **22**, 277–288. <https://doi.org/10.1038/nrc776>

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**. <https://doi.org/10.1155/2014/580852>

Iqbal M, Datta Sharma S, Okazaki Y, Fujisawa M, Okada S (2003) Dietary Supplementation of Curcumin Enhances Antioxidant and Phase II Metabolizing Enzymes in ddY Male Mice: Possible Role in Protection against Chemical Carcinogenesis and Toxicity. *Pharmacol Toxicol* **92**, 33–38. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2003.920106.x>

Jagdale D, Battellu K, Bhosale S, Sawant Y, Nadar G (2024) Exploring the Versatility of Ferrocene and Its Derivatives: A Comprehensive Review. *Biomedical and Pharmacology Journal* **17**, 1433–1444. <https://dx.doi.org/10.13005/bpj/2954>

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing K V., Thomas CF, Beecher CWW, i sur. (1997) Cancer

chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**, 218–220. <https://doi.org/10.1126/science.275.5297.218>

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>

Koeberle A, Northoff H, Werz O (2009) Curcumin blocks prostaglandin E2 biosynthesis through direct inhibition of the microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *Mol Cancer Ther* **8**, 2348–2355. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0290>

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**, 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>

Kumar SSD, Houreld NN, Abrahamse H (2018) Therapeutic potential and recent advances of curcumin in the treatment of aging-associated diseases. *Molecules* **23**, 835. <https://doi.org/10.3390/molecules23040835>

Lee CW, Wong LLY, Tse EYT, Liu HF, Leong VYL, Lee JMF, i sur. (2012) AMPK promotes p53 acetylation via phosphorylation and inactivation of SIRT1 in liver cancer cells. *Cancer Res* **72**, 4394–4404. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0429>

Li W, Zhou Y, Yang J, Li H, Zhang H, Zheng P (2017) Curcumin induces apoptotic cell death and protective autophagy in human gastric cancer cells. *Oncol Rep* **37**, 3459–3466. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5637>

Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, i sur. (2018) Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* **13**, 757–772. <https://doi.org/10.2147/cia.s158513>

Lin X, Bai D, Wei Z, Zhang Y, Huang Y, Deng H, i sur. (2019) Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway. *PLoS One* **14**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216711>

Liu M, Wilk SA, Wang A, Zhou L, Wang RH, Ogawa W, i sur. (2010) Resveratrol inhibits mTOR signaling by promoting the interaction between mTOR and DEPTOR. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 36387–36394. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.169284>

Liu Y, Chan F, Sun H, Yan J, Fan D, Zhao D, i sur. (2011) Resveratrol protects human keratinocytes HaCaT cells from UVA-induced oxidative stress damage by downregulating Keap1 expression. *Eur J Pharmacol* **650**, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.10.009>

Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC (2006) Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sciences* **78**, 2081–2087. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.007>

Mahyar-Roemer M, Katsen A, Mestres P, Roemer K (2001) Resveratrol induces colon tumor cell apoptosis independently of p53 and precede by epithelial differentiation, mitochondrial proliferation and membrane potential collapse. *Int J Cancer* **94**, 615-622. <https://doi.org/10.1002/ijc.1516>

Menon VP, Sudheer AR (2007). Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol* **595**, 105-125. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_3

Miki H, Uehara N, Kimura A, Sasaki T, Yuri T, Yoshizawa K, i sur. (2012) Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells. *Int J Oncol* **40**, 1020–1028. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1325>

Miletić M, Murati T, Slavica A, Kmetič I. (2021) Opstati ili umrijeti – regulacija stanične smrti. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **16**, 11-19. <http://dx.doi.org/10.31895/hcptbn.16.1-2.2>

Mizushima N (2007) Autophagy: Process and function. *Genes Dev* **21**, 2861–2873. <https://doi.org/10.1101/gad.1599207>

Mosieniak G, Adamowicz M, Alster O, Jaskowiak H, Szczepankiewicz AA, Wilczynski GM, i sur. (2012) Curcumin induces permanent growth arrest of human colon cancer cells: Link between senescence and autophagy. *Mech Ageing Dev* **133**, 444–455. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2012.05.004>

Movahed A, Nabipour I, Lieben Louis X, Thandapilly SJ, Yu L, Kalantarhormozi M, i sur. (2013) Antihyperglycemic effects of short term resveratrol supplementation in type 2 diabetic patients. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2013**. <https://doi.org/10.1155/2013/851267>

Nour V, Trandafir I, Muntean C (2012) Ultraviolet irradiation of *trans*-resveratrol and HPLC determination of *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol in romanian red wines. *J Chromatogr Sci* **50**, 920–927. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms091>

Ornelas C (2011) Application of ferrocene and its derivatives in cancer research. *New Journal of Chemistry* **35**, 1973–1985. <http://dx.doi.org/10.1039/C1NJ20172G>

Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, i sur. (2008) Resveratrol Delays Age-Related Deterioration and Mimics Transcriptional Aspects of Dietary Restriction without Extending Life Span. *Cell Metab* **8**, 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.06.011>

Porquet D, Griñán-Ferré C, Ferrer I, Camins A, Sanfeliu C, Del Valle J, i sur. (2014) Neuroprotective role of *trans*-resveratrol in a murine model of familial alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **42**, 1209–1220. <https://doi.org/10.3233/JAD-140444>

Pu Y, Zhang H, Wang P, Zhao Y, Li Q, Wei X, i sur. (2013) Dietary curcumin ameliorates aging-related cerebrovascular dysfunction through the AMPK/uncoupling protein 2 pathway.

Cell Physiol Biochem **32**, 1167–1177. <https://doi.org/10.1159/000354516>

Renaud S, de Lorgeril M (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **339**, 1523–1526. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91277-f](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91277-f)

Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* **49**, 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>

Rosenfeldt MT, Ryan KM (2009) The role of autophagy in tumour development and cancer therapy. *Expert Rev Mol Med* **11**, e36. <https://doi.org/10.1017/S1462399409001306>

Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T (2008) Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat Res Rev Mutat Res* **658**, 68–94. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.08.004>

Schweichel JU, Merker HJ. (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* **7**, 253–266. <https://doi.org/10.1002/tera.1420070306>

Seyyedbrahimi SS, Khodabandehloo H, Nasli Esfahani E, Meshkani R (2018) Correction to: The effects of resveratrol on markers of oxidative stress in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Acta Diabetol* **55**, 1087. <https://doi.org/10.1007/s00592-018-1160-9>

Shanmugam MK, Rane G, Kanchi MM, Arfuso F, Chinnathambi A, Zayed ME, i sur. (2015) The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. *Molecules* **20**, 2728–2769. <https://doi.org/10.3390/molecules20022728>

Shao ZM, Shen ZZ, Liu CH, Sartippour MR, Go VL, Heber D, i sur. (2002) Curcumin exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Int J Cancer* **98**, 234–240. <https://doi.org/10.1002/ijc.10183>

Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS (1998) Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med* **64**, 353–356. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957450>

Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY (2010) Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* **41**, 375–383. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8111-y>

Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Koneru S, Juhasz B, Zhan L, Otani H, i sur. (2007) Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase. *Free Radic Biol Med* **43**, 720–729. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.004>

Vetterli L, Maechler P (2011) Resveratrol-activated SIRT1 in liver and pancreatic β -cells: a Janus head looking to the same direction of metabolic homeostasis. *Aging* **3**, 444–449. <https://doi.org/10.18632/aging.100304>

Wakabayashi I, Takeda Y (2013) Inhibitory effects of resveratrol on MCP-1, IL-6, and IL-8 production in human coronary artery smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **386**, 835–839. <https://doi.org/10.1007/s00210-013-0877-9>

Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, i sur. (2002) Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **106**, 1652–1658. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000029925.18593.5C>

Wang JB, Qi LL, Zheng S Di, Wu TX (2009) Curcumin induces apoptosis through the mitochondria-mediated apoptotic pathway in HT-29 cells. *J Zhejiang Univ Sci B* **10**, 93–102. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820238>

Witte VA, Kerti L, Margulies DS, Flöel A (2014) Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults. *J Neurosci* **34**, 7862–7870. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0385-14.2014>

Wongcharoen W, Phrommintikul A (2009) The protective role of curcumin in cardiovascular diseases. *Int J Cardiol* **133**, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2009.01.073>

Wood JG, Regina B, Lavu S, Hewitz K, Helfand SL, Tatar M, i sur. (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* **430**, 686–689. <https://doi.org/10.1038/nature02789>

Worsley CM, Veale RB, Mayne ES (2022) Inducing apoptosis using chemical treatment and acidic pH, and detecting it using the Annexin V flow cytometric assay. *PLoS One* **17**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270599>

Woźniak M, Nowak M, Lazebna A, Więcek K, Jabłońska I, Szpadel K, i sur. (2021) The Comparison of *In Vitro* Photosensitizing Efficacy of Curcumin-Loaded Liposomes Following Photodynamic Therapy on Melanoma MUG-Mel2, Squamous Cell Carcinoma SCC-25, and Normal Keratinocyte HaCaT Cells. *Pharmaceuticals* **14**. <https://doi.org/10.3390/ph14040374>

Xiao K, Jiang J, Guan C, Dong C, Wang G, Bai L, i sur. (2013) Curcumin induces autophagy *via* activating the AMPK signaling pathway in lung adenocarcinoma cells. *J Pharmacol Sci* **123**, 102–109. <https://doi.org/10.1254/jphs.13085FPz>

Zhang LX, Li CX, Kakar MU, Khan MS, Wu PF, Amir RM, i sur. (2021) Resveratrol (RV): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother* **143**. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112164>

Zhao G, Han X, Zheng S, Li Z, Sha Y, Ni J, i sur. (2016) Curcumin induces autophagy, inhibits proliferation and invasion by downregulating AKT/mTOR signaling pathway in human melanoma cells. *Oncol Rep* **35**, 1065–1074. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4413>

Zhou JH, Cheng HY, Yu ZQ, He DW, Pan Z, Yang DT (2011) Resveratrol induces

apoptosis in pancreatic cancer cells. *Chin Med J* **124**, 1695-1699.

Zhu W, Wu Y, Meng YF, Wang JY, Xu M, Tao JJ, i sur. (2015) Effect of curcumin on aging retinal pigment epithelial cells. *Drug Des Devel Ther* **9**, 5337–5344.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S84979>

Zhu Y, Bu S (2017) Curcumin Induces Autophagy, Apoptosis, and Cell Cycle Arrest in Human Pancreatic Cancer Cells. *Evid-Based Compl Alt* 2017.
<https://doi.org/10.1155/2017/5787218>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis