

# Učinak resveratrola na PCB 77 induciranu proliferaciju u kulturama stanica reprodukcijskog sustava

---

Koropatnicki, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:159:890653>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2017.

Kristina Koropatnicki, 785/MB

**UČINAK RESVERATROLA NA PCB  
77 INDUCIRANU PROLIFERACIJU  
U KULTURAMA STANICA  
REPRODUKCIJSKOG SUSTAVA**

Ovaj diplomski rad je izrađen u Laboratoriju za toksikologiju, Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim mentorstvom dr.sc. Ivane Kmetič, izv.prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć pri izradi mag.ing. Marine Miletić.

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Ivani Kmetič na stručnoj pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem asistentici mag. ing. Marini Miletić na stručnoj pomoći i pruženoj podršci pri radu u Laboratoriju za toksikologiju i izradi ovog diplomskog rada.

Najveća hvala mojim roditeljima i braći na neizmjernom razumijevanju, ljubavi i podršci tijekom studiranja.

Zahvaljujem Danielu i njegovim roditeljima na ljubavi, razumijevanju i 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

### UČINAK RESVERATROLA NA PCB 77 INDUCIRANU PROLIFERACIJU U KULTURAMA STANICA REPRODUKCIJSKOG SUSTAVA

*Kristina Koropatnicki, 785/MB*

**Sažetak:** U ovom radu je ispitan učinak resveratrola na PCB 77 induciranu proliferaciju u kulturama stanica reprodukcijuskog sustava. U tu svrhu koristile su se stanice ovarija kineskog hrčka CHO-K1 i ljudske stanice raka dojke MCF-7. Utjecaj samog resveratrola (5 – 100  $\mu$ M) na CHO-K1 i MCF-7 stanice ispitan je nakon 48h inkubacije metodom MTT. U obje stanične linije statistički značajan inhibitory/citotoksični učinak na proliferaciju imale su koncentracije resveratrola od 75 i 100  $\mu$ M te su upravo stoga u daljnjim pokusima korištene koncentracije resveratrola niže od 75  $\mu$ M. Utjecaj PCB 77 (niske doze: 0,1 – 10  $\mu$ M) na proliferaciju stanica ispitan je metodom *Trypan Blue* nakon 24, 48 i 72h inkubacije. Niske doze PCB 77 (do 5  $\mu$ M) su inducirale proliferaciju, a najveća indukcija stanične proliferacije zabilježena je nakon 72 sata pri koncentracijama PCB 77 od 1 i 5  $\mu$ M na CHO K1 staničnoj liniji te pri 0,5 i 1  $\mu$ M na MCF-7 kulturi stanica. U zadnjoj fazi istraživanja obje kulture stanica su preinkubirane resveratrolom a zatim tretirane s 1  $\mu$ M PCB 77. Resveratrol je efektivno suprimirao PCB-em stimuliranu proliferaciju stanica s izraženijim učinkom u staničnoj liniji kancera dojke.

**Ključne riječi:** resveratrol, PCB 77, MFC-7 stanična linija, CHO-K1 stanična linija, proliferacija

**Rad sadrži:** 57 stranica, 13 slika, 90 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *Izv.prof.dr.sc. Ivana Kmetič*

**Pomoć pri izradi:** *Marina Miletić, mag. ing., asistent*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. *Izv.prof.dr.sc. Igor Slivac*
2. *Izv.prof.dr.sc. Ivana Kmetič*
3. *Izv.prof.dr.sc. Veronika Kovač*
4. *Prof.dr.sc. Višnja Gaurina Srček (zamjena)*

**Datum obrane:** 8. prosinca 2017.

## 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

### EFFECT OF RESVERATROL ON PCB 77 INDUCED PROLIFERATION IN CELL CULTURES OF REPRODUCTIVE SYSTEM

*Kristina Koropatnicki, 785/MB*

**Abstract:** In this study the effect of resveratrol on PCB 77 induced proliferation in cell culture of the reproductive system was tested. Chinese hamster ovary cells CHO-K1 and MCF-7 human breast cancer cells were used for that purpose. Effect of resveratrol itself (5 – 100  $\mu\text{M}$ ) on CHO-K1 and MCF-7 cell cultures has been tested after 48 h incubation by *MTT* method. In both cell lines statistically significant inhibiting/cytotoxic effect on proliferation had the concentration of resveratrol of 75 and 100  $\mu\text{M}$  and therefore, in further experiments, the applied concentration of resveratrol was lower than 75  $\mu\text{M}$ . The effect of PCB 77 (low doses: 0,1 – 10  $\mu\text{M}$ ) on cell proliferation was tested by *Trypan Blue* method after 24, 48 and 72 h incubation. Low doses of PCB 77 (up to 5  $\mu\text{M}$ ) induced proliferation and the largest induction of cell proliferation was observed after 72 hours at PCB 77 concentration of 1 and 5  $\mu\text{M}$  in the CHO-K1 cell line and at 0,5 and 1  $\mu\text{M}$  in MCF-7 cell culture. In the last phase of the study, both cell cultures were pre-incubated with resveratrol and then treated with 1  $\mu\text{M}$  PCB 77. Resveratrol effectively suppressed PCB stimulated proliferation of cells with more pronounced effect in the breast cancer cell line.

**Keywords:** resveratrol, PCB 77, CHO-K1 cell line, MCF-7 cell line, proliferation

**Thesis contains:** 57 pages, 13 figures, 90 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *PhD. Ivana Kmetič, Associate Professor*

**Technical support and assistance:** *BSc. Marina Miletić, Scientific Assistant*

**Reviewers:**

1. PhD. *Igor Slivac*, Associate Professor
2. PhD. *Ivana Kmetič*, Associate Professor
3. PhD. *Veronika Kovač*, Associate Professor
4. PhD. *Višnja Gaurina Srček*, Full Professor

**Thesis defended:** 8 December 2017.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	<b>3</b>
<b>2.1. RESVERATROL</b>	<b>3</b>
2.1.1. Apsorpcija resveratrola	4
2.1.2. Metabolizam resveratrola	5
<b>2.2. BIOLOŠKA SVOJSTVA RESVERATROLA</b>	<b>5</b>
2.2.1. Fitoestrogena svojstva resveratrola	6
2.2.2. Antioksidacijska svojstva resveratrola	7
2.2.3. Antitumorska djelovanja resveratrola	8
2.2.4. Fitoestrogeni kao predtretman organskim ksenobioticima	9
<b>2.3. POLIKLORIRANI BIFENILI (PCB)</b>	<b>11</b>
2.3.1. Izvori PCB-a i izloženost PCB-ima	12
<b>2.4. UTJECAJ PCB-a NA ZDRAVLJE</b>	<b>13</b>
2.4.1. Dioksinu slični i <i>ortho</i> -supstituirani PCB-i	13
2.4.2. Ah-receptor	14
2.4.3. Karcinogenost PCB-a	14
2.4.4. PCB-i kao agonisti i antagonisti estrogena	15
<b>2.5. PCB 77</b>	<b>16</b>
2.5.1. Djelovanje PCB 77 i utjecaj na proliferaciju stanica	17
<b>2.6. TESTOVI TOKSIČNOSTI</b>	<b>18</b>
2.6.1. Alternativni testovi toksičnosti	18
<b>2.7. STANIČNE LINJE</b>	<b>19</b>
2.7.1. CHO-K1 stanična linija	19
2.7.2. MCF-7 stanična linija	19
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	<b>21</b>
<b>3.1. MATERIJAL</b>	<b>21</b>
3.1.1. Biološki materijal	21
3.1.2. Kemikalije	21
3.1.3. Otopine i puferi	22
3.1.4. Oprema i uređaji	27
<b>3.2. METODE RADA</b>	<b>28</b>
3.2.1. Uzgoj i održavanje stanica u kulturi	28
3.2.2. Određivanje učinka resveratrola na proliferaciju CHO-K1 i MCF-7 stanica metodom <i>MTT</i>	28
3.2.2.1. <i>Određivanje učinka resveratrola na proliferaciju CHO-K1 stanica metodom MTT</i>	29
3.2.2.2. <i>Određivanje učinka resveratrola na proliferaciju MCF-7 stanica metodom MTT</i>	29
3.2.3. Određivanje učinka PCB 77 na proliferaciju CHO-K1 i MCF-7 stanica metodom <i>Trypan Blue</i>	30
3.2.3.1. <i>Određivanje broja stanica metodom Trypan Blue</i>	30
3.2.3.2. <i>Određivanje učinka PCB 77 na proliferaciju CHO-K1 stanica metodom Trypan Blue</i>	31
3.2.3.3. <i>Određivanje učinka PCB 77 na proliferaciju MCF-7 stanica metodom Trypan Blue</i>	31
3.2.4. Određivanje učinka predtretmana resveratrolom na PCB 77 induciranu proliferaciju CHO-K1 i MCF-7 stanica metodom <i>Trypan Blue</i>	32
3.2.4.1. <i>Određivanje učinka predtretmana resveratrolom na PCB 77 induciranu proliferaciju na CHO-K1 stanicama metodom Trypan Blue</i>	32
3.2.4.2. <i>Određivanje učinka predtretmana resveratrolom na PCB 77 induciranu proliferaciju na MCF-7 stanicama metodom Trypan Blue</i>	32
<b>3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA</b>	<b>33</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	<b>34</b>



<b>4.1. UČINAK RESVERATROLA NA PROLIFERACIJU CHO-K1 I MCF-7 STANICA ODREĐEN METODOM MTT</b>	<b>35</b>
4.1.1. Učinak resveratrola na proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom <i>MTT</i>	35
4.1.2. Učinak resveratrola na proliferaciju MCF-7 stanica određen metodom <i>MTT</i>	36
<b>4.2. UČINAK PCB 77 NA PROLIFERACIJU CHO-K1 I MCF-7 STANICA ODREĐEN METODOM TRYPAN BLUE</b>	<b>38</b>
4.2.1. Učinak niskih doza PCB 77 na proliferaciju CHO-K1 stanica	38
4.2.2. Učinak niskih doza PCB 77 na proliferaciju MCF-7 stanica	40
4.2.3. Usporedba učinka PCB 77 na proliferaciju CHO-K1 i MCF-7 stanica nakon 72 sata	42
<b>4.3. UČINAK RESVERATROLA NA PCB 77 INDUCIRANU PROLIFERACIJU U CHO-K1 I MCF-7 STANICAMA ODREĐEN METODOM TRYPAN BLUE</b>	<b>43</b>
4.3.1. Učinak resveratrola na PCB 77 induciranu proliferaciju u CHO-K1 stanicama	43
4.3.2. Učinak resveratrola na PCB 77 induciranu proliferaciju u MCF-7 stanicama	44
<b>5. ZAKLJUČCI</b>	<b>47</b>
<b>6. LITERATURA</b>	<b>49</b>

# 1. UVOD

Resveratrol je polifenol koji se nalazi u grožđu, bobičastom voću, kikirikiju i nekim biljkama koje se tradicionalno koriste u japanskoj medicini. Znanstveni interes prema resveratrolu kontinuirano raste od 1997. godine kada je prvi puta demonstrirano njegovo antitumorsko djelovanje na miševima. Zadnjih nekoliko godina resveratrolu se pridodaje značajna pažnja zbog protuupalnih, antitumorskih i antioksidativnih svojstava, ali i zbog sposobnosti povećanja životnog vijeka u nižim organizmima i poboljšanja općenitog zdravlja sisavaca. Posebna pažnja pridodana je njegovom utjecaju na proces tumorigeneze, što ukazuje na potencijalnu primjenu resveratrola kao terapijskog, ali i kemopreventivnog sredstva. Mnoga *in vitro* istraživanja su bila usmjerena na antiproliferativna i apoptotička djelovanja resveratrola preko aktivacije intracelularnih molekula tumor supresora ili regulacije staničnog ciklusa. Osim toga, resveratrol je okarakteriziran kao fitoestrogen s obzirom na njegovu sposobnost da se veže i aktivira receptore estrogena i na taj način regulira transkripciju estrogen ovisnih gena.

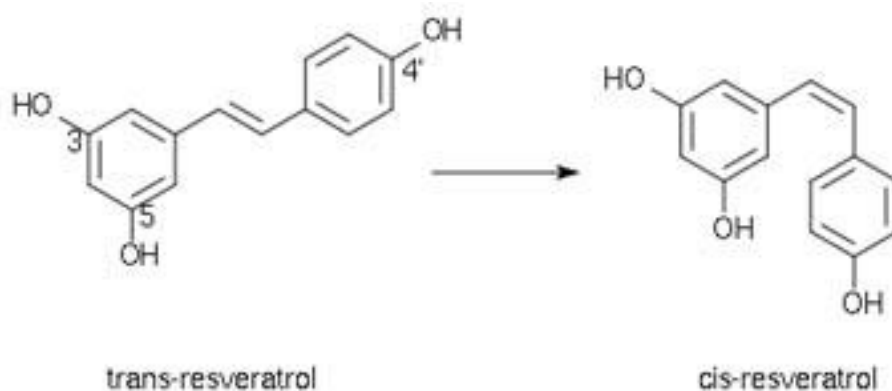
Poliklorirani bifenili (PCB-i) su organski klorirani spojevi, sintetski proizvedeni, čija je proizvodnja zabranjena 1979. godine. Do zabrane, PCB-i su imali veliku primjenu u industriji zbog svojih dielektričnih i termoizolacijskih svojstava. Građeni su od dva benzenska prstena u kojima su neki ili svi atomi vodika supstituirani atomima klora u *ortho*, *meta* ili *para* položaju. Zbog svoje dugovječnosti, klasificiraju se u skupinu postojanih organskih zagađivača (eng. persistent organic pollutants, POPs), a budući da su lipofilnog karaktera akumuliraju se u masnom tkivu životinja i ljudi što dovodi do njihove biomagnifikacije u okolišu. PCB-i, koji se klasificiraju kao planarni, dijele strukturnu sličnost i toksični način djelovanja s dioksinom što im omogućava vezanje na Ah-receptor te se zbog toga još nazivaju „dioksinu slični“ PCB-i. Dokazano je da PCB-i djeluju kao endokrini modulatori time što npr. blokiraju djelovanje tiroidne žlijezde, a osim toga pokazuju neurotoksično i imunotoksično djelovanje kao i negativno djelovanje na reprodukcijski sustav. Mnogi od njih su i tumorski promotori.

Cilj ovoga rada je ispitati mogući supresivni učinak resveratrola na proliferaciju stanica tkiva reproduktivnog sustava, induciranu djelovanjem PCB 77. Stanice koje su se koristile prilikom izrade diplomskog rada su stanice ovarija kineskog hrčka CHO-K1 i MCF-7, ljudske tumorske stanice dojke.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. RESVERATROL

Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) je prirodni polifenol strukture stilbena. Sintetiziraju ga biljke kao odgovor na ozljedu ili napad patogena kao što su to bakterije i gljivice. Kemijsku strukturu resveratrola je okarakterizirao Takaoka 1940. godine izoliravši ga iz korijena biljke čemerike, *Veratrum grandiflorum* (Takaoka, 1940). U Indiji se više od 2000 godina pripremaju medicinski pripravci (*darakchasava*, *munakka*) čiji je osnovni sastojak polifenol resveratrol (Paul i sur., 1999). Osnovna struktura resveratrola se sastoji od dva fenolna prstena povezana dvostrukom stirenskom vezom koja tvori 3,5,4'-trihidroksistilben (Slika 1). Ova dvostruka veza je odgovorna za izometrijske *cis*- i *trans*- oblike resveratrola te je potrebno spomenuti da je *trans*-izomer najstabilniji sa steričke točke gledišta (Trela i Waterhouse, 1996).



**Slika 1.** Strukturna formula *trans*-resveratrola i *cis*-resveratrola (Cottart i sur., 2010)

Postoji mnogo prirodnih i sintetskih analoga resveratrola, kao i adukata, derivata i konjugata, uključujući i glikozide. Osim u skupinu polifenola, resveratrol spada i u skupinu fitoaleksina, spojeva niske molekulske mase koji imaju sposobnost inhibirati napredovanje određenih infekcija. Akumulacija tih tvari u biljkama posljedica je mehanizma otpornosti na parazite i druge nepovoljne uvjete poput gljivične infekcije, UV zračenja, kemijskih tvari i općenito stresnih čimbenika, a proizvodi ga više od 70 biljaka kao odgovor na takve uvjete (Maier-Salamon i sur., 2011).

Resveratrol se može naći u nekim plodovima koji su dio ljudske prehrane, kao što su borovnice (*Vaccinium spp.*), kupine (*Morus spp.*) i kikiriki (*Arachis hypogaea*), međutim crveno vino glavni je izvor resveratrola u mediteranskoj prehrani (Soleas i sur., 1997a). Sadržaj resveratrola u crvenom vinu potječe od grožđa (*Vitaceae*), a najbogatiji izvori su koža, sjeme, peteljke i drveni dijelovi. Zbog toga je crveno vino bogatije resveratrolom od bijelog vina, jer se tijekom proizvodnje crvenog vina maceriraju dijelovi grožđa u kojima je prisutan resveratrol, što se ne događa prilikom proizvodnje bijelog vina. Nastajanje alkohola tijekom fermentacije grožđa olakšava topljivost resveratrola a time i njegovu ekstrakciju (Soleas i sur., 1997b; Siemann i Creasy, 1992).

Iako je manje važno u našoj kulturi, najbogatiji izvor resveratrola je biljka japanski dvornik, *Polygonum cuspidatum*, čiji ekstrakt korijena ima važnu ulogu u japanskoj i kineskoj tradicionalnoj medicini, te je glavni sastojak pripravka *ko-jo-kon*, koji se koristi u liječenju nekoliko kardiovaskularnih bolesti (Nonomura i sur., 1963). Kada je oštećena bilo kakvim kemijskim postupkom, biljka čemerika, *Veratrum grandiflorum*, ima visoki sadržaj resveratrola u listovima (Hanawa i sur., 1992). Nadalje, korijen i rizomi biljke *Veratrum formosanum*, jedne od mnogih vrsta čemerike, također su bogati resveratrolom, a pripravci ove biljke tradicionalno su korišteni u istočnoj Aziji za liječenje hipertenzije (Chung i sur., 1992).

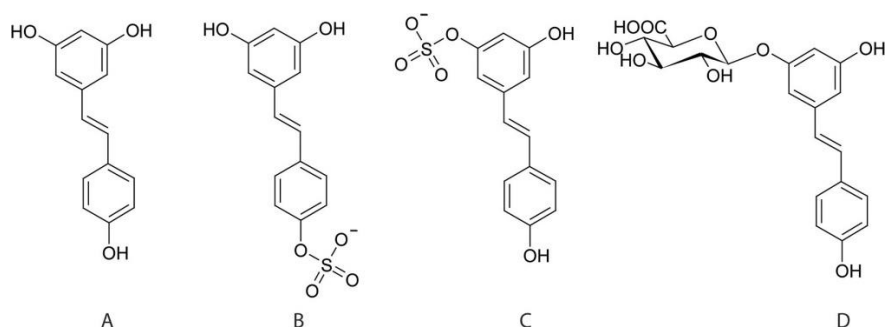
### 2.1.1. Apsorpcija resveratrola

Kemijska struktura resveratrola dovodi do slabe topljivosti u vodi ( $<0,05 \text{ mg ml}^{-1}$ ), što utječe na njegovu apsorpciju. Kako bi se povećala topljivost upotrebljava se etanol ili neko drugo organsko otapalo. Važno je istaknuti sposobnost resveratrola da tvori široki raspon organskih molekulskih kompleksa, a zamjenom hidroksilnih skupina s alifatskim molekulama može se povećati njegova apsorpcija i stanična propusnost, npr. acetilacijom resveratrola može se povećati njegova apsorpcija bez smanjenja ili gubitka aktivnosti (Colin i sur., 2009; Marel i sur., 2008).

Zbog svojih kemijskih svojstava, resveratrol može stupati u interakcije s masnim kiselinama, koje pružaju lipofilno okruženje što pogoduje vezanju resveratrola (Jannin i sur., 2004). Nedavne studije *in vitro* pokazuju da se više od 90% slobodnog *trans*-resveratrola veže na lipoproteine ljudske plazme, što je potvrđeno i u *in vivo* istraživanjima (Urpi-Sarda i sur., 2007).

### 2.1.2. Metabolizam resveratrola

Resveratrol se može metabolizirati u crijevima i/ili jetri. Ako resveratrol nije metaboliziran putem jetre, njegovo vrijeme poluživota traje otprilike 14 minuta. U jetri se konjugati resveratrola vežu s detoksificirajućim molekulama tvoreći glukuronide i konjugate sulfata (Slika 2) povećavajući time vrijeme poluživota na 9 sati. Prolazeći kroz jetru resveratrol se konjugira sa sulfatima i tvori glukuronide, međutim istovremena konzumacija kvercetina ili piperina odgađa konjugaciju u jetri i omogućava neposrednu dostupnost slobodnog nevezanog resveratrola u krvotoku. U crijevima resveratrol mijenja sastav mikroflore, osobito *Bifidus* vrsta, kako bi povisio potrošnju kalorija što u konačnici dovodi do mršavosti i regulacije težine. Enzimi glukuronidaze kataliziraju disocijaciju resveratrola s glukuronida na mjestima infekcije, upale i malignosti (ResveratrolNews, 2016).



**Slika 2.** struktura resveratrola i njegova tri glavna metabolita; resveratrol (A), resveratrol-4-O-sulfat (B), resveratrol-3-O-sulfat (C), resveratrol-3-O-glukuronid (D) (Calamini i sur., 2010).

## 2.2. BIOLOŠKA SVOJSTVA RESVERATROLA

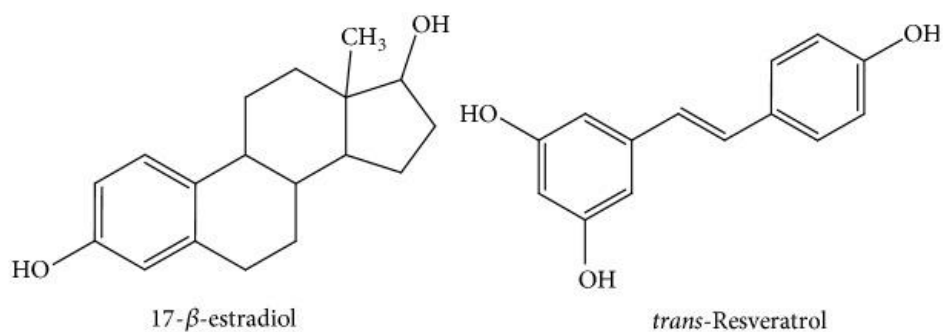
Blagotvorna svojstva fenolnih spojeva prisutnih u grožđu i vinu proučavana su nakon otkrića „francuskog paradoksa“. Ovaj se pojam odnosi na činjenicu da u sjevernoj Francuskoj postoji visoki unos zasićenih masnoća, ali niska smrtnost od koronarne bolesti srca u usporedbi s drugim zemljama gdje je isto prisutan visoki unos zasićenih masnoća, što je paradoks koji se prema brojnim istraživanjima može pripisati visokoj potrošnji crvenog vina (Renaud i de Lorgeril, 1992).

Zbog svojih fizikalnih i kemijskih svojstava, resveratrol može pasivno prolaziti staničnu membranu ili stupati u interakcije s membranskim receptorima, što daje zaključiti da može stupiti

u interakcije s izvanstaničnim i unutarstaničnim molekulama. Iz tog razloga, mehanizam djelovanja resveratrola na staničnoj razini može potaknuti aktiviranje signalnih puteva tako da se veže na receptore stanične membrane, aktiviranjem intracelularnih mehanizama ili razvijanjem vlastitog djelovanja unutar jezgre (Gambini i sur., 2015).

### 2.2.1. Fitoestrogena svojstva resveratrola

Epidemiološki dokazi pokazuju da fitoestrogeni inhibiraju nastanak i rast raka, smanjuju razinu kolesterola i pokazuju prednost u liječenju osteoporoze. Neke od tih aktivnosti posredovane su interakcijom fitoestrogena s estrogenim receptorima alfa i beta (ER- $\alpha$  i ER- $\beta$ ). Resveratrol ima sposobnost vezanja i na ER- $\alpha$  i na ER- $\beta$  iako su te interakcije 7000 puta slabije od vezanja estradiola. Stanične linije karcinoma dojke osjetljive na estrogen, a osobito MCF-7 humane stanice raka dojke, opsežno su se koristile u istraživanjima usmjerenim na analizu mehanizama kojima hormoni utječu na staničnu proliferaciju i sintezu proteina (Aitken i Lippman, 1985.). Istraživanje je pokazalo se da se resveratrol veže na estrogene receptore u citosolnim ekstraktima iz MCF-7 stanične linije i maternice štakora (Bowers i sur., 2000). Kemijska struktura resveratrola je slična strukturi 17- $\beta$ -estradiola (Slika 3) ili sintetskih estrogena kao što je dietilstilbestrol te je stoga provedeno nekoliko istraživanja kako bi se ispitala njegova sposobnost djelovanja kao fitoestrogena (Ashby i sur., 1999).



**Slika 3.** Usporedba kemijske strukture 17- $\beta$ -estradiola i *trans*-resveratrola (Gambini i sur., 2015).

Estrogeni i fitoestrogeni iskazuju gotovo sve svoje učinke vezanjem na receptore estrogena. Kada se estrogen veže na svoj receptor, aktivira se transkripcija ciljnih gena. Utvrđeno je da su geni koji kodiraju za antioksidacijske enzime regulirani ovim mehanizmom (Borrás i

sur., 2005). Resveratrol se može vezati na receptore estrogena i aktivirati transkripciju takvih gena pri istim koncentracijama koje su potrebne i za druge biološke učinke, na temelju čega su znanstvenici 1997. godine pokazali da se resveratrol ponaša kao analog estradiola za što su koristili MCF-7 staničnu liniju, bogatu receptima estrogena (Gehm i sur., 1997). Maksimalna učinkovitost vezanja je bila pri koncentraciji od 10  $\mu$ M. Zatim su posljedično aktivirani geni sa elementima koji reagiraju na estrogene (eng. *estrogen response elements*, ERE). Kako bi potvrdili da resveratrol aktivira ERE, koristili su antagoniste estrogena i učinak je bio inhibiran. Nasuprot tome, pokazano je da resveratrol pri višim koncentracijama, u svojstvu modulatora estrogenih receptora, može smanjiti učinak estradiola na povećanje proliferacije MCF-7 stanica. S obzirom na estrogenu aktivnost resveratrola, pokazalo se da nema nikakvog utjecaja na rast i diferencijaciju maternice štakora (Turner i sur., 1999).

### 2.2.2. Antioksidacijska svojstva resveratrola

Dokazano je da resveratrol smanjuje oksidativni stres i ublažava upalu, što objašnjava mnoge njegove zdravstvene koristi. Oksidacijski stres nastaje kada se višak reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS) generira iz različitih izvora, uključujući lanac transporta elektrona u mitohondrijima. ROS mogu oštetiti makromolekule i aktivirati signalne puteve koji uključuju niz upalnih medijatora (Roberts i sur., 2009). Upale, zauzvrat, mogu dovesti do daljnjeg oksidacijskog stresa u ciklusu koji pridonosi napredovanju mnogih bolesti. Ateroskleroza, dijabetes, kronična bolest pluća, neurodegenerativne bolesti i rak su primjeri bolesti povezanih sa ROS induciranom kroničnom upalom (Kaneto i sur., 2010; Cieniewicz i sur., 2008). Laboratorijski modeli upućuju na to da se te bolesti mogu spriječiti i izliječiti smanjenjem ROS, što bi se moglo postići resveratrolom (Robb i sur., 2008).

Antioksidacijska aktivnost resveratrola utvrđena je u izoliranim mitohondrijima mozga štakora. Potvrđena je njegova aktivnost u sposobnosti vezanja nesparenih elektrona, te može inhibirati i komplekse koji otpuštaju slobodne radikale (Zini i sur., 1999).

Većina objavljenih *in vitro* studija izvještava da se koriste previsoke koncentracije resveratrola koje se u organizmu ne mogu postići konzumacijom crvenog vina. Stoga je vrlo važno osigurati da niske koncentracije slobodnog resveratrola u plazmi budu dovoljne da djeluju antioksidacijski. S obzirom na to, pokazalo se da su nutritivno mjerodavne koncentracije resveratrola sposobne smanjiti razinu  $H_2O_2$  u MCF-7 stanicama inducirajući ekspresiju gena koji



kodiraju za antioksidacijske enzime, poput katalaze i mangan superoksid dizmutaze, preko mehanizma koji uključuju signalni put fosfataze i tenzinskog homologa i protein kinaze B (Inglés i sur., 2014).

Također, pokazalo se da resveratrol štiti primarne hepatocite u kulturi od oštećenja oksidacijskim stresom povećanjem aktivnosti katalaze, superoksid dizmutaze, glutation peroksidaze, NADPH Q oksidoreduktaze i glutation-S-transferaze. Resveratrol povećava koncentraciju nuklearnog transkripcijskog faktora 2 (Nrf2) i potiče njegovu translokaciju u jezgru. Nrf2 se u jezgri veže na DNA i tako aktivira gene koji kodiraju za odgovarajuće antioksidacijske enzime (Rubiolo i sur., 2008).

Unatoč antioksidacijskom djelovanju resveratrola, može doći do procesa autooksidacije, što dovodi do nastanka slobodnih kisikovih radikala,  $H_2O_2$  i složene smjese polikinona i kinona, koje mogu postati citotoksične (Sang i sur., 2007). Oksidirana molekula resveratrola može stvarati komplekse s bakrom, koji zatim mogu izazvati cijepanje DNA (Hadi i sur., 2010).

### 2.2.3. Antitumorska djelovanja resveratrola

Apoptoza je proces stanične smrti kojim specifične stanice prolaze kroz programirani niz biokemijskih procesa čiji je vrhunac uklanjanje tih stanica. Apoptoza je normalni fiziološki proces koji funkcionira kao kontrola stanične populacije tijekom embriogeneze i imunološkog odgovora (Kerr i sur., 1994). Nekoliko znanstvenih radova je dokazalo povezanost između stanične proliferacije, raka i apoptoze. U mnogim *in vitro* istraživanjima resveratrol je pokazao snažno antitumorsko djelovanje.

Resveratrol može stupiti u interakciju sa  $\alpha V\beta 3$  receptorom integrina u MCF-7 staničnoj liniji inducirajući apoptozu (Lin i sur., 2006). Osim toga, resveratrol pokazuje antagonističko djelovanje dioksinu i drugim AhR ligandima kada se veže na Ah-receptor (Casper i sur., 1999).

Djelovanje resveratrola je na prijelazu iz  $G_1$ - u S-fazu staničnog ciklusa pri čemu je taj prijelaz zaustavljen. Takvi učinci su zabilježeni u stanicama raka prostate (Hsieh i Wu., 1999).

Neka istraživanja pokazuju da resveratrol može iskoristiti svoje antitumorsko djelovanje pri inicijaciji i napredovanju raka u tumorskim stanicama. U tom smislu je pokazano kako resveratrol može inhibirati ciklooksigenazu 1 (COX-1), vrlo aktivni enzim koji je uključen u napredovanje tumora. U fazi inicijacije tumorskih stanica resveratrol inhibira stvaranje slobodnih radikala na stanicama leukemije HL-60. U stanicama jetre (Hepa 1c1c7) inducira aktivnost kinon

reduktaze, enzima koji je odgovoran za metaboličku detoksikaciju karcinogena (Jang i sur., 1997). Antitumorsko djelovanje resveratrola u MCF-7 stanicama također je povezano s smanjenjem razine Bcl-2 i inhibicijom NF- $\kappa$ B transkripcijskog faktora te indukcijom apoptoze (Pozo-Guisado i sur., 2005). U koncentracijama između 10 i 40  $\mu$ M inducira apoptozu putem aktivacije p53 proteina u humanim stanicama limfoblasta (Huang i sur., 1999). Isto tako, resveratrol je inhibitor ribonukleotid reduktaze ili aktivnosti COX-2 zbog čega ima antitumorsko djelovanje kada se primjenjuje u *in vitro* istraživanjima (Fontecave i sur., 1998; Moreno, 2000).

*In vivo* istraživanja također pokazuju korisne učinke resveratrola. Njegov preventivni učinak na inicijaciju raka utvrđen je u životinjskom modelu raka kože (Jang i sur., 1997). Stoga, *in vivo* istraživanja podržavaju antitumorske povoljne učinke koji su prethodno vidljivi i u *in vitro* istraživanjima (Baur i Sinclair, 2006).

#### 2.2.4. Fitoestrogeni kao predtretman organskim ksenobioticima

Fitoestrogeni se mogu razmatrati kao neka vrsta prirodnih endokrinih modulatora budući da se ponašaju kao agonisti i antagonisti estrogena. Fitoestrogeni imaju djelomično antagonistički utjecaj na stimulaciju proliferacije estrogen ovisnih MCF-7 stanica raka dojke uzrokovanu djelovanjem sintetskih estrogena kao što su alkilfenoli, bisfenol A i PCB-i. Takva istraživanja ukazuju da fitoestrogeni mogu konkurirati drugim estrogenim modulatorima za zajedničke biološke ciljeve, vršeći tako protektivnu funkciju. Neki od fitoestrogena i flavonoida koji su se istraživali su genistein, kvercetin, kurkumin, betanin, resveratrol, vitamin A, vitamin E itd.

Kapadia i suradnici su istraživali antitumorsku učinkovitost aktivne tvari ekstrakta crvene repe – betanina. Za istraživanje citotoksičnih učinaka koristili su androgen neovisne stanice raka prostate PC-3 i MCF-7 estrogen ovisne stanice raka dojke, te netumorske stanice kože FC i jetre HC. U sve četiri stanične linije došlo je do inhibicije citotoksičnog učinka ovisnog o dozi betanina. Kada je testiran u koncentraciji od 29  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, ekstrakt repe nastavio je smanjivati brzinu rasta PC-3 stanica (Kapadia i sur., 2011).

Kurkumin prisutan u kurkumi inhibira rast hormon ovisnih i neovisnih staničnih linija kao i tzv. *multidrug-resistant (MDR)* staničnih linija. (Mehta i sur., 1997).

Vitamin A je proučavan zbog svoje sposobnosti da inhibira PCB induciranu karcinogenezu jetre štakora. Dokazano je da povećani unos vitamina A inhibira promicanje

izmijenjenih jetrenih žarišta uzrokovanih djelovanjem PCB 77, PCB 153 i njihovim kombinacijama (Robertson i Hansen, 2001).

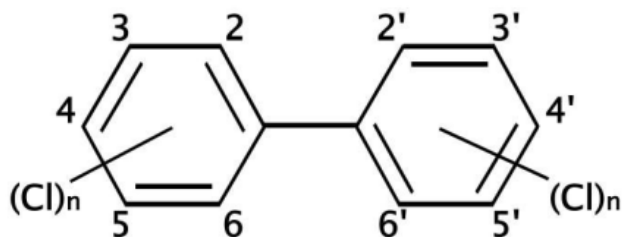
Predtretman Spargue-Dawley štakora biljkom *Pueraria mirifica* (bogata fitoestrogenima), u koncentraciji od 1000 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne težine, rezultira smanjenju 7,12-DMBA induciranih tumora dojke štakora (Cherdshewasart i sur., 2007).

Istraživanja su također dokazala da predtretman vitaminom E u potpunosti može blokirati oksidacijski stres i disfunkciju endotelijske barijere prouzrokovano djelovanjem PCB 77, što upućuje na jedinstvena protektivna svojstva (Robertson i Hansen, 2001). Protektivno djelovanje vitamina E dokazano je i na stanicama ovarija kineskog hrčka nakon tretmana stanica PCB-ima (PCB 77 i PCB 153) pri čemu je izraženiji učinak vitamin E pokazao na stanicam tretiranim s *ortho*- supstituiranim kongenerom (Murati i sur., 2017).

Baker i Bauer (2015) su, između ostalog, istraživali supresivni utjecaj predtretmana katehinom iz zelenog čaja na PCB 102 induciranu proliferaciju MCF-7/BOS stanica. Zaključili su da EGCG (epigalokatehin galat) inhibira staničnu proliferaciju u koncentracijama od 10 do 50 μM.

### 2.3. POLIKLORIRANI BIFENILI (PCB)

Poliklorirani bifenili (PCB), izvornog naziva „klorirani difenili“, odnose se na skupinu kemijski srodnih spojeva koji se prirodno ne pojavljuju u okolišu. Ti aromatski, sintetski spojevi sastoje se od bifenilne strukture s dva povezana benzenska prstena u kojima su neki ili svi atomi vodika supstituirani atomima klorina. Osnovna molekularna struktura, uključujući i konvencionalno numeriranje položaja supstituenta, prikazano je na Slici 4.



**Slika 4.** Strukturna formula polikloriranih bifenila (ATSDR, 2000)

Kemijska formula PCB-a je  $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ , gdje je  $n$  u rasponu od 1 do 10, a predstavlja broj atoma klorina. Supstituirani atomi klorina u molekuli PCB-a se mogu nalaziti u *ortho* (2, 2', 6, 6'), *meta* (3, 3', 5, 5') i *para* (4, 4') položaju (Kmetič i sur., 2012). S obzirom na broj atoma klorina vezanih na benzenske prstenove, postoji ukupno 209 mogućih PCB kongenera s različitim fizikalno-kemijskim svojstvima (Rudel i sur., 2008).

PCB-i su prvi put otkriveni krajem 19. stoljeća, a njihova komercijalna proizvodnja u SAD-u je započela 1929. godine. Formirani su pomoću elektrofilne klorinacije bifenila s plinom klorom. Iako je teoretski moguće 209 različitih PCB kongenera, samo se 130 nalazi u komercijalnim smjesama. Zbog svojih izolacijskih svojstava i otpornosti na vatru, PCB-i su bili široko rasprostranjeni i korišteni u industriji u gotovo svim zemljama svijeta (UNEP, 1999).

Ovisno o stupnju kloriranja, kemijska svojstva PCB-a mogu varirati. Svi spojevi PCB-a su lipofilnog karaktera i njihova lipofilnost se povećava s povećanjem stupnja kloriranja. Međutim, imaju vrlo nisku topljivost u vodi. Čisti spojevi PCB-a su bezbojni i često kristalični. Kongeneri s nižim stupnjem kloriranja su nestabilna i hlapiva bezbojna ulja, dok kongeneri s višim stupnjem kloriranja tvore viskozne tekućine ili amorfne krute tvari, žute ili svijetlo žute boje, koje ne kristaliziraju ni pri niskim temperaturama (Ross, 2004; Safe, 1993).

Zbog svoje visoke točke plamišta (170-380°C), PCB-i su otporni na vatru, a stvaraju pare koje su teže od zraka, ali nisu eksplozivne (WHO 2000). Imaju nisku električnu vodljivost i visoku toplinsku vodljivost, a na temelju tih svojstava korišteni su kao dielektrični izolatori u električnoj opremi. PCB-i su korišteni u mnogim uredskim zgradama, bolnicama, školama i tvornicama kako bi se smanjio rizik od požara (Ishikawa i sur., 2007).

### 2.3.1. Izvori PCB-a i izloženost PCB-ima

Istraživanja provedena u različitim dijelovima svijeta pokazala su veliku rasprostranjenost PCB-a u okolišu (WHO, 2000). Iako su se PCB-i komercijalno počeli proizvoditi 1929. godine, njihova distribucija u okoliš nije prepoznata sve do 1966. godine, kada je Jensen identificirao PCB-e u uzorcima ljudi i divljih životinja (Jensen, 1966).

Nekoliko provedenih istraživanja je mjerilo razine PCB-a u zraku te se došlo do zaključka da se koncentracije značajno razlikuju ovisno o lokacijama. Najniže razine, od 0,002 ng m<sup>-3</sup> su izmjerene u neindustrijskim i nekontaminiranim područjima, dok su u regiji Ruhr u Njemačkoj izmjerene razine od 3,3 ng m<sup>-3</sup>. U blizini odlagališta otpada na području bivše Jugoslavije i blizu industrijskih postrojenja u Japanu pronađene su razine do 45 i 650 µg m<sup>-3</sup>. Istraživanja su pokazala da se više razine PCB-a nalaze u zatvorenom prostoru nego na otvorenom. U SAD-u razine PCB-a u zatvorenom prostoru su bile u rasponu od 44 do 240 ng m<sup>3</sup>, dok je maksimalna vanjska razina bila 18 ng m<sup>-3</sup>. Razina PCB-a u zraku bila je dva puta veća (427 ± 223 ng m<sup>-3</sup>) u zgradama koje su sadržavale transformatore sa PCB-em nego u zgradama bez njih (229 ± 106 ng m<sup>-3</sup>). Najviše razine u zatvorenim prostorima (do 7500 ng m<sup>-3</sup>) zabilježene su u zgradama izgrađenim od montažnih betonskih elemenata zapečaćenih elastičnim materijalima koji sadrže PCB (WHO 2000).

Poput mnogih organokloriranih spojeva, kongeneri PCB-a su vrlo postojani i akumuliraju se unutar hranidbenog lanca. Pretpostavlja se da opća populacija ima najveću izloženost PCB-ima unosom hrane. Budući da se akumuliraju u prehrambenom lancu, hrana životinjskog podrijetla važan je izvor izloženosti (Liem i sur., 2000). Biljke sadrže niže razine PCB-a koje su tek tolike da ih se može detektirati (WHO 2000).

Kao što je spomenuto, PCB-i su vrlo postojani i mogu se pohraniti u vodi, tlu i različitim sedimentima tijekom duljih razdoblja. Kada se jednom ispuste u okoliš, PCB-i se vrlo teško razgrađuju i opstaju duže vrijeme. Na taj način PCB-i kruže između zraka, vode i tla u prirodi pri

čemu se progresivno nagomilavaju, posebice u masnim tkivima pojedinih pripadnika hranidbenog lanca (Kmetič i sur., 2012). Tako npr. konzumacija ribe podrijetlom iz voda kontaminiranih PCB-ima, može predstavljati jedan od važnih puteva izloženosti. Osim konzumacije morske hrane i ribe, povećane razine PCB-a kod ljudi može uzrokovati i unos masnog tkiva kopnenih životinja, kao što su perad, svinjetina ili govedina (Bergkvist i sur., 2008).

Dok riba i tradicionalna prehrana od mesa predstavljaju glavne izvore izloženosti PCB-ima u odraslih, istraživanja pokazuju da najveći izvor izloženosti u male djece predstavljaju mliječni proizvodi. Osim što su PCB-i pronađeni u kravljem mlijeku, pokazalo se da su i najčešći kemijski kontaminanti prisutni u ljudskom mlijeku (Patandin i sur., 1999).

Razine prijavljene u vodi za piće su između 0,1 i 0,5 ng L<sup>-1</sup>. Osoba koja pije 2 L vode dnevno koja sadrži 0,5 ng L<sup>-1</sup> PCB-a biti će izložena dnevnoj dozi od 0,01 do 0,02 ng kg<sup>-1</sup> (tjelesna težina 50-100 kg) (WHO 2000).

Srećom, zbog prestanka proizvodnje i korištenja PCB-a te čišćenja jako zagađenih mjesta, značajno je smanjena izloženost istima kroz prehranu i vodu. Međutim, izloženost PCB-u od udisanja zraka u područjima kontaminiranim PCB-ima postaju sve važnija i postoji mnogo studija koje pokušavaju razjasniti mehanizme između izloženosti i njegovih štetnih bioloških učinaka.

## 2.4. UTJECAJ PCB-A NA ZDRAVLJE

### 2.4.1. Dioksinu slični i *ortho*-supstituirani PCB-i

Kako bi se lakše okarakterizirali zdravstveni učinci PCB-a, na temelju sličnosti toksičnosti u usporedbi s 2,3,7,8-tetraklorodibenzodioksinom (TCDD, dioksin), strukturno srodnim polikloriranim dibenzo-*p*-dioksinom (PCDD) i dibenzofuranom (PCDF), PCB-i su podijeljeni u dvije skupine, planarne (dioksinu slične) PCB-e i neplanarne PCB-e. Dioksinu slični PCB-i su supstituirani atomima klora u oba *para* (4,4') i dva ili više *meta* (3,3'/5,5') položaja i mogu sadržavati samo jedan supstituent u *ortho* položaju. U njihovoj planarnoj konformaciji kongeneri su izosterični s dioksinom te su određeni kao koplanarni PCB-i, što im omogućava vezanje na Ah-receptor. Bandiera i suradnici su prvi izvjestili da se koplanarni PCB-i kompetitivno vežu na Ah-receptor (AhR) (Bandiera i sur., 1982). Neplanarni PCB-i sadrže

supstituirane atome klora u *ortho* položaju i tako poprimaju neplanarnu strukturu (Safe, 1994). Smatra se da su PCB-i koji sadrže atome klora u *ortho* položaju manje toksični od dioksinu sličnih PCB-a koji zbog svog vezanja na Ah-receptor djeluju kancerogeno, imunotoksično i toksično na reproduksijski sustav i razvoj. Iako se neplanarni PCB-i ne vežu značajno na receptor, također mogu izazvati kancerogene i neurotoksične efekte (Costa i sur., 2007).

#### 2.4.2. Ah-receptor

Ah-receptori su ligand ovisni proteini koji se vežu na DNA. Nakon specifičnog vezanja liganda na Ah-receptor, ligand-receptor kompleks se veže na specifičnu promotorsku DNA sekvencu DRE (eng. *dioxin-responsive enhancer*). DRE sekvenca je odgovorna za ekspresiju niza gena, kao što su to citokrom P450IA1, citokrom P450IA2 i citokrom P450IB, koji kodiraju za enzime – oksidaze faze I biotransformacije. Koplanarni PCB-i su induktori citokrom p450IA1, a jedan od njihovih predstavnika je i PCB 77 (Toborek i sur., 1995).

#### 2.4.3. Kancerogenost PCB-a

Da bi se kvalificirali kao inicijatori karcinoma, PCB-i bi trebali inducirati genotoksične događaje koji mogu dovesti do stalnih promjena u sekvenci DNA. Iako nije utvrđeno da su aktivni u točkastim mutacijama, izloženost PCB-u mogla bi dovesti do značajnog povećanja broja lomova u dvolančanoj DNA te kromosomskih aberacija u *in vivo* i *in vitro* istraživanjima (Knerr i Schrenk, 2006; Robertson i Hansen, 2001). Novija istraživanja su pokazala da se neki PCB-i kovalentno vežu za DNA i proteine što bi moglo povećati mogućnost oštećenja DNA (Pereg i sur., 2002). Budući da kromosomske rekombinacije i dvolančani lomovi DNA mogu rezultirati gubitkom tumor supresorskih gena ili aktivacijom protoonkogeno, ovi rezultati pokazuju da PCB-i mogu biti klastogeni i doprinijeti inicijaciji raka.

Ne samo da mogu inicirati tumore, PCB-i također djeluju i kao promotori u indukciji tumora. Dokazano je da koplanarni PCB-i bez *ortho* supstituenata, koplanarni PCB-i s jednim *ortho* supstituentom i neplanarni PCB-i imaju promotorsku aktivnost u nastajanju tumora

(Robertson i Hansen, 2001). Istraživanjima se također dokazalo da su koplanarni PCB-i, kao PCB 77, s najvišom sposobnošću induciranja CYP enzima i najdjelotvorniji u promicanju tumora (Schwarz i Appel, 2005). Većina studija je utvrdila da koplanarni i neplanarni PCB-i zajedno nemaju sinergističko djelovanje, naprotiv, smatra se da bi moglo doći do antagonizma između te dvije skupine sugerirajući da imaju različite mehanizme djelovanja u promicanju tumora (Knerr i Schrenk, 2006). Za razliku od koplanarnih PCB-a koji svoju tumor promotorsku aktivnost ispoljavaju vezanjem za Ah-receptor, neplanarni PCB-i sudjeluju u drugim signalnim putevima koji imaju važnu ulogu u karcinogenezi. Istraživanja su pokazala da je u epitelnim stanicama jetre štakora tretiranog neplanarnim PCB-ima, prisutna povećana aktivnost MAP i ERK kinaza kao i transkripcijskog faktora STAT5. Budući da te kinaze i transkripcijski faktori djeluju kao signali za preživljavanje i promiču proliferaciju stanica, a ujedno i djeluju kao inhibitori apoptoze, prepoznata je uloga neplanarnih PCB-a u promicanju tumora (Safe, 1993; Robertson i Hansen 2001; Knerr i Schrenk 2006).

#### 2.4.4. PCB-i kao agonisti i antagonisti estrogena

Prvi dokazi da PCB-i djeluju estrogeno izvješteno je još 1970. godine (Bitman i Cecil, 1970). Korišteni su brojni sustavi kako bi se ispitao estrogeni učinak PCB-a. Oni uključuju sposobnost PCB-a za vezanje na estrogene receptore, sposobnost PCB-a da inducira aktivnost određenih gena koji se inače aktiviraju djelovanjem estrogena i sposobnost PCB-a da inducira proliferaciju estrogen ovisne MCF-7 stanične linije (Radice i sur., 2008). Također su provedena i *in vivo* ispitivanja na štakorima i miševima kako bi se utvrdili estrogeni utjecaji na maternicu (Jansen i sur., 1993).

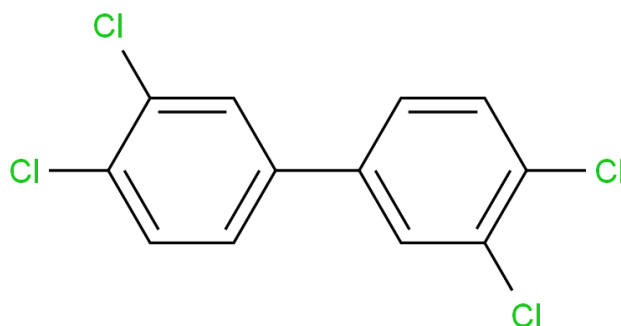
Da bi imitirali djelovanje estrogena, PCB-i se vežu na estrogene receptore (ER), i to na ER $\alpha$ , i dalje iniciraju transkripciju ciljnih gena koji imaju ključne uloge u fiziološkim učincima. Postoji mnogo PCB kongenera koji pokazuju estrogeni učinak. Manje klorirani, neplanarni PCB-i uvijek su sposobni djelovati kao estrogeni agonisti, ali i neki više klorirani koplanarni PCB-i mogu djelovati kao estrogeni, dok hidorksilirani metaboliti PCB-a također pokazuju estrogeni učinak (Robertson i Hansen, 2001).



Zanimljivo je da, osim estrogenog učinka, PCB-i i metaboliti PCB-a također mogu djelovati kao antagonisti estrogena ili inhibirati učinak estrogena. Takvi PCB-i su uglavnom koplanarne strukture i imaju visoki afinitet prema Ah-receptoru. Vezanjem na Ah-receptor nastaje kompleks koji se veže na DRE sekvencu (sekvenca koju prepoznaju dioksini) u genima koji kodiraju za estrogen i na taj način ometa sposobnost vezanja ER $\alpha$  i inicijaciju transkripcije gena koji kodiraju za estrogen (Radice i sur., 2008). Zbog antiestrogenog učinka, dioksinu slični PCB-i, mogu dodatno utjecati na reproduksijski sustav žena. Također se smatra da dioksinu slični kongeneri PCB-a utječu na muške reproduksijske organe putem antiandrogenih učinaka. Podaci dobiveni u *in vivo* i *in vitro* istraživanjima ukazuju na posljedice zbog izloženosti koplanarnom PCB 77, a to su smanjena razina testosterona i steroidogenih enzima. Druge studije su pokazale da izloženost dioksinu sličnim PCB-ima može dovesti do smanjene težine spolnih organa, odgođenog prepucijskog odvajanja i smanjene proizvodnje spermija (Meeker i Hauser, 2010; Wakui i sur., 2007).

## 2.5. PCB 77

PCB 77 (3,3',4,4'-tetraklorobifenil) ima koplanarnu konfiguraciju u kojoj su atomi vodika supstituirani sa atomima klora u oba *para* i *meta* položaja zbog čega spada u skupinu dioksinu sličnih PCB-a. Mehanizam djelovanja očituje se vezanjem na Ah-receptor te se smatra jednim od najtoksičnijih PCB kongenera. Kemijska formula PCB 77 je C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>4</sub>, a strukturna formula je prikazana na Slici 5. (Sigma-Aldrich, 2017 ).



**Slika 5.** strukturna formula koplanarnog PCB 77

### 2.5.1. Djelovanje PCB 77 i utjecaj na proliferaciju stanica

Dokazana je povećana aktivnost transkripcijskih faktora NF- $\kappa$ B i AP-1 nakon tretmana jetre štakora PCB-ima 77 i 153. Grupa štakora koja je bila tretirana samo visokim dozama PCB 77 pokazuje značajno povećanje u staničnoj proliferaciji. Ovakav učinak PCB-a 77 je posljedica njegove koplanarne strukture a time i veće toksičnosti u usporedbi s neplanarnim PCB 153. Iako sve grupe štakora tretirane PCB-ima pokazuju povećanu aktivnost vezanja transkripcijskih faktora NF- $\kappa$ B i AP-1 na DNA, samo je PCB 77 imao značajni utjecaj na povećanje proliferacije stanica (Robertson i Hansen, 2010).

Dokazano je da izloženost niskim dozama PCB-a 77 potiče diferencijaciju adipocita posredovanu vezanjem na Ah-receptor, što dovodi do oslobađanja protuupalnih adipocitokina iz adipocita. Budući da se PCB 77 nakuplja u masnom tkivu, može doprinijeti razvoju pretilosti i ateroskleroze (Arsenescu i sur., 2008).

Istraživanja stanične proliferacije i sazrijevanja u diferencijaciji fetusnih timocita upućuju na to da PCB 77 pojačava diferencijaciju timocita u zrelih CD8 T stanicama (Yilmaz i sur., 2006).

Istraživanja na ljudskim preadipocitama koje su bile izložene različitim koncentracijama (3-500  $\mu$ M) organokloriranim spojevima, uključujući i PCB 77 i PCB 153, nakon 48 sati, pokazuju znatno povećanje proliferacije stanica (i do 28%) u odnosu na kontrolu (Chapados i sur., 2012).

Nakon 24-satnog izlaganja stanica PCB-u 77 i 114, oba PCB-a su izrazito pridonijela nastanku staničnog oksidativnog stresa što je mjereno 2,7-diklorofluoresceinom, fluorescentnom i lipid hidroperoksidazom (Toborek i sur., 1995). Zbog svoje koplanarne konfiguracije oba PCB-a se mogu vezati na Ah-receptor što uzrokuje povišenu aktivnost citokrom P4501A sustava i u konačnici staničnog oksidacijskog stresa.

Dokazano je da samo jedna doza PCB 77 rezultira značajnom promjenom sastava masnih kiselina u frakcijama jetre štakora. Zabilježen je značajni porast oleinske i arahidonske kiseline. PCB 77 remeti funkciju endotelijske barijere povećavajući prijenos albumina kroz endotelijski monosloj. Dokazano je da prethodno obogaćivanje stanica linoleinskom kiselinom prije tretmana PCB-em dodatno smanjuje funkciju endotelijske barijere u odnosu na sami PCB, što je povezano s povećanim oksidacijskim stresom (Robertson i Hansen 2010).

Znanstvenici su ispitivali proizvodnju etana i koncentracije jetrenog malondialdehida (MDA) nakon izlaganja PCB kongenerima 77, 114 i 153. Sva tri kongenera PCB-a povisuju koncentraciju jetrenog malondialdehida 30 dana nakon inkubacije. Prva dva tjedna smanjena je koncentracija etana zbog inhibicije metabolizma etana, dok se u druga dva tjedna pojačala njegova produkcija. Također je dokazano i da PCB 77 i PCB 169 inhibiraju intracelularnu komunikaciju vezanjem na Ah-receptor u Hepa LcLc7 stanicama miša (Robertson i Hansen 2010).

## 2.6. TESTOVI TOKSIČNOSTI

Testovi toksičnosti, procjena sigurnosti ili ispitivanje toksičnosti, provodi se kako bi se utvrdio stupanj do kojeg neka tvar može oštetiti živi ili neživi organizam. Provode ih istraživači koji koriste standardne postupke ispitivanja kako bi se uskladili s propisima, kao na primjer ispitivanje lijekova i pesticida. Toksikologija se smatra dijelom područja prekliničkog razvoja. Provode se *in vitro* i *in vivo* istraživanja kako bi se odredile sigurne doze izloženosti kod ljudi prije ispitivanja prve osobe. Testovi toksičnosti ispituju gotove proizvode kao što su pesticidi, lijekovi, kozmetika, aditivi hrane, umjetni zaslađivači, ambalažni materijal itd. Tvari se nanose na kožu ili oči; intravenozno, intramuskularno ili subkutano inhalacijom ili oralno. Doze se mogu dati jednom, redovno ponavljati tijekom određenog vremena ili za cijelog života (Roggen, 2011).

### 2.6.1. Alternativni testovi toksičnosti

Oko milijun životinja, primata i neprimata, koristi se svake godine u Europi u toksikološkim ispitivanjima. Samo u Velikoj Britaniji jedna petina pokusa na životinjama su toksikološka ispitivanja. Budući da su pokusi na životinjama okrutni, skupi i često neprimjenjivi za ljude, znanstvenici koriste metode za proučavanje bolesti i testiranje proizvoda koje zamjenjuju životinje, a relevantne su za ljudsko zdravlje. To su tzv. alternativni ili *in vitro* testovi toksičnosti (Roggen, 2011).

*In vitro* metode uključuju sofisticirane testove pomoću ljudskih stanica i kultura, uporabu dijelova tkiva i naprednih tehnika računalnog modeliranja (*silico* modeli). Upotreba *in vitro* sustava staničnih frakcija, staničnih linija, primarnih staničnih kultura te dijelova tkiva i organa ima široku primjenu u toksikološkim istraživanjima (PETA, 2017)..

Neke od metode koje se koriste u određivanju toksičnosti su Kenacide Blue, MTT, Trypan Blue i Neutral Red metode.

## 2.7. STANIČNE LINIJE

Kulture stanica pripravljene iz tkiva ili organa uzetih neposredno iz organizma nazivaju se primarnim kulturama. Takve kulture zadržavaju specifične funkcije tkiva iz kojeg su potekle te u *in vitro* uvjetima najbolje odražavaju svojstva *in vivo*. Nakon što se izoliraju iz tkiva, stanice zahtijevaju čvrstu površinu za prihvaćanje za što se koriste sterilne, posebno obrađene plastične ili staklene posude (Petrijeve zdjelice, T boce). Daljnjim subkultiviranjem i imortalizacijom postižu svojstva stanične linije ili sekundarne stanične kulture. Prednost tog postupka je dobivanje velike količine jednolikog materijala pogodnog za dugotrajnu uporabu. Dvije najveće kolekcije stanica koje obuhvaćaju preko 3000 različitih staničnih linija su *American Type Culture Collection* (ATTC) i *European Collection of Animal Cell Culture* (ECACC).

### 2.7.1. CHO-K1 stanična linija

CHO (eng. *Chines hamster ovary*) je epitelna stanična linija izolirana iz ovarija kineskog hrčka, a koristi se u brojnim medicinskim i biološkim istraživanjima. CHO stanice su najčešće korišteni domaćini sisavaca u proizvodnji rekombinantnih terapijskih proteina. Budući da ne mogu sintetizirati aminokiselinu prolin, CHO stanice se uzgajaju u mediju za rast koji sadrži aminokiselinu prolin. Kako bi se postigli optimalni uvjeti kultivacije, u medij za rast je potrebno dodati serum u koncentraciji od 10%. CHO stanice su adherentne što znači da rastu u monosloju pa je tijekom subkultivacije potrebno provoditi tripsinizaciju za odvajanje stanica od površine (ATTC, 2016a).

### 2.7.2. MCF-7 stanična linija

MCF-7 stanice raka dojke su izolirane 1970. godine iz 69-godišnje žene. Prije MCF-7, nije bilo moguće dobiti matičnu staničnu liniju koja je sposobna živjeti duže od nekoliko mjeseci. Ova stanična linija zadržava nekoliko karakteristika diferenciranog epitela dojke, uključujući

sposobnost procesiranja estradiola putem citoplazmatskih receptora estrogena i sposobnosti stvaranja nakupina. Stanice eksprimiraju WNT7B onkogene. Rast stanica inhibiran je faktorom nekroze tumora (eng. *tumor necrosis factor alpha*, TNF $\alpha$ ), a izlučivanje IGFBP-a (eng. *insulin like growth factor binding proteins*) može se liječiti antiestrogenom. Kako bi se postigli optimalni uvjeti kultivacije, u medij za rast potrebno je dodati 0.01 mg/ml ljudskog rekombinantnog inzulina i serum u koncentraciji od 10% (ATTC, 2016b).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJAL

#### 3.1.1. Biološki materijal

U radu su korištene dvije stanične linije reprodukcijuskog sustava, netumorske stanice ovarija kineskog hrčka CHO-K1, te tumorske MCF-7, stanice karcinoma dojke. Obje stanične linije rastu u monosloju (ATTC, 2016a i b).

#### 3.1.2. Kemikalije

Kemikalije koje su korištene prilikom izrade ovoga rada su sljedeće:

- Dulbecco's DMEM/F-12, GIBCO, SAD
- Dulbecco's DMEM, GIBCO, SAD
- *Fetal Bovine Serum* (FBS – serum goveđeg fetusa), GIBCO, SAD
- 0.25 % tripsin – EDTA, GIBCO, SAD
- PCB 77 (3,3',4,4'-tetraklorbifenil), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Resveratrol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- boja tripan plavo (*Trypan Blue*), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Apsolutni etanol, Kemika, Zagreb
- Destilirana voda (dH<sub>2</sub>O)
- DMSO (dimetilsulfoksid), Kemika, Zagreb

### 3.1.3. Otopine i puferi

#### **Sastav medija (Dulbecco's MEM/F12 (GIBCO)):**

<b>Sastojci</b>	<b>Koncentracija (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>aminokiseline</b>	
L-Glicin	18,75
L-Alanin	4,45
L-Arginin hidroklorid	147,5
L-Asparagin x H <sub>2</sub> O	7,5
L-Asparaginska kiselina	6,65
L-Cistein hidroklorid x H <sub>2</sub> O	17,56
L-Cistin 2HCl	31,29
L-Glutaminska kiselina	7,35
L-Glutamin	365
L-Histidin hidroklorid x H <sub>2</sub> O	31,48
L-Izoleucin	54,47
L-Leucin	59,05
L-Lizin hidroklorid	91,25
L-Metionin	17,24
L-Fenilalanin	35,48
L-Prolin	17,25
L-Serin	26,25
L-Treonin	53,45
L-Triptofan	9,02
L-Tirozin	55,79
L-Valin	25,85

**vitamini**

Biotin	0,0035
Kolin klorid	8,98
D-Ca pantotenska kiselina	2,24
Folna kiselina	2,65
Niacinamid (nikotinamid)	2,02
Piridoksin hidroklorid	2
Riboflavin	0,219
Tiamin hidroklorid	2,17
Vitamin B <sub>12</sub>	0,68
I-inozitol	12,6

**anorganske soli**

CaCl <sub>2</sub>	116,6
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,0013
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> x 9H <sub>2</sub> O	0,05
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,417
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	61
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	100
KCl	311,8
NaHCO <sub>3</sub>	1200
NaCl	6995,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	134
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	62,5
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,432





**Vitamini:**

Kolin klorid	4
Folna kiselina	4
myo-Inozitol	7,20
Nikotinamid	4
D-Ca pantotenska kiselina	4
Piridoksin×HCl	4
Riboflavin	0,4
Tiamin×HCl	4

**anorganske soli:**

CaCl <sub>2</sub>	200
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ×9H <sub>2</sub> O	0,1
MgSO <sub>4</sub>	97,7
KCl	400
NaHCO <sub>3</sub>	1500
NaCl	6400
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O	125

**ostali sastojci:**

D-Glukoza	4500
Fenol crvenilo, natrijeva sol	15
Natrij piruvat	110

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

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
dH <sub>2</sub> O	do 1000 mL

**0,4 %-tna otopina Trypan Blue**

<i>Trypan Blue</i>	0,08 g
PBS pufer	20 mL
Profiltrirati	

**Ishodna otopina PCB 77**

PCB 77	10 mg
DMSO	3,42 mL

Napravljene su otopine PCB 77 tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 i 10  $\mu$ M PCB 77.

**Ishodna otopina MTT**

<i>MTT</i>	25 g
PBS	5 mL
Sterilno profiltrirati.	

**Ishodna otopina resveratrola**

Resveratrol	10 mg
DMSO	1 mL

Napravljene su otopine resveratrola tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 5, 10, 15, 20, 35, 50, 75 i 100  $\mu$ M resveratrol.

### 3.1.4. Oprema i uređaji

Prilikom izrade ovoga rada korištena je sljedeća oprema u laboratoriju:

- inkubator s kontroliranom atmosferom; IR 1500, Automatic CO<sub>2</sub>, Flow Laboratories, Velika Britanija
- komora za sterilan rad (laminar); Twin 30, Gelaire Flow Laboratories, Velika Britanija
- inverzni mikroskop; Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- svjetlosni mikroskop; LABOVAL 4, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- Čitač mikrotitarskih pločica, Microplate Readers LKB 5060-006
- analitička vaga, Mettler, Zürich, Švicarska
- centrifuga, Centric 322A, Tehnica Železniki, Slovenija
- Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica; Assistant, Bright-Line, Njemačka
- precizna vaga, Mettler P1210, Zürich, Švicarska
- vibracijska mješalica, Tehnica Železniki, Slovenija

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Uzgoj i održavanje stanica u kulturi

CHO-K1 i MCF-7 stanice se čuvaju na  $-80^{\circ}\text{C}$  u mediju za zamrzavanje koji se sastoji od 80% medija za uzgoj (DMEM/F12 ili DMEM), 10% FBS-a i 10% DMSO-a. Uzgoj i održavanje stanica započinje njihovim naglim odmrzavanjem, pri  $37^{\circ}\text{C}$  u inkubotaru, u atmosferi od 95% zraka i 5%  $\text{CO}_2$ . Nakon odmrzavanja, stanice se centrifugiraju 5 min na 1000 okretaja/min, te slijedi uklanjanje supernatanta. Talog stanica se zatim resuspendira u mediju za uzgoj koji se sastoji od 90% medija za uzgoj (DMEM/F12 ili DMEM) i 10% FBS-a i prenese u T bocu na daljnju kultivaciju.

Kako bi se osigurali optimalni uvjeti za rast i razvoj stanica, stanice je potrebno uzgajati u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (95% zraka i 5%  $\text{CO}_2$ ) pri  $37^{\circ}\text{C}$ . Osim kontrolirane atmosfere potrebno je i redovito mijenjanje medija za uzgoj kako bi se stanicama osigurale sve potrebne hranjive tvari za rast i razvoj. Budući da su stanice adherentne i rastu u monosloju potrebno ih je odvojiti od površine T boce. Prije odvajanja, stanice se ispiru od ostatka iskorištenog seruma i medija, a zatim se odvajaju od površine dodatkom 1 mL tripsina. Nakon što se pod mikroskopom uoči odvajanje stanica od površine T boce, stanice se resuspendiraju u svježem mediju za uzgoj te se uzima uzorak stanične suspenzije za određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*. Nakon izračunavanja broja stanica u uzorku, stanice se razrijeđuju na koncentraciju  $1 \times 10^5$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj.

### 3.2.2. Određivanje učinka resveratrola na proliferaciju CHO-K1 i MCF-7 stanica metodom *MTT*

*MTT* je tetrazolijeva sol, žute boje topljiva u vodi koja se djelovanjem sukcinat dehidrogenaze u mitohondrijima u živih stanica prevodi u ljubičaste kristale formazana netopljive u vodi. Kristali formazana se mogu otopiti u organskom otapalu te se zatim spektrofotometrijski određuje intenzitet obojenja (Lim i sur., 2015).

Nakon 48 sati inkubacije, na stanice prethodno tretirane različitim koncentracijama resveratrola, dodaje se 10  $\mu\text{L}$  ishodne otopine *MTT*-a te se stanice vraćaju na inkubaciju od 3 sata pri  $37^{\circ}\text{C}$ . Nakon 3 sata inkubacije iz jažica se vadi medij za uzgoj te se dodaje 100  $\mu\text{L}$  DMSO-a u kojem se otapaju žuti kristali formazana pri čemu se razvija ljubičasto obojenje. Intenzitet

nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 570 nm u odnosu na slijepu probu.

### *3.2.2.1. Određivanje učinka resveratrola na proliferaciju CHO-K1 stanica metodom MTT*

U jažice na *multiwell* ploči s 96 jažica odpipetira se po 100  $\mu\text{L}$  stanične suspenzije CHO-K1 stanica u koncentraciji  $5 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$ . Nakon 24 sata inkubacije iz jažica je izvađen medij te je zamijenjen s novih 100  $\mu\text{L}$  medija za uzgoj s resveratrolom pripremljenog tako da se postignu koncentracije od 5, 10, 20, 35, 50, 75 i 100  $\mu\text{M}$  resveratrola u mediju za uzgoj. Na *multiwell* ploči prati se i kontrola, dodatak DMSO-a kako bi se isključio potencijalni toksični učinak samog otapala na stanice. Tretirane stanice se inkubiraju 48 sati nakon čega se provjerava vijabilnost stanica metodom *MTT*. Dobiveni podaci se usporede kako bi se odredio utjecaj različitih koncentracija resveratrola na proliferaciju CHO-K1 stanica.

### *3.2.2.2. Određivanje učinka resveratrola na proliferaciju MCF-7 stanica metodom MTT*

Prethodno opisani postupak ponovi se s MCF-7 stanicama. Nacijepljuje se 100  $\mu\text{L}$  stanica u koncentraciji  $5 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj. Nakon 24 sata inkubacije, medij iz jažica se zamjenjuje novim uz dodatak resveratrola tako da se postignu odgovarajuće koncentracije resveratrola (5, 10, 20, 35, 50, 75 i 100  $\mu\text{M}$ ). Kako bi se isključio potencijalni toksični učinak otapala na stanice, kao kontrola se koristi DMSO.

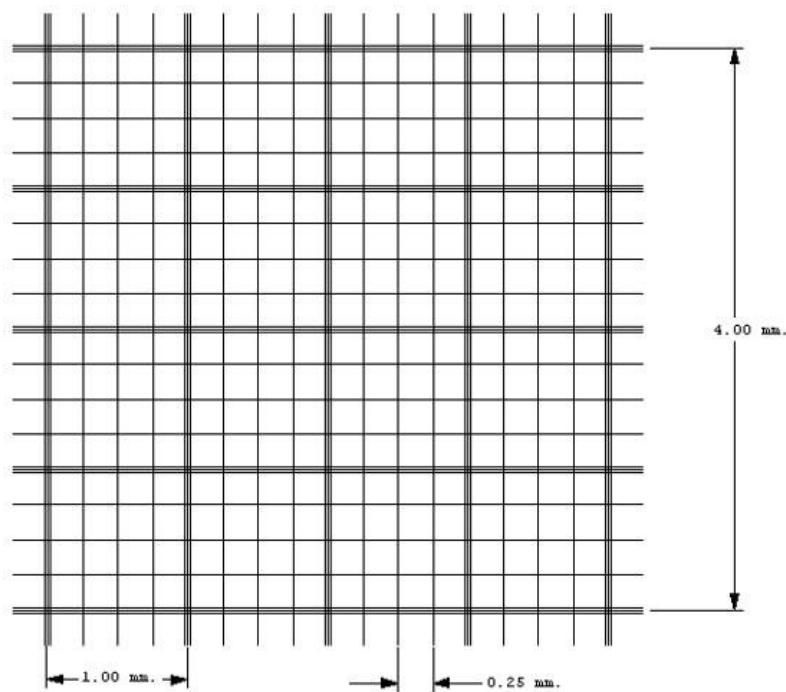
Tretirane stanice se inkubiraju 48 sati nakon čega se provjerava vijabilnost stanica metodom *MTT*. Dobiveni podaci se usporede kako bi se odredio utjecaj različitih koncentracija resveratrola na proliferaciju MCF-7 stanica.

### 3.2.3. Određivanje učinka PCB 77 na proliferaciju CHO-K1 i MCF-7 stanica metodom *Trypan Blue*

#### 3.2.3.1. Određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*

Iz suspenzije tripsiniziranih stanica izdvoji se 20  $\mu\text{L}$  stanica kojima se doda 20  $\mu\text{L}$  0,4%-tne boje *Trypan Blue*. Zatim se na Fuchs-Rosenthalovu komoricu nanese 20  $\mu\text{L}$  smjese stanica i boje te se stanice broje pod svjetlosnim mikroskopom. Žive stanice ostaju nebojane dok se mrtve stanice bojaju plavo budući da im je oštećena stanična membrana i boja može ući u stanicu.

Fuchs-Rosenthalova komorica se sastoji od 16 kvadrata, a broje se stanice na unutarnja četiri kvadrata tako da se uvijek broje sve stanice unutar te one na donjem i desnom rubu kvadrata kako bi se izbjeglo brojanje istih stanica više puta. Komorice su dubine 0,2 mm i površine 0,0625 mm<sup>2</sup> (Slika 6).



**Slika 6.** Fuchs-Rosenthalova komorica (EMS, 2017)

Nakon što se izbroje stanice u središnja četiri kvadrata izračuna se srednja vrijednost stanica i pomnoži sa  $10^4$  kako bi se dobio broj stanica po mililitru medija za uzgoj.

### 3.2.3.2. Određivanje učinka PCB 77 na proliferaciju CHO-K1 stanica metodom Trypan Blue

U svaku od jažica na *multiwell* ploči sa 6 jažica nacijepi se po 2 mL suspenzije CHO-K1 stanica u koncentraciji od  $2 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$ . Nakon 24 sata inkubacije stanice se tretiraju različitim koncentracijama PCB 77. Jedna jažica ploče tretira se samo s 20  $\mu\text{L}$  DMSO-a kako bi se isključio potencijalni toksični učinak otapala na stanice. Stanice u ostalim jažicama se tretiraju s 20  $\mu\text{L}$  otopine PCB 77. Otopine su pripremljene tako da se u mediju postignu koncentracije od 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10  $\mu\text{M}$ . Stanice se potom inkubiraju a svaka 24 sata određuje se učinak PCB 77 na proliferaciju stanica metodom *Trypan Blue*. Dobiveni podaci su međusobno uspoređeni kako bi se odredio utjecaj različitih koncentracija PCB 77 na vijabilnost CHO-K1 stanica u ovisnosti o vremenu.

### 3.2.3.3. Određivanje učinka PCB 77 na proliferaciju MCF-7 stanica metodom Trypan Blue

Opisani postupak također je ponovljen i na MCF-7 stanicama. Po 2 mL suspenzije MCF-7 stanica nacijepjeno je u jažice na *multiwell* ploču u koncentraciji od  $5 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$ . Nakon 24 sata inkubacije stanice su tretirane s PCB 77, a jedna od jažica je tretirana samo sa 20  $\mu\text{L}$  DMSO-a te služi kao kontrola. U jažice je otpipetirano 20  $\mu\text{L}$  otopine PCB 77 kako bi se u mediju postigle odgovarajuće koncentracije od 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10  $\mu\text{M}$ .

Stanice se potom inkubiraju, a svaka 24 sata određuje se učinak PCB 77 na proliferaciju stanica metodom *Trypan Blue*. Dobiveni podaci su međusobno uspoređeni kako bi se odredio utjecaj različitih koncentracija PCB 77 na vijabilnost MCF-7 stanica ovisno o vremenu.



3.2.4. Određivanje učinka predtretmana resveratrolom na PCB 77 induciranu proliferaciju na CHO-K1 i MCF-7 stanicama metodom *Trypan Blue*

3.2.4.1. *Određivanje učinka predtretmana resveratrolom na PCB 77 induciranu proliferaciju na CHO-K1 stanicama metodom Trypan Blue*

Po 2 mL suspenzije CHO-K1 stanica u koncentraciji od  $2 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  se nacijepi u jažice na *multiwell* ploči sa 6 jažica. Otprilike 3 sata nakon nacijepijivanja radi se predtretman pripremljenom otopinom resveratrola u DMSO-u. Stanice se tretiraju s 20  $\mu\text{L}$  otopine resveratrola kako bi se u mediju postigle koncentracije od 5, 10, 15, 20, 35 i 50  $\mu\text{M}$ . Nakon 24 sata inkubacije stanice se dalje tretiraju s 20  $\mu\text{L}$  pripremljene otopine PCB 77 u DMSO-u u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$ . Jedna od šest jažica *multiwell* ploče služi kao kontrola i tretirana je s 20  $\mu\text{L}$  DMSO-a i 20  $\mu\text{L}$  PCB 77 u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$ . Inkubacija tretiranih stanica traje 72 sata nakon čega se vijabilnost stanica određuje *Trypan Blue* metodom.

3.2.4.2. *Određivanje učinka predtretmana resveratrolom na PCB 77 induciranu proliferaciju na MCF-7 stanicama metodom Trypan Blue*

Isti postupak ponovljen je sa MCF-7 staničnom linijom. Po 2 mL suspenzije stanica otpipetirano je u jažice na *multiwell* ploču sa 6 jažica kako bi se postigla koncentracija od  $5 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  medija. Otprilike 3 sata nakon nacijepijivanja radi se predtretman pripremljenom otopinom resveratrola u DMSO-u. Stanice se tretiraju s 20  $\mu\text{L}$  otopine resveratrola kako bi se u mediju postigle odgovarajuće koncentracije od 5, 10, 15, 20, 35 i 50  $\mu\text{M}$ . Nakon inkubacije od 24 sata, stanice se tretiraju s 20  $\mu\text{L}$  pripremljene otopine PCB 77 u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$ . Jedna jažica tretirana je s 20  $\mu\text{L}$  DMSO-a i 20  $\mu\text{L}$  PCB 77 u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$  te služi kao kontrola. Inkubacija tretiranih stanica traje 72 sata, nakon čega se vijabilnost stanica određuje metodom *Trypan Blue*.

### 3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

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

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

S pripadajućim standardnim 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  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovoga rada je bio ispitati mogući protektivni učinak resveratrola na PCB 77 induciranu proliferaciju stanica reprodukcijskog sustava. U tu svrhu koristile su se stanice ovarija kineskog hrčka CHO-K1 i ljudske stanice raka dojke MCF-7. Najprije je ispitan učinak samog resveratrola na proliferaciju stanica. Pripremljene su otopine resveratrola u koncentracijama od 5, 10, 20, 35, 50, 75 i 100  $\mu\text{M}$ . Stanice su inkubirane resveratroлом 48 sati, a učinak je zatim ispitan *MTT* metodom. *MTT* je žute boje, tetrazolijeva sol, a reducira se u formazan ljubičaste boje. Metoda se temelji na mjerenju metaboličke aktivnosti stanica odnosno na utrošku NADH (glavni e- donor) s obzirom da je on potreban za redukciju *MTT*-a. Nastali ljubičasti kristali formazana se u završnom koraku metode otapaju u odabranom organskom otapalu, a broj živih stanica korelira s intenzitetom obojenja koje se određuje mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 570 nm pomoću spektrofotometra.

Učinak PCB 77 na proliferaciju stanica ispitan je u niskim koncentracijama PCB-a od 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 i 10  $\mu\text{M}$ . Učinak se pratio tijekom 72 sata inkubacije, a svaka 24 sata provodila su se mjerenja kako bi se ustanovilo da li PCB 77 inducira proliferaciju i pri kojim dozama je ona najviša. Mjerenja su se provodila *Trypan Blue* metodom nakon 24, 48 i 72 sata. *Trypan Blue* je boja velike molekulske mase koja prodire u mrtve stanice budući da im je narušen integritet stanične membrane te se one zbog toga obojaju u plavo, dok žive stanice ostaju nebojane. Zatim se pod svjetlosnim mikroskopom broje i žive i mrtve stanice.

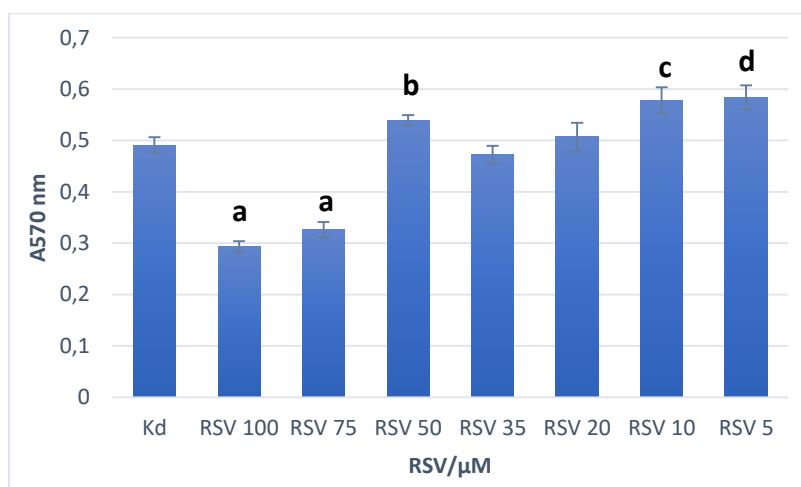
Za ispitivanje protektivnog učinka resveratrola na PCB 77 induciranu proliferaciju koristile su se otopine resveratrola u koncentracijama od 5, 10, 15, 20, 35 i 50  $\mu\text{M}$ . Nakon 24 sata preinkubacije resveratroлом, stanice su tretirane 1  $\mu\text{M}$  otopinom PCB 77 budući da je ta koncentracija pokazala najviše proliferativno djelovanje nakon 72 sata na obje stanične linije. Stanice su inkubirane 72 sata, nakon čega se učinak ispitaio *Trypan Blue* metodom.

#### 4.1. UČINAK RESVERATROLA NA PROLIFERACIJU CHO-K1 I MCF-7 STANICA ODREĐEN METODOM MTT

Za praćenje učinka resveratrola na proliferaciju CHO-K1 i MCF-7 staničnih linija, naci jepljeno je po 100  $\mu\text{L}$  suspenzije stanica u jažice na 96-well pločama u koncentraciji od  $5 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  za CHO-K1 i MCF-7 staničnu liniju. Nakon 24 sata stanicama je izmijenjen medij za uzgoj i dodan novi u kojem su pripremljene otopine resveratrola tako da su dobivene konačne koncentracije iznosile 5, 10, 20, 35, 50, 75 i 100  $\mu\text{M}$  (svaka koncentracija ispitana je u 6 paralela). U pojedine jažice na svakoj *multiwell* ploči umjesto otopine resveratrola dodan je DMSO, organsko otapalo u kojem je otopljen resveratrol te su one služile kao kontrola. Stanice su se inkubirale 48 sati nakon čega je praćen učinak resveratrola na proliferaciju stanica *MTT* metodom.

##### 4.1.1. Učinak resveratrola na proliferaciju CHO-K1 stanica određen metodom *MTT*

Na Slici 7 grafički je prikazan učinak različitih koncentracija resveratrola na proliferaciju CHO-K1 stanične linije.



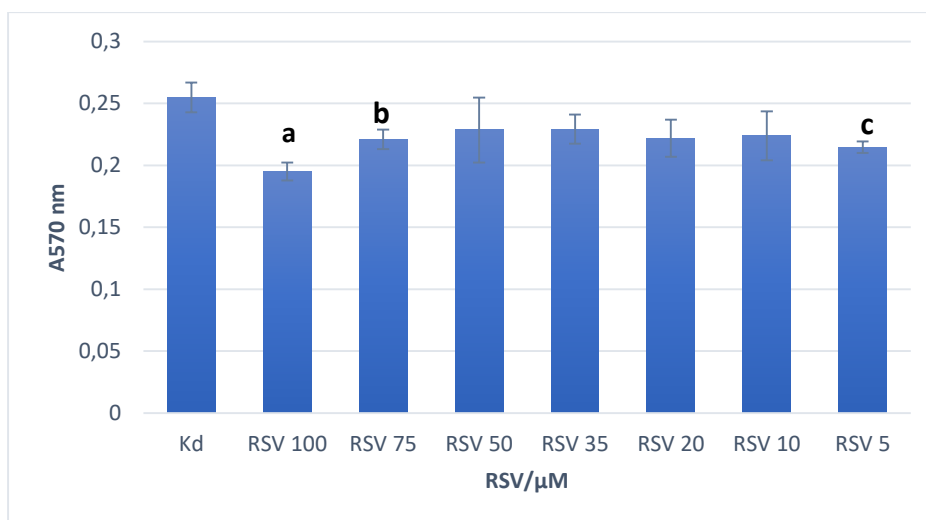
**Slika 7.** Učinak resveratrola na proliferaciju CHO-K1 stanica praćen metodom *MTT* nakon 48 sati inkubacije. Kd – kontrola uz dodatak DMSO-a u koncentraciji  $10 \mu\text{L mL}^{-1}$  medija za uzgoj; koncentracija resveratrola u mediju za uzgoj: RSV 100 – 100  $\mu\text{M}$ , RSV 75 - 75  $\mu\text{M}$ , RSV 50 – 50  $\mu\text{M}$ , RSV 35 – 35  $\mu\text{M}$ , RSV 20 – 20  $\mu\text{M}$ , RSV 10 – 10  $\mu\text{M}$ , RSV 5 – 5  $\mu\text{M}$ . Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu Kd određena Student *t*-testom: <sup>a</sup> $p < 0,001$ , <sup>b</sup> $p < 0,05$ , <sup>c</sup> $p < 0,025$ , <sup>d</sup> $p < 0,01$ .

Iz grafičkog prikaza na Slici 7 vidi se da je resveratrol, ovisno o koncentraciji, različito utjecao na proliferaciju CHO-K1 stanica. Visoke koncentracije resveratrola od 100  $\mu\text{M}$  i 75  $\mu\text{M}$  izrazito su inhibirale proliferaciju stanica u odnosu na kontrolu, što je i statistički značajno ( $p < 0,001$ ). Statistički značajni utjecaj imale su i koncentracije resveratrola od 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ), 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,025$ ) i 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ) koje potiču proliferaciju stanica. Koncentracije resveratrola od 35  $\mu\text{M}$  i 20  $\mu\text{M}$  nisu imale značajan utjecaj na proliferaciju stanica u odnosu na kontrolu.

Literaturni podaci također potvrđuju inhibični učinak resveratrola u visokim dozama. Bowers i sur. (2000) također su, između ostalog, ispitali učinak resveratrola na proliferaciju CHO-K1 stanica pri čemu je doza od 100  $\mu\text{M}$  resveratrola djelovala inhibirajuće iako ne i statistički značajno. Na transfektirane CHO-K1 stanice (koje su ekspimirale  $\text{ER}\alpha$  i  $\text{ER}\beta$ ) učinak je bio izraženiji i značajan. Razlog tome je taj što je resveratrol fitoestrogen i oponaša djelovanje prirodnog estrogena te se veže za estrogene receptore. CHO-K1 stanice nisu estrogen osjetljive pa učinak resveratrola nije tako izražen kao u transfektiranim stanicama. Značajni utjecaj na smanjenje proliferacije stanica može se objasniti visokim koncentracijama resveratrola koje mogu interferirati s fiziološkim djelovanjem enzima TOPO2 (topoizomeraza 2) koji sudjeluje u topološkim modifikacijama DNA tako da izaziva prolazne dvolančane lomove koji su potrebni za pravilnu segregaciju kromosoma tijekom mitoze. Detaljno istraživanje o utjecaju resveratrola na enzim TOPO2 proveli su Basso i suradnici 2013. godine.

#### 4.1.2. Učinak resveratrola na proliferaciju MCF-7 stanica određen metodom *MTT*

Na Slici 8 grafički je prikazan učinak različitih koncentracija resveratrola na proliferaciju MCF-7 stanične linije. Sve koncentracije resveratrola inhibiraju proliferaciju MCF-7 stanica, a statistički značajno koncentracije od 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ), 75  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) i 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,025$ ). Dobiveni rezultati prikazani na Slici 8 podudaraju se sa rezultatima drugih istraživanja. MCF-7 su estrogen ovisne stanice, a resveratrol je fitoestrogen. S obzirom na to, resveratrol pokazuje antiestrogenu aktivnost u MCF-7 stanicama. Antiestrogenu aktivnost se objašnjava time što resveratrol može direktno konkurirati vezanju estrogena na receptore i može ometati vezanje aktiviranih receptora na estrogen ovisna mjesta na DNA. Jedno istraživanje je pokazalo da resveratrol u MCF-7 stanicama izaziva blokadu staničnog ciklusa u S-fazi (Pozo-Guisado i sur., 2002) što također rezultira inhibičnim učinkom na proliferaciju stanica.



**Slika 8.** Učinak resveratrola na proliferaciju MCF-7 stanica praćen metodom *MTT* nakon 48 sati inkubacije. Kd – kontrola uz dodatak DMSO-a u koncentraciji  $10 \mu\text{L mL}^{-1}$  medija za uzgoj; koncentracija resveratrola u mediju za uzgoj: RSV 100 –  $100 \mu\text{M}$ , RSV 75 –  $75 \mu\text{M}$ , RSV 50 –  $50 \mu\text{M}$ , RSV 35 –  $35 \mu\text{M}$ , RSV 20 –  $20 \mu\text{M}$ , RSV 10 –  $10 \mu\text{M}$ , RSV 5 –  $5 \mu\text{M}$ . Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu Kd određena Student *t*-testom: <sup>a</sup> $p < 0,005$ , <sup>b</sup> $p < 0,05$ , <sup>c</sup> $p < 0,025$ .

Budući da koncentracije resveratrola od  $75 \mu\text{M}$  i  $100 \mu\text{M}$  u obje stanične linije značajno inhibiraju proliferaciju stanica u odnosu na kontrolu, odnosno djeluju citotoksično, nisu korištene u daljnjem istraživanju. Za ispitivanje mogućeg protektivnog učinka resveratrola pri tretmanu PCB-ima korištene su doze resveratrola do  $50 \mu\text{M}$ .

## 4.2. UČINAK PCB 77 NA PROLIFERACIJU CHO-K1 I MCF-7 STANICA ODREĐEN METODOM TRYPAN BLUE

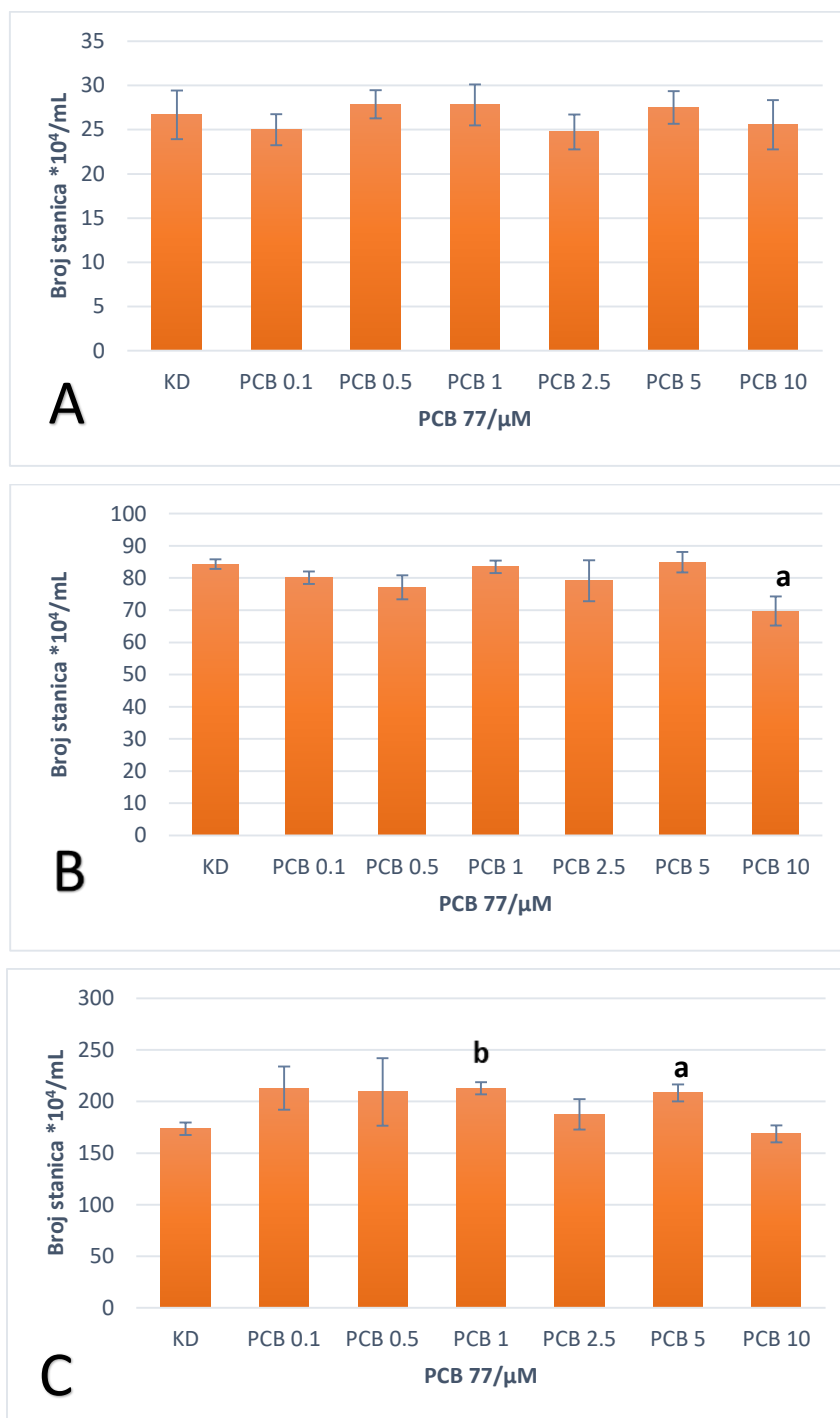
Za praćenje učinka PCB 77 na proliferaciju CHO-K1 i MCF-7 staničnih linija, naciepljeno je po 2 mL suspenzije stanica u jažice na *multiwell* pločama u koncentracijama od  $2 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  za CHO-K1 staničnu liniju i  $5 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  za MCF-7 staničnu liniju. Nakon 24 sata stanice su tretirane različitim koncentracijama PCB 77 pri čemu su u mediju za uzgoj postignute koncentracije od 0,1; 0,5; 1, 2,5; 5 i 10  $\mu\text{M}$ . Svaka koncentracija ispitana je u 4 paralele za CHO-K1 stanice i 6 paralela za MCF-7 stanice, a pokusi su postavljeni dva puta. Dio jažica na *multiwell* pločama umjesto otopine PCB 77 tretiran je s 20  $\mu\text{L}$  DMSO-a, organskog otapala u kojem je otopljen PCB 77 i one su služile kao kontrola. Stanice su inkubirane 72 sata, nakon čega je praćen učinak PCB 77 na proliferaciju stanica. Nakon 24, 48 i 72 sata provedena su mjerenja *Trypan Blue* metodom.

### 4.2.1. Učinak niskih doza PCB 77 na proliferaciju CHO-K1 stanica

Na Slici 9 grafički je prikazan učinak različitih koncentracija PCB 77 na proliferaciju CHO-K1 stanične linije. Učinak PCB 77 na proliferaciju praćen je nakon 24, 48 i 72 sata. Nakon 24 sata ne vidi se nikakav značajan učinak primijenjenih doza PCB 77 na proliferaciju stanica u usporedbi sa kontrolom. Niti jedna koncentracija PCB 77 nije značajno inhibirala ili inducirala proliferaciju CHO-K1 stanica.

Nakon 48 sati, uočljiv je porast biomase u kontrolnim uzorcima, ali i dalje nije vidljiva indukcija PCB 77 na proliferaciju stanica u odnosu na kontrolu. Pri koncentraciji PCB 77 od 10  $\mu\text{M}$  vidljiv je blagi inhibitorski učinak koji je ujedno i statistički značajan ( $p < 0,025$ ).

Najveća indukcija PCB 77 na proliferaciju CHO-K1 stanica opažena je nakon 72 sata. Sve koncentracije PCB 77 su inducirale proliferaciju osim koncentracije od 10  $\mu\text{M}$ . Statistički značajnu indukciju proliferacije stanica pokazale su koncentracije od 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ) i 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,025$ ). Dobiveni rezultati pokazuju da niske koncentracije PCB-a izazivaju povećanu proliferaciju stanica što može dovesti do nastanka tumora, a to također potvrđuju literaturni izvori mnogobrojnih znanstvenih studija koje koreliraju incidenciju kancera tkiva reproduktivnog sustava sa izloženošću perzistentnim organoklornim spojevima (Meeker i Hauser 2010; Jansen i sur., 1993).



**Slika 9.** Učinak PCB 77 na proliferaciju CHO-K1 stanica praćen metodom *Trypan Blue* nakon 24 (A), 48 (B) i 72 (C) h inkubacije. Kd – kontrola uz dodatak DMSO-a u koncentraciji  $10 \mu\text{L mL}^{-1}$  medija za uzgoj; koncentracija PCB 77 u mediju za uzgoj: PCB 0.1 –  $0.1 \mu\text{M}$ , PCB 0.5 –  $0.5 \mu\text{M}$ , PCB 1 –  $1 \mu\text{M}$ , PCB 2.5 –  $2.5 \mu\text{M}$ , PCB 5 –  $5 \mu\text{M}$ , PCB 10 –  $10 \mu\text{M}$ . Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu Kd određena Student *t*-testom: <sup>a</sup> $p < 0,025$ , <sup>b</sup> $p < 0,005$ .



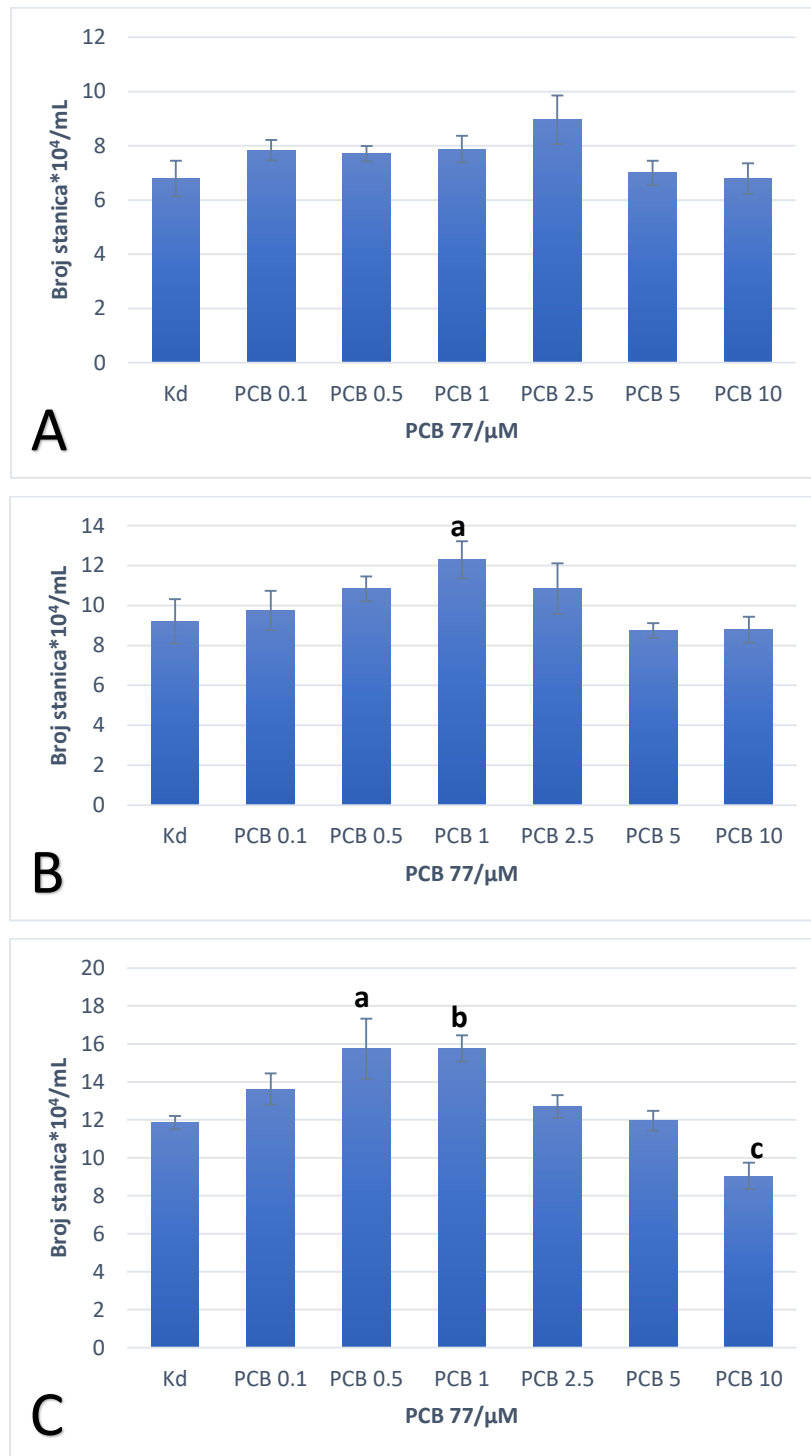
#### 4.2.2. Učinak niskih doza PCB 77 na proliferaciju MCF-7 stanica

Rezultati istraživanja prikazani na Slici 10 pokazuju učinak niskih koncentracija PCB 77 na proliferaciju MCF-7 stanica. Nikakav značajni učinak nije zabilježen nakon 24 sata inkubacije. Stanice su u odnosu na kontrolu proliferirale jednakomjerno. Koncentracija PCB 77 od 2,5  $\mu\text{M}$  najviše je inducirala proliferaciju stanica, ali ne i statistički značajno.

Nakon 48 sati uočeno je da vrlo niske koncentracije PCB 77, od 0,1  $\mu\text{M}$  do 2,5  $\mu\text{M}$ , induciraju proliferaciju u odnosu na kontrolu, a statistički značajnom se pokazala koncentracija od 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ). Koncentracije PCB 77 od 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  pokazuju blagi inhibitorni učinak u odnosu na kontrolu.

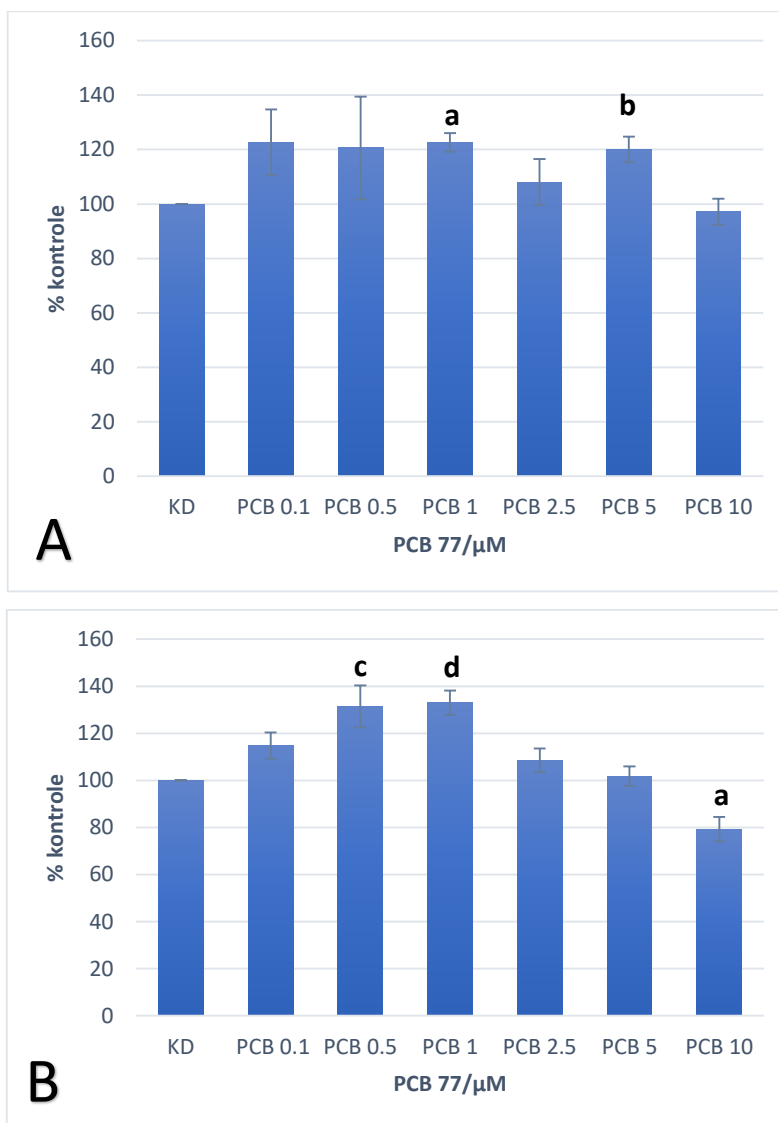
Nakon 72 sata inkubacije uočen je najizraženiji stimulatorni učinak PCB 77 na proliferaciju MCF-7 stanica. Koncentracije PCB 77 koje induciraju proliferaciju su 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  i 1  $\mu\text{M}$ . Koncentracije od 2,5  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  pokazuju nešto slabiji no još uvijek inducirajući učinak, dok 10  $\mu\text{M}$  PCB 77 pokazuje inhibitorno djelovanje koje je i statistički značajno ( $p < 0,005$ ). Statistički značajnu indukciju proliferacije pokazuju koncentracije od 0,5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) i 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ).

PCB 77 je molekula koplanarne strukture čiji se toksični potencijal povezuje s koplanarnom dioksinu sličnom strukturom koja mu omogućava vezanje na Ah receptor zbog čega može djelovati toksično i na stanice reproduktivnog sustava (Jansen i sur., 1993). To je samo jedan od mogućih mehanizama citotoksičnih učinaka PCB 77. PCB 77 u višim dozama inducira apoptozu CHO-K1 stanica (Murati i sur., 2015) što rezultira smanjenom staničnom proliferacijom koja je potvrđena i u ovoj studiji pri najvišoj apliciranoj dozi. Endo i sur. (2003) su istraživali utjecaj PCB kongenra na staničnu funkciju i proliferaciju ljudskih stanica raka prostate LNCaP. Dokazali su da PCB 153 i PCB 118 induciraju staničnu proliferaciju pri niskim koncentracijama dok je pri višim dozama taj efekt izostao. Baker i Bauer (2015) su također, između ostalog, istraživali djelovanje niskih doza (1 – 10  $\mu\text{M}$ ) PCB 102 na proliferaciju MCF-7/BOS stanica. Njihova studija je pokazala da nakon 72 sata inkubacije PCB 102 djeluje stimulatorno na proliferaciju MCF-7 stanica, a koncentracije koje su značajno inducirale proliferaciju su 1; 2,5; 5 i 10  $\mu\text{M}$ .



**Slika 10.** Učinak PCB 77 na proliferaciju MCF-7 stanica praćen metodom *Trypan Blue* nakon 24 (A), 48 (B) i 72 (C) h inkubacije. Kd – kontrola uz dodatak DMSO-a u koncentraciji  $10 \mu\text{L mL}^{-1}$  medija za uzgoj; koncentracija PCB 77 u mediju za uzgoj: PCB 0.1 –  $0.1 \mu\text{M}$ , PCB 0.5 –  $0.5 \mu\text{M}$ , PCB 1 –  $1 \mu\text{M}$ , PCB 2.5 –  $2.5 \mu\text{M}$ , PCB 5 –  $5 \mu\text{M}$ , PCB 10 –  $10 \mu\text{M}$ . Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu Kd određena Student *t*-testom: <sup>a</sup> $p < 0,05$ , <sup>b</sup> $p < 0,001$ , <sup>c</sup> $p < 0,005$ .

#### 4.2.3. Usporedba učinka PCB 77 na proliferaciju CHO-K1 i MCF-7 stanica nakon 72 sata



**Slika 11.** Usporedba učinka PCB 77 na proliferaciju CHO-K1 (A) i MCF-7 (B) stanica praćen metodom *Trypan Blue* nakon 72 sata inkubacije. Kd – kontrola uz dodatak DMSO-a u koncentraciji  $10 \mu\text{L mL}^{-1}$  medija za uzgoj; koncentracija PCB 77 u mediju za uzgoj: PCB 0.1 –  $0.1 \mu\text{M}$ , PCB 0.5 –  $0.5 \mu\text{M}$ , PCB 1 –  $1 \mu\text{M}$ , PCB 2.5 –  $2.5 \mu\text{M}$ , PCB 5 –  $5 \mu\text{M}$ , PCB 10 –  $10 \mu\text{M}$ . Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu Kd određena Student *t*-testom: <sup>a</sup> $p < 0,005$ , <sup>b</sup> $p < 0,025$ , <sup>c</sup> $p < 0,05$ , <sup>d</sup> $p < 0,001$ .

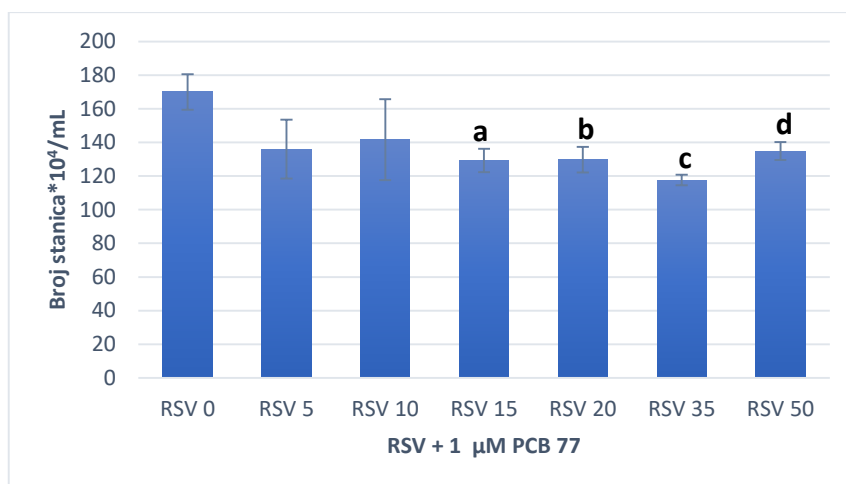
Na Slici 11 prikazana je usporedba učinka PCB 77 na proliferaciju stanica reprodukcijuskog sustava nakon 72 sata. Statistički značajna koncentracija PCB 77 koja je inducirala proliferaciju na obje stanične linije je 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$  -  $p < 0,005$ ). Najviši proliferativni efekt pri toj koncentraciji je utvrđen nakon 72 sata inkubacije. Na temelju dobivenih rezultata dalje se ispitivao protektivni učinak resveratrola na PCB 77 induciranu proliferaciju na obje stanične linije reprodukcijuskog sustava.

#### **4.3. UČINAK RESVERATROLA NA PCB 77 INDUCIRANU PROLIFERACIJU U CHO-K1 I MCF-7 STANICAMA ODREĐEN METODOM TRYPAN BLUE**

U svrhu određivanja mogućeg protektivnog učinka resveratrola na PCB 77 induciranu proliferaciju u obje stanične linije, otpipetira se 2 mL suspenzije stanica u jažice na *multiwell* pločama u koncentraciji od  $2 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  za CHO-K1 i  $5 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  za MCF-7 stanice. Nakon otprilike 3 sata stanice se tretiraju različitim koncentracijama otopine resveratrola. Budući da je u prvom dijelu ovog istraživanja pokazano da koncentracije resveratrola iznad 50  $\mu\text{M}$  značajno inhibiraju proliferaciju obiju kultura stanica, uzete su koncentracije od 5, 10, 15, 20, 35 i 50  $\mu\text{M}$ . U svaku jažicu je dodano 20  $\mu\text{L}$  otopine resveratrola osim kontrolnih jažica gdje je dodan DMSO. Nakon 24 sata stanice su tretirane 1  $\mu\text{M}$  otopinom PCB 77. Jažice u koje je dodan DMSO također su tretirane 1  $\mu\text{M}$  otopinom PCB 77. Kako je prethodnim pokusima utvrđeno da je najveća indukcija PCB 77 na proliferaciju stanica postignuta nakon 72 sata, stanice se inkubiraju 72 sata, nakon čega se metodom *Trypan Blue* određuje stanje stanica (broj živih i mrtvih stanica) u svakoj jažici.

##### **4.3.1. Učinak resveratrola na PCB 77 induciranu proliferaciju u CHO-K1 stanicama**

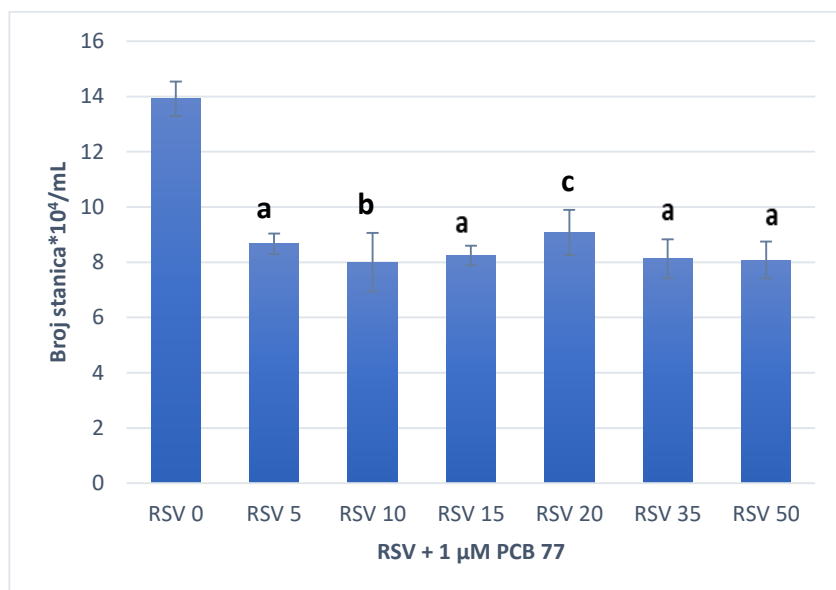
Iz dobivenih rezultata prikazanih na Slici 12 može se zaključiti da predtretman resveratrolom ima protektivni učinak, odnosno da resveratrol suprimira PCB 77 induciranu proliferaciju CHO-K1 stanica. Povećana proliferacija stanica dovodi do nekontroliranog dijeljenja stanica što u konačnici može rezultirati nastankom raka. Sve koncentracije resveratrola su inhibirale proliferaciju stanica izazvanu djelovanjem PCB 77 u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$ . Statistički značajno su inhibirale koncentracije resveratrola od 15  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,025$ ), 20  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ), 35  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ) i 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ).



**Slika 12.** Učinak resveratrola na PCB 77 induciranu proliferaciju CHO-K1 stanica praćeno metodom *Trypan Blue* nakon 72 sata. Koncentracija resveratrola u mediju za uzgoj: RSV 50 – 50  $\mu\text{M}$ , RSV 35 – 35  $\mu\text{M}$ , RSV 20 – 20  $\mu\text{M}$ , RSV 15 - 15  $\mu\text{M}$ , RSV 10 – 10  $\mu\text{M}$ , RSV 5 – 5  $\mu\text{M}$ , RSV 0 – 0  $\mu\text{M}$  uz dodatak 1  $\mu\text{M}$  PCB 77. Statistički značajna razlika u odnosu na stanice tretirane samo s PCB 77, bez predinkubacije resveratrolom (RSV 0) određena Student *t*-testom: <sup>a</sup> $p < 0,025$ , <sup>b</sup> $p < 0,05$ , <sup>c</sup> $p < 0,01$ , <sup>d</sup> $p < 0,005$ .

#### 4.3.2. Učinak resveratrola na PCB 77 induciranu proliferaciju u MCF-7 stanicama

Rezultati prikazani na Slici 13 pokazuju kako resveratrol ima supresivni učinak na PCB 77 induciranu proliferaciju i na MCF-7 stanicama. Sve koncentracije resveratrola su statistički značajno inhibirale proliferaciju MCF-7 stanica: 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ), 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ), 15  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ), 20  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ), 35  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ) i 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ).



**Slika 13.** Učinak resveratrola na PCB 77 induciranu proliferaciju MCF-7 stanica praćeno metodom *Trypan Blue* nakon 72 sata. Koncentracija resveratrola u mediju za uzgoj: RSV 50 – 50 µM, RSV 35 – 35 µM, RSV 20 – 20 µM, RSV 15 - 15 µM, RSV 10 – 10 µM, RSV 5 – 5 µM, RSV 0 – 0 µM uz dodatak 1 µM PCB 77. Statistički značajna razlika u odnosu na stanice tretirane samo s PCB 77, bez predinkubacije resveratrolom (RSV 0) određena Student *t*-testom: <sup>a</sup>p<0,005, <sup>b</sup>p<0,05, <sup>c</sup>p<0,01.

Iz usporedbe rezultata učinka predtretmana resveratrolom na dvije stanične linije reproduktivnog sustava (Slika 12 i 13) uočljiv je izraženiji supresivni efekt u kulturi stanica karcinoma ljudske dojke pri čemu su sve doze resveratrola statistički značajno umanjile PCB 77 induciranu proliferaciju. Osobitost MCF-7 stanica je ta da su one ER pozitivne, odnosno ovisne o estrogenu koji posrednim mehanizmima potiče stanični rast. To je jedna od malobrojnih staničnih linija primjenjiva za izražavanje invazivnih ljudskih karcinoma dojki kod kojih je povećana ekspresija ER $\alpha$ , jedna od najranijih promjena u procesu nastanka tumora (Lee i sur., 2015). PCB-i djeluju kao endokrini modulatori (ATSDR, 2000), te su određeni estrogen-stimulativni efekti na staničnu proliferaciju pri malim dozama PCB-a, odnosno značajna inhibicija staničnog rasta pri višim dozama (Bonefeld-Jørgensen i sur., 2001), što je potvrđeno i u ovom radu za niske koncentracije PCB 77 koji je inducirao staničnu proliferaciju što je posebno izraženo u MCF-7 stanicama dojke (Slike 10C i 11B). Za resveratrol je također utvrđeno da djeluje kao agonist/antagonist estrogenih hormona (Bowers i sur., 2000). Obzirom na navedeno, moguće su mnogobrojne intracelularne interakcije resveratrol-PCB-i, koje su u ovom radu pokazale da je

moгуće resveratrolom suprimirati PCB 77 induciranu proliferaciju s izraženijim učinkom u estrogen ovisnim reprodukcijским tkivima.

## 5. ZAKLJUČCI

- CHO-K1 i MCF-7 stanične linje su se pokazale kao zadovoljavajući alternativni test sustavi u praćenju utjecaja PCB 77 i resveratrola na proliferaciju stanica.
- Inhibicija proliferacije CHO-K1 stanica djelovanjem resveratrola određena *MTT* metodom bila je statistički značajna za koncentracije od 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ) i 75  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ) nakon 48 sati inkubacije. Statistički značajna indukcija proliferacije CHO-K1 stanica djelovanjem resveratrola određena metodom *MTT* nakon 48 sati tretmana je pri 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ), 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,025$ ) i 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ).
- Sve koncentracije resveratrola su inhibirale rast MCF-7 stanica u odnosu na kontrolu što je određeno metodom *MTT* nakon 48 sati inkubacije. Statistički značajno su inhibirale koncentracije od 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ), 75  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) i 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,025$ ).
- PCB 77 24 sata nakon tretmana ne pokazuje nikakav učinak na proliferaciju CHO-K1 stanica u odnosu na kontrolu. Nakon 48 sati stanice rastu, ali induktivni učinak i dalje nije primjećen, dok je statistički značajno inhibirala staničnu proliferaciju koncentracija od 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,025$ ). Najveću indukciju proliferacije CHO-K1 stanica izmjerenu metodom *Trypan Blue* djelovanjem PCB 77, stanice pokazuju nakon 72 sata. Sve koncentracije osim 10  $\mu\text{M}$  potiču staničnu proliferaciju. Statistički značajna indukcija u odnosu na kontrolu je pri 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ) i 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,025$ ).
- Utjecaj PCB 77 na MCF-7 stanice nakon 24 sata nije uočen. Nakon 48 sati vrlo niske koncentracije potiču staničnu proliferaciju, a statistički značajno je potiče koncentracija od 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) što je određeno metodom *Trypan Blue*. 72 sata nakon tretmana primjećen je najviši stimulatorni efekt. Statistički značajno stimuliraju proliferaciju koncentracije od 0.5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) i 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ). Koncentracija od 10  $\mu\text{M}$  statistički značajno ( $p < 0,005$ ) inhibira proliferaciju stanica nakon 72 sata.



- Supresivni učinak resveratrola na PCB 77 induciranu proliferaciju CHO-K1 stanica nakon 72 sata je određen metodom *Trypan Blue*. Sve koncentracije resveratrola pokazuju supresivni učinak, a statistički značajno suprimiraju koncentracije od 15  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,025$ ), 20  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ), 35  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ) i 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ).
- Statistički značajni supresivni učinak resveratrola na induciranu proliferaciju MCF-7 stanica određen metodom *Trypan Blue* nakon 72 sata je utvrđen kod svih koncentracija: 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ), 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ), 15  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ), 20  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ), 35  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ) i 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ).

## 6. LITERATURA

- Aitken, S. C., Lippman, M. E. (1985) Effect of estrogens and antiestrogens on growth regulatory enzymes in human breast cancer cells in tissue culture. *Cancer Res.* **45**, 1611-1620.
- Arsenescu, V., Arsenescu, R. I., King, V., Swanson, H., Cassis, L. A. (2008) Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. *Environ. Health Persp.* **116**, 761–768.
- Ashby, J., Tinwell, H., Pennie, W. (1999) Partial and weak oestrogenicity of the red wine constituent resveratrol: consideration of its superagonist activity in MCF-7 cells and its suggested cardiovascular protective effects. *J. Appl Toxicol.* **19**, 39–45.
- ATSDR (2000) Toxicological profile for polychlorinated byphenyls (PCBs), ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry, <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp17-c4.pdf>>. Pristupljeno 21. studenog 2017.
- ATTC (2016a) CHO-K1. ATTC – American Type Culture Collection, ≤ <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-9618.aspx>>. Pristupljeno 23. studenog 2017.
- ATTC (2016b) MCF-7. ATTC – American Type Culture Collection, ≤ <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx>>. Pristupljeno 23. studenog 2017.
- Baker, K. M., Bauer, A. C. (2015) Green tea catechin, EGCG, suppresses PCB 102-induced proliferation in estrogen-sensitive breast cancer cells. *Int. J. Breast Cancer* **2015**. doi: 10.1155/2015/163591.
- Bandiera, S., Safe, S., Okey, A. B. (1982) Binding of polychlorinated byphenyls classified as either phenobarbitone-, 3-methylcholanthrene-, or mixed-type inducers to cytosolic Ah receptor. *Chem. Biol. Interact.* **39**, 259-277.
- Basso, E., Fiore, M., Leone S., Degrassi F., Cozzi R. (2013) Effects of resveratrol on topoisomerase II- $\alpha$  activity: induction of micronuclei and inhibition of chromosome segregation in CHO-K1 cells. *Mutagenesis* **28**, 243-8.
- Baur, J. A., Sinclair, D. A. (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **5**, 493-506.

- Bergkvist, C., Oberg, M., Appelgren, M., Becker, W., Aune, M., Ankarberg, E. H., Berglund, M., Hakansson, H. (2008) Exposure to dioxin-like pollutants via different food commodities in Swedish children and young adults. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 3360-3367.
- Bitman, J., Cecil, H. C. (1970) Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls. *J. Agric. Food Chem.* **18**, 1108-1112.
- Bonfeld-Jørgensen, E. C., Andersen, H. R., Rasmussen, T. H., Vinggaard, A. M. (2001) Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology* **158**, 141–153.
- Borrás, C., Gambini, J., Gómez-Cabrera, M. C. (2005) 17 $\beta$ -oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2<sup>[MAPK]</sup>/NF $\kappa$ B cascade. *Aging Cell.* **4**, 113–118.
- Bowers, J. L., Tyulmenkov, V. V., Jernigan, S. C., Klinge, C. M. (2000) Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* **141**, 3657–3667.
- Calamini, B., Ratia, K., Malkowski, M. G., Cuendet, M., Pezzuto, J. M., Santarsiero, B. D., Mesecar, A. D. (2010) Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. *Biochem. J.* **429**, 273-282.
- Casper, R. F., Quesne, M., Rogers, I. M., Shirota, T., Jolivet, A., Milgrom, E., Savouret, J. F. (1999) Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. *Mol. Pharmacol.* **56**, 784-90.
- Chapados, N. A., Casimiro, C., Robidoux, M. A., Haman, F., Batal, M., Blais, J. M., Imbeault, P. (2012) Increased proliferative effect of organochlorine compounds on human preadipocytes. *Mol. Cell Biochem.* **365**, 275-278.
- Cherdshewasart, W., Panriansaen, R., Picha, P. (2007) Pretreatment with phytoestrogen-rich plant decreases breast tumor incidence and exhibits lower profile of mammary ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *Maturitas* **58**, 174-81.
- Chung, M.-I., Teng, C.-M., Cheng, K.-L., Ko, F.-N., Lin, C.-N. (1992) An antiplatelet principle of *Veratrum formosanum*. *Planta Med.* **58**, 274–276.
- Ciencewicki, J., Trivedi, S., Kleeberger, S. R. (2008) Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, 456–468.

- Colin, D., Gimazane, A., Lizard, G. (2009) Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *Int. J. Cancer* **124**, 2780–2788.
- Costa, L. G., Fattori, V., Giordano, G., Vitalone, A. (2007) An *in vitro* approach to assess the toxicity of certain food contaminants: methylmercury and polychlorinated biphenyls. *Toxicology* **237**, 65-67.
- Cottart, C. H., Nivet-Antoine, V., Laquillier-Morizot, C., Beaudoux, J. L. (2010) Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 7-16.
- EMS (2017) Fuchs Resenthal Counting Chamber. EMS – Electron Microscopy Sciences <<https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/63512-10.aspx>>. Pristupljeno 28. studenog 2017.
- Endo, F., Monsees, T. K., Akaza, H., Schill, W.-B., Pflieger-Bruss, S. (2003) Effects of single non-ortho, mono-ortho, and di-ortho chlorinated biphenyls on cell functions and proliferation of the human prostatic carcinoma cell line, LNCap. *Rprod. Toxicol.* **17**, 229-236.
- Fontecave, M., Lepoivre, M., Elleingand, E., Gerez, C., Guittet, O. (1998) Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett.* **421**, 277-9.
- Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K. M., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J., Borrás, C. (2015) Properties of resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and human. *Oxid. Med. Cell Longev.* doi: 10.1155/2015/837042.
- Gehm, B. D., McAndrews, J. M., Chien, P.-Y., Jameson, J. L. (1997) Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 14138–14143.
- Hadi, S. M., Ullah, M. F., Azmi, A. S. (2010) Resveratrol mobilizes endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for chemoprevention of cancer. *Pharm. Res.* **27**, 979–988.
- Hanawa, F., Tahara, S., Mizutani, J. (1992) Antifungal stress compounds from *Veratrum grandiflorum* leaves treated with cupric chloride. *Phytochemistry* **31**, 3005–3007.

- Hsieh, T. C., Wu, J. M. (1999) Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp. Cell Res.* **249**, 109-15.
- Huang, C., Ma, W. Y., Goranson, A., Dong, Z. (1999) Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis* **20**, 237-42.
- Inglés, M., Gambini, J., Miguel, M. G. (2014) PTEN mediates the antioxidant effect of resveratrol at nutritionally relevant concentrations. *BioMed Res. Int.* doi:10.1155/2014/580852.
- Ishikawa, Y., Noma, Y., Yamamoto, T., Mori, Y., Sakai, S. (2007) PCB decomposition and formation in thermal treatment plant equipment. *Chemosphere* **67**, 1383-1393.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., Pezzuto, J. M. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**, 218-20.
- Jannin, B., Menzel, M., Berlot, J.-P., Delmas, D., Lançon, A., Latruffe, N. (2004) Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 1113–1118.
- Jensen, S. (1966) Report of a new chemical hazard. *New scientist* **32**, 612.
- Jansen, H. T., Cooke, P. S., Porcelli, J., Liu, T. C., Hansen, L. G. (1993) Estrogenic and antiestrogenic actions of PCBs in the female rat: in vitro and in vivo studies. *Reprod. Toxicol.* **7**, 237-248.
- Kaneto, H., Katakami, N., Matsuhisa, M., Matsuoka, T. A. (2010) Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* doi: 10.1155/2010/453892.
- Kapadia, G. J., Azuine, M. A., Subba Rao, G., Arai, T., Iida, A. and Tokuda, H. (2011) Cytotoxic effect of the red beetroot (*Beta vulgaris* L.) extract compared to doxorubicin (adriamycin) in the human prostate (PC-3) and breast (MCF-7) cancer cell lines. *Anti-Cancer Agent. Me.* **11**, 280-284.
- Kerr, J. F., Winterford, C. M., Harmon, B. V. (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**, 2013-2026.

- Kmetič, I., Murati, T., Kvakan, K., Ivanjko, M., Šimić, B. (2012) Poliklorirani bifenili – toksičnost i rizici. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **4**, 71-80.
- Knerr, S., Schrenk, D. (2006) Carcinogenicity of "non-dioxinlike" polychlorinated biphenyls. *Crit. Rev. Toxicol.* **36**:663-694.
- Lee, A.V., Oesterreich, S., Davidson, N. E. (2015) MCF-7 cells--changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *J. Natl. Cancer Inst.* **107**, djv073.
- Liem, A. K., Furst, P., Rappe, C. (2000) Exposure of populations to dioxins and related compounds. *Food Addit. Contam.* **17**, 241-259.
- Lim, S. W., Loh, H. S., Ting, K. N., Bradshaw, T. D., Allaudin, Z. N. (2015) Reduction of MTT to purple formazan by vitamin E isomers in the absence of cells. *Trop. Life Sci. Res.* **26**, 111-120.
- Lin, H. Y., Lansing, L., Merillon, J. M., Davis, F. B., Tang, H. Y., Shih, A., Vitrac, X., Krisa, S., Keating, T., Cao, H. J., Bergh, J., Quackenbush, S., Davis, P. J. (2006) Integrin alphaVbeta3 contains a receptor site for resveratrol. *FASEB J.* **20**, 1742-4.
- Maier-Salamon, A., Böhmdrfer, M., Thalhammer, T., Szekeres, T., Jaeger, W. (2011) Hepatic glucuronidation of resveratrol: interspecies comparison of enzyme kinetic profiles in human, mouse, rat, and dog. *Drug Metab. Pharmacok.* **26**, 364–373.
- Marel, A.-K., Lizard, G., Izard, J.-C., Latruffe, N., Delmas, D. (2008) Inhibitory effects of *trans*-resveratrol analogs molecules on the proliferation and the cell cycle progression of human colon tumoral cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**, 538–548.
- Meeker, J. D., Hauser, R. (2010) Exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and male reproduction. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **56**, 122-131.
- Mehta, K., Pantazis, P., McQueen, T., Aggarwal, B. B. (1997) Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast tumor cell lines. *Anti-Cancer Drug.* **8**, 470-481.
- Moreno, J. J. (2000) Resveratrol modulates arachidonic acid release, prostaglandin synthesis, and 3T6 fibroblast growth. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**, 333-8.
- Murati, T., Šimić, B., Brozović, A., Kniewald, J., Miletić Gospić, A., Bilandžić, N., Kmetič, I. (2015) PCB 77 action in ovary cells--toxic effects, apoptosis induction and cell cycle analysis. *Toxicol. Mech. Methods* **25**, 302-311.

- Murati, T., Šimić, B., Pleadin, J., Vukmirović, M., Miletić, M., Durgo, K., Kniewald, J., Kmetič, I. (2017) Reduced cytotoxicity in PCB-exposed Chinese Hamster Ovary (CHO) cells pretreated with vitamin E. *Food Chem. Toxicol.* **99**, 17-23.
- Nonomura, S., Kanagawa, H., Makimoto, A. (1963) Chemical constituents of polygonaceous plants. Studies on the components of Ko-J O-Kon. (Polygonum Cuspidatum Sieb. Et Zucc.) *Yakuga. Zasshi* **83**, 988–990.
- Patandin, S., Dagnelie, P. C., Mulder, P. G., Op de Coul, E., van der Veen, J. E., Weisglas-Kuperus, N., Sauer, P. J. (1999) Dietary exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from infancy until adulthood: A comparison between breast-feeding, toddler, and long-term exposure. *Environ. Health Perspect.* **107**, 45-51.
- Paul, B., Masih, I., Deopujari, J., Charpentier, C. (1999) Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, an ayurvedic medicine from India. *J. Ethnopharmacolo.* **68**, 71–76.
- Pereg, D., Robertson, L. W., Gupta, R. C. (2002) DNA adduction by polychlorinated biphenyls: adducts derived from hepatic microsomal activation and from synthetic metabolites. *Chem. Biol. Interact.* **139**, 129-144.
- PETA (2017) Alternatives to animal testing. PETA - People for the Ethical Treatment of Animals. [<https://www.peta.org/issues/animals-used-for-experimentation/alternatives-animal-testing/>](https://www.peta.org/issues/animals-used-for-experimentation/alternatives-animal-testing/). Pristupljeno 24. studenog 2017.
- Pozo-Guisado, E., Alvarez-Barrientos, A., Mulero-Navarro, S., Santiago-Josefat, B., Fernandez-Salguero, P. M. (2002) The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 1375-86.
- Pozo-Guisado, E., Merino, J. M., Mulero-Navarro, S., Lorenzo-Benayas, M. J., Centeno, F., Alvarez-Barrientos, A., Fernandez-Salguero, P. M. (2005) Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kappaB. *Int. J. Cancer* **115**, 74-84.
- Radice, S., Chiesara, E., Fucile, S., Marabini, L. (2008) Different effects of PCB101, PCB118, PCB138 and PCB153 alone or mixed in MCF-7 breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 2561-2567.

- Renaud, S., de Lorgeril, M. (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*. **339**, 1523–1526.
- Resveratrolnews.com (2016) Resveratrol metabolism explained. <http://www.resveratrolnews.com/resveratrol-metabolism-explained/1319/>. Pristupljeno 13. studeni 2017.
- Robb, E. L., Page, M. M., Wiens, B. E., Stuart, J. A. (2008) Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: specific and progressive induction of MnSOD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**, 406–412.
- Roberts, R. A., Laskin, D. L., Smith, C. V., Robertson, F. M. (2009) Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol. Sci.* **112**, 4–16.
- Robertson, L. W., Hansen, L. G. (2001) PCBs: recent advances in environmental toxicology and health effects, University press of Kentucky, Kentucky.
- Roggen, E. L. (2011) *In vitro* Toxicity Testing in the Twenty-First Century. *Front Pharmacol.* **2**, 1-3. doi: 10.3389/fphar.2011.00003
- Ross, G. (2004) The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **59**, 275-291.
- Rubiolo, J. A., Mithieux, G., Vega, F. V. (2008) Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *Eur. J. Pharmacol.* **591**, 66–72.
- Rudel, R. A., Seryak, L. M., Brody, J. G. (2008) PCB-containing wood floor finish is a likely source of elevated PCBs in residents' blood, household air and dust: a case study of exposure. *Environ. Health* **7**, doi: 10.1186/1476-069X-7-2.
- Safe, S. (1993) Toxicology, structure-function relationship, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls: progress and problems. *Environ. Health Perspect.* **100**, 259-268.
- Safe S. (1994) Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* **24**, 87-149.
- Sang, S., Yang, I., Buckley, B., Ho, C.-T., Yang, C. S. (2007) Autoxidative quinone formation *in vitro* and metabolite formation *in vivo* from tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: studied by real-time mass spectrometry combined with tandem mass ion mapping. *Free Radical Bio. Med.* **43**, 362–371.



- Schwarz, M., Appel, K. E. (2005) Carcinogenic risks of dioxin: mechanistic considerations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **43**, 19-34.
- Siemann, E. H., Creasy, L. L. (1992) Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Viticult.* **43**, 49–52.
- Sigma-Aldrich (2017) PCB 77 analytical standard [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/35496?lang=en&region=HR&cm\\_sp=Insite-\\_prodRecCold\\_xviews-\\_prodRecCold10-1](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/35496?lang=en&region=HR&cm_sp=Insite-_prodRecCold_xviews-_prodRecCold10-1). Pristupljeno 23. studeni 2017.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., Goldberg, D. M. (1997a) Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* **30**, 91–113.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., Goldberg, D. M. (1997b) Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J. Clin. Lab. Anal.* **11**, 287–313.
- Takaoka M. J. (1940) Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.) *J. Fac. Sci. U Tokyo I* **3**, 1–16.
- Toborek, M., Barger, S. W., Mattson, M. P., Espandiari, P., Robertson, L. W., Hennig, B. (1995) Exposure to polychlorinated biphenyls causes endothelial cell dysfunction. *J. Biochem. Molec. Toxicol.* **4**, 219-226.
- Trela, B. C., Waterhouse, A. L. (1996) Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. *J. Agr. Food Chem.* **44**, 1235-1257. doi: 10.1021/jf9504576.
- Turner, R. T., Evans, G. L., Zhang, M., Maran, A., Sibonga, J. D. (1999) Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats? *Endocrinology* **140**, 50–54.
- UNEP (1999) Chemicals guidelines for the identification of PCBs and materials containing PCBs. United Nations Environment Programme. <http://wedocs.unep.org/handle/20.500.11822/8221>. Pristupljeno 21. studenog 2017.
- Urpi-Sarda, M., Zamora-Ros, R., Lamuela-Raventos, R. (2007) HPLC-tandem mass spectrometric method to characterize resveratrol metabolism in humans. *Clin. Chem.* **53**, 292–299.
- Wakui, S., Takagi, F., Muto, T., Yokoo, K., Hirono, S., Kobayashi, Y., Shirota, K., Akahori, F., Suzuki, Y., Hano, H., Endou, H., Kanai, Y. (2007) Spermatogenesis in aged rats after prenatal 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl exposure. *Toxicology* **238**, 186-191.
- WHO (2000) Polychlorinated biphenyls (PCB) and polychlorinated dibenzofurans and dibenzo(p)dioxins (PCDF/D) in indoor air due to elastic sealants and coated particle

boards, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, [http://www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0016/123064/AQG2ndEd\\_5\\_10PCBs.PDF](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0016/123064/AQG2ndEd_5_10PCBs.PDF). Pristupljeno 19. studenog 2017.

- Yilmaz, B., Sandal, S., Chen, C. H., Carpenter, D. O. (2006) Effects of PCB 52 and PCB 77 on cell viability, [Ca<sup>2+</sup>] levels and membrane fluidity in mouse thymocytes. *Toxicology* **217**, 184–193.
- Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A. A. E., Tillement, J.-P. (1999) Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drug. Exp. Clin. Res.* **25**, 87–97.