

# Evaluacija učinaka resveratrola pri tretmanu stanica polikloriranim bifenilima određena in vitro metodama

---

**Petković, Tea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*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:159:824104>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-16**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

Tea Petković, 980/N

**EVALUACIJA UČINAKA  
RESVERATROLA PRI  
TRETMANU STANICA  
POLIKLORIRANIM BIFENILIMA  
ODREĐENA *IN VITRO*  
METODAMA**

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

*Zahvaljujem se Svemogućem Bogu na danom životu i svim darovima i talentima koje mi je pružio.*

*Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Ivani Kmetič što je pristala na mentorstvo i omogućila mi izradu diplomskog rada u Laboratoriju za toksikologiju.*

*Zahvaljujem se doc. dr. sc. Teuti Murati i Marini Miletić, mag. ing. na uloženom vremenu, volji, podršci, suradnji i pomoći tijekom izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se svojim roditeljima, bratu i obitelji na ljubavi, podršci, razumijevanju i vjeri tijekom svih godina studiranja.*

*I na kraju, veliko hvala mojim prijateljima i Danijelu na podršci, ljubavi, prijateljstvu i što su vjerovali u mene kad sam najviše sumnjala u sebe.*

## 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: Nutricionizam

### EVALUACIJA UČINAKA RESVERATROLA PRI TRETMANU STANICA POLIKLORIRANIM BIFENILIMA ODREĐENA *IN VITRO* METODAMA

*Tea Petković, 980/N*

**Sažetak:** U ovom radu ispitan je učinak različitih koncentracija resveratrola (2,5-20  $\mu$ M) pri citotoksičnom djelovanju 75  $\mu$ M PCB-a 77 ili 75  $\mu$ M PCB-a 153 na CHO (*Chinese Hamster Ovary*) – K1 stanice metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue* te metodom protočne citometrije. Utvrđeno je statistički značajno smanjenje vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolni uzorak pri tretmanu CHO-K1 stanica s PCB-em 77 i PCB-em 153 metodama *Neutral Red* i *Kenacid Blue*. Blagi protektivni učinak resveratrola (u koncentracijama 2,5, 5 i 10  $\mu$ M) je primijećen pri citotoksičnom djelovanju PCB-a 153, no nije se pokazao statistički značajnim. Toksični učinci dioksinu sličnog kongenera-PCB-a 77 na stanice ovarija nisu umanjeni, čak suprotno - djelovanjem resveratrola izraženiji je učinak na pad vijabilnosti stanica. Sve primijenjene *in vitro* metode pokazale su korespondirajuće rezultate.

**Ključne riječi:** resveratrol, PCB 77, PCB 153, *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, protočna citometrija

**Rad sadrži:** 73 stranice, 25 slika, 1 tablicu, 128 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:** doc. dr. sc. Teuta Murati

*Marina Miletić, mag. ing., asistent*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. *Kristina Radošević*
2. izv. prof. dr. sc. *Ivana Kmetič*
3. doc. dr. sc. *Teuta Murati*
4. prof. dr. sc. *Irena Landeka Jurčević* (zamjena)

**Datum obrane:** 19. srpnja 2019.

## 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: Nutrition

### EVALUATION OF RESVERATROL EFFECTS ON CELLS TREATED WITH POLYCHLORINATED BIPHENYLS DETERMINED WITH *IN VITRO* METHODS

*Tea Petković, 980/N*

**Abstract:** In this study, the effects of different resveratrol concentrations (2.5-20  $\mu\text{M}$ ) on cytotoxic activity of 75  $\mu\text{M}$  PCB 77 or 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 on CHO (*Chinese Hamster Ovary*) - K1 cells were determined by *Neutral Red* method, *Kenacid Blue* method and by flow cytometry. Statistically significant reduction in cell viability was observed after treatment of CHO-K1 cells with PCB 77 or PCB 153 in comparison to the control sample determined with *Neutral Red* and *Kenacid Blue* methods. The slight protective effect of resveratrol (at concentrations of 2.5, 5 and 10  $\mu\text{M}$ ) on cytotoxic activity induced by PCB 153 was observed, but results were not statistically significant. Toxic effects of dioxin-like congener-PCB 77 on ovarian cells were not reduced by the action of resveratrol, on the contrary - resveratrol has shown a more pronounced effect on the reduction in cell viability. All applied *in vitro* methods have shown to be consistent within results.

**Keywords:** resveratrol, PCB 77, PCB 153, *Neutral Red*, *Kenacid Blue*, flow cytometry

**Thesis contains:** 73 pages, 25 figures, 1 table, 128 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:** *PhD. Teuta Murati, Assistant Professor*

*Marina Miletić, M.S., Scientific Assistant*

#### Reviewers:

1. PhD. *Kristina Radošević*, Associate Professor
2. PhD. *Ivana Kmetič*, Associate Professor
3. PhD. *Teuta Murati*, Assistant Professor
4. PhD. *Irena Landeka Jurčević*, Full Professor (substitute)

**Thesis defended:** 19 July 2019

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. KULTURE STANICA.....	3
2.1.1. CHO ( <i>Chinese Hamster Ovary</i> ) – K1 stanična linija .....	3
2.2. TESTOVI CITOTOKSIČNOSTI.....	5
2.2.1. <i>Neutral Red</i> metoda .....	5
2.2.2. <i>Kenacid Blue</i> metoda .....	6
2.2.3. Alternativni testovi toksičnosti .....	8
2.3. STILBENI .....	8
2.3.1. Struktura i fizikalno – kemijska svojstva stilbena.....	9
2.3.2. Biosinteza stilbena .....	11
2.3.3. Resveratrol .....	11
2.4. POLIKLORIRANI BIFENILI (PCB-i) .....	14
2.4.1. Struktura i fizikalno – kemijska svojstva PCB-a .....	16
2.4.2. Toksikokinetika i izloženost PCB-ima.....	17
2.4.3. Metabolizam PCB-a.....	18
2.4.4. PCB 77 (3,3',4,4'-tetraklorbifenil).....	19
2.4.5. PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-heksaklorbifenil) .....	20
2.5. STANIČNA SMRT.....	21
2.5.1. Apoptoza .....	22
2.5.2. Nekroza .....	23
2.6. PROTEKTIVNI UČINCI RESVERATROLA NA TOKSIČNOST INDUCIRANU PCB-ima .....	24
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	26
3.1. Materijal.....	26
3.1.1. Biološki materijal.....	26
3.1.2. Kemikalije .....	26
3.1.3. Otopine i puferi.....	27
3.1.4. Oprema i uređaji .....	31
3.2. Metode rada.....	32
3.2.1. Održavanje CHO-K1 stanica u kulturi .....	32
3.2.2. Određivanje broja stanica metodom <i>Trypan Blue</i> .....	32
3.2.3. Određivanje učinka resveratrola pri citotoksičnom djelovanju PCB kongenera na vijabilnost CHO-K1 stanica <i>Neutral Red</i> metodom.....	33
3.2.4. Određivanje učinka resveratrola pri citotoksičnom djelovanju PCB kongenera na vijabilnost CHO-K1 stanica <i>Kenacid Blue</i> metodom.....	34
3.2.5. Određivanje učinka resveratrola pri citotoksičnom djelovanju PCB kongenera protočnim citometrom Muse-om.....	35
3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA .....	37
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	38



4.1. UČINAK RESVERATROLA PRI CITOTOKSIČNOM DJELOVANJU PCB-a 77 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN METODAMA <i>NEUTRAL RED</i> I <i>KENACID BLUE</i> .....	39
4.2. UČINAK RESVERATROLA PRI CITOTOKSIČNOM DJELOVANJU PCB-a 153 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN METODAMA <i>NEUTRAL RED</i> I <i>KENACID BLUE</i> .....	46
4.3. UČINAK RESVERATROLA PRI CITOTOKSIČNOM DJELOVANJU PCB-a 77 ILI PCB-a 153 ODREĐEN METODOM PROTOČNE CITOMETRIJE.....	52
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>58</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>61</b>

# 1. UVOD

Poliklorirani bifenili (eng. *polychlorinated biphenyls*, PCB-i) pripadaju razredu široko rasprostranjenih i perzistentnih zagađivača okoliša (Sánchez-Alonso i sur., 2003) koji se nenamjerno otpuštaju iz različitih antropogenih izvora i široko su rasprostranjeni u okolišu. S obzirom na njihovu termičku stabilnost, električni otpor i kemijsku inerciju, u širokoj su upotrebi (Borja i sur., 2005; Correa i sur., 2010; Mlynarczuk i sur., 2010). Glavni izvori emisije PCB-a su upotreba mješavina PCB-a kao sastojaka električnih kondenzatora, hidrauličnih ulja i lubrikanata u brojnim tehnološkim procesima. Također, PCB-i nastaju tijekom spaljivanja organskih materijala u prisutnosti spojeva koji sadrže klor (Sánchez-Alonso i sur., 2003).

PCB-i pripadaju velikoj skupini organokloriranih spojeva koji se međusobno razlikuju u fizikalno-kemijskim i toksikološkim svojstvima te imaju tendenciju bioakumulacije i biomagnifikacije u okolišu i unutar hranidbenih lanaca. Uslijed toga, ljudi mogu biti izloženi PCB-ima preko kontaminirane vode i hrane. Proizvodnja i uporaba PCB-a je određenim zakonskim propisima ograničena u većini zemalja Europske unije, dok je u nekim u potpunosti zabranjena. Međutim, u Republici Hrvatskoj rizik je još uvijek prisutan zbog vojnih razaranja tijekom Domovinskog rata (1991.-1995.) u kojem su oštećeni ili uništeni mnogi elektroenergetski, industrijski i drugi objekti iz kojih je došlo do istjecanja PCB-a (Kmetič i sur., 2012).

Toksičnost pojedinih polikloriranih bifenila ovisi o njihovoj strukturi (Sánchez-Alonso i sur., 2003). Glavni strukturni faktor, koji određuje toksična svojstva i potencijal PCB kongenera, je prisutnost atoma klora u *ortho*-položaju na bifenilnom prstenu (Murati i sur., 2015). Kongeneri s jednim atomom ili bez atoma klora kao substituenta u *ortho*-položaju mogu poprimiti planarnu konformaciju, vezati se na Ah receptor i na taj način djelovati toksično poput dioksina. S povećanjem broja atoma klora u *ortho*-položaju dolazi do gubitka svojstava sličnih dioksinu (Sánchez-Alonso i sur., 2003).

Dosadašnja znanstvena istraživanja ukazuju na razne negativne učinke PCB-a na ljudsko zdravlje. Dokazano je da PCB-i mogu izazvati reproduksijsku toksičnost te djelovati imunotoksično, neurotoksično i genotoksično (Kmetič i sur., 2012). Planarni PCB-i pokazuju svoje toksične učinke vezanjem na Ah receptor, dok se neplanarni PCB-i ne vežu za Ah receptor, no mogu biti ligandi za pripadnike obitelji proteina koji se nazivaju nuklearni receptori (Al-Salman i Plant, 2012).

Jako brzo se apsorbiraju u gastrointestinalnom traktu te distribuiraju i akumuliraju u jetri i adipoznom tkivu. Lako prolaze kroz posteljicu, izlučuju se u mlijeko i akumuliraju u fetusu/dojenčetu. PCB-i se metaboliziraju reakcijama hidroksilacije i potom reakcijama konjugacije. Stope metabolizma i posljedično ekskrecije se razlikuju između različitih kongenera (WHO, 2003).

U ovom istraživanju odredit će se i usporediti citotoksično djelovanje dvaju kongenera PCB-a različitog stupnja klorinacije i planarnosti (PCB 77; PCB 153) na CHO (*Chinese Hamster Ovary*) – K1 stanice, a zatim će se pokušati umanjiti citotoksične učinke PCB-a predinkubacijom stanica s resveratrolom. Slično kao većina polifenola, resveratrol ima intrinzičnu antioksidacijsku aktivnost zbog direktnog utjecaja na reaktivne kisikove/dušikove vrste (*ROS/RNS*, eng. *Reactive Oxygen Species/Reactive Nitrogen Species*) (Holthoff i sur., 2010) i protuupalnu aktivnost te se smatra da bi trebao imati protektivno djelovanje na stanice.

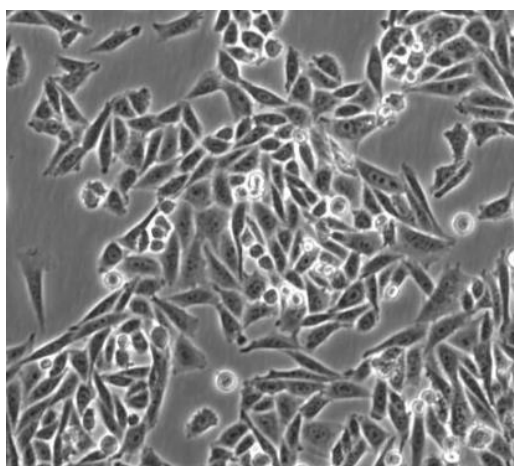
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KULTURE STANICA

Kultiviranje stanica je tehnika kojom se stanice izdvajaju (uklanjaju) iz organizma, bilo biljnog ili životinjskog, i prenose u medij (Lynn, 2009) gdje rastu u pogodnim umjetnim životnim uvjetima (Thermo Fisher Scientific, 2016). Tehnike kultivacije staničnih kultura su nužne za proučavanje interakcija između domaćina i patogena (Bergmann i Steinert, 2015). Uspješnost uzgoja stanične kulture ovisi o uspješnoj formulaciji odgovarajućeg medija za staničnu kulturu i uvjeta rasta (Echalier, 2018). Stanice se mogu izolirati direktno iz tkiva i međusobno se razdvojiti enzimskim ili mehaničkim načinima prije same kultivacije ili mogu potjecati od stanične linije ili staničnog soja koji je već uspostavljen. Uvjeti u kojima će stanične kulture rasti ovise o pojedinim tipovima stanica. Umjetno okruženje u kojima stanice rastu se sastoji od odgovarajuće posude za uzgoj stanica (npr. T-boca) u kojoj se nalaze supstrat ili medij koji stanicama osigurava esencijalne nutrijente (aminokiseline, ugljikohidrate, vitamine, minerale), faktore rasta, hormone te se *in vitro* regulira fizikalno – kemijsko okruženje (pH, tlak, temperatura). Rast većine stanica ovisi o vezanju stanica za podlogu pa tada govorimo o adherentnim stanicama ili kulturama u monosloju, dok druge kulture mogu rasti slobodno plutajući u mediju pa tada govorimo o kulturama u suspenziji. Ako se višak stanica ne koristi, onda se moraju tretirati odgovarajućim protektivnim sredstvom (DMSO ili glicerol) i skladištiti na temperaturama nižim od -130 °C (krioprezervacija) do sljedeće upotrebe. Stanične kulture možemo podijeliti na primarne stanične kulture, stanične linije i stanične sojeve (Thermo Fisher Scientific, 2016).

#### 2.1.1. CHO (*Chinese Hamster Ovary*) – K1 stanična linija

CHO (eng. *Chinese Hamster Ovary*) stanice (Slika 1) su izolirane iz jajnika kineskog hrčka. Često se koriste u biološkim i medicinskim istraživanjima te komercijalno za proizvodnju terapijskih proteina. CHO stanice su najčešće korištene stanice sisavaca u industrijskoj proizvodnji rekombinantnih terapijskih proteina (Wurm, 2004). 1957. godine Theodore T. Puck je prvi put izolirao CHO-K1 staničnu liniju subkloniranjem roditeljske CHO stanične linije koja je dobivena biopsijom ovarija odraslog kineskog hrčka (Puck i sur., 1958). CHO-K1 stanice zahtijevaju dodavanje aminokiseline prolin u medij zbog odsutnosti gena koji kodira za sintezu prolina (Gamper i sur., 2005).



**Slika 1.** CHO-K1 stanice 15 sati nakon naci jepljivanja (ECACC, 2017)

Tijekom 2012. godine prikazani su podaci za genomsku sekvencu CHO-K1 stanične linije, koja sadrži 2.45 Gb genomske sekvence s 24 383 predviđenih gena. Zanimljivo je da su identificirani mnogi geni koji su uključeni u glikozilaciju. To je glavni čimbenik koji utječe na terapeutsku kvalitetu proteina i osjetljivost virusa. Mnogi virusni geni prisutni u genomu CHO-K1 stanica nisu eksprimirani, što može objasniti zašto mnoge stanične linije CHO pokazuju otpornost na viruse (Xu i sur., 2011).

CHO-K1 stanična linija se danas uzgaja pri 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> u Ham-ovom F-12 mediju uz dodatak 5-20% fetalnog goveđeg seruma. CHO-K1 stanična linija raste u monosloju pa je tijekom subkultivacije potrebno provoditi tripsinizaciju (ATCC, 2019; ECACC, 2017). S obzirom na nizak broj kromosoma za sisavce (n=22), CHO stanice predstavljaju dobar model za istraživanja kultura tkiva i radijacijske citogenetike (Tjio i Puck, 1958).

CHO stanične linije i njihovi subklonovi imaju široku primjenu budući da mogu biti genetički manipulirani da rastu kao adherentne ili suspenzijske stanice te se mogu koristiti u proizvodnji terapeutskih rekombinantnih proteina (Kang i sur., 2016). To je rezultiralo da ove stanične linije igraju dominantnu ulogu kao sustavi ekspresije domaćina za široki raspon proizvoda kao što su faktori rasta, hormoni, monoklonska antitijela, interferoni i enzimi (Puck i sur., 1958). One su također široko korištene u *in vitro* studijama koje se bave istraživanjima vezanim uz rak jajnika (Jacob i sur., 2014).

## 2.2. TESTOVI CITOTOKSIČNOSTI

Određivanje biološke aktivnosti prirodnih spojeva i novosintetiziranih kemikalija provodi se izvođenjem niza testova na različitim organizmima (*in vivo*) ili u kulturama životinjskih/humanih stanica (*in vitro*) kako bi se na temelju toga mogao procijeniti njihov učinak na ljude. *In vitro* testovi citotoksičnosti razvijeni su kao alternativa klasičnim *in vivo* testovima na pokusnim životinjama i uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama, dijelovima tkiva, kulturama organa, itd. (Kniewald i sur., 2005). Razvoj *in vitro* testova potaknut je zbog znanstvenih, ekonomskih i etičkih razloga. Već desetljećima, u laboratorijima koji provode *in vivo* ispitivanja na pokusnim laboratorijskim životinjama, nastoji se primjenjivati takozvani 3R pristup (eng. *Reduce, Refine, Replace*), kojim se želi smanjiti broj životinja koje se koriste, a uznemirenost, bol i patnju životinja tijekom izvođenja testova svesti na minimum te u konačnici, gdje god je moguće zamijeniti *in vivo* testove alternativnim *in vitro* metodama (Radojčić Redovniković i sur., 2016).

### 2.2.1. *Neutral Red* metoda

Metoda *Neutral Red* daje kvantitativnu procjenu broja vijabilnih stanica, a jedan je od najčešće korištenih testova citotoksičnosti. Temelji se na sposobnosti vijabilnih stanica da inkorporiraju i vežu boju *Neutral Red* u lizosomima. Stanice se nacijepu na ploče i tretiraju se radnom otopinom *Neutral Red* nakon čega slijedi inkubacija pri 37 °C u sterilnim uvjetima tijekom 2-3 sata. Nakon toga slijedi ispiranje boje i očitavanje apsorbancije pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 540 nm. Ova metoda je jeftinija i osjetljivija od ostalih testova citotoksičnosti (Repetto i sur., 2008).

Test je razvijen na Rockefeller Sveučilištu kao kemosenzitivni test stanične vijabilnosti. Slaba kationska boja prolazi kroz staničnu membranu neionskom pasivnom difuzijom i koncentrira se u lizosomima, gdje se elektrostatskim hidrofobnim vezama veže na anionske i/ili fosfatne skupine matriksa u lizosomima. Nakon toga se boja ekstrahira iz vijabilnih stanica korištenjem zakiseljene otopine alkohola i mjeri apsorbancija korištenjem spektrofotometra (Repetto i sur., 2008). Pri fiziološkom pH *Neutral Red* boja ima naboj približan nuli što joj omogućava prolazak kroz staničnu membranu. Unutar lizosoma je protonski gradijent koji održava niži pH nego što je u citoplazmi. Zbog toga boja postaje nabijena i zadržava se unutar lizosoma. Nakon što stanica umre ili se smanji pH gradijent,

boja se ne može zadržati. Stoga je količina boje koja je zadržana u lizosomima proporcionalna broju vijabilnih stanica. Unos *Neutral Red* boje u stanicama se može mijenjati ovisno o promjenama u stanici ili na membranama lizosoma. Iz tog razloga je moguće razlikovati vijabilne, oštećene ili mrtve stanice zbog specifičnog kapaciteta lizosoma za vezanje boje. Lizosomski integritet, s istodobnim vezanjem *Neutral Red* boje, je snažan senzitivni indikator stanične vijabilnosti. Ovaj test određuje staničnu vijabilnost i može se koristiti za mjerenje stanične replikacije, citostatičkih efekata ili stanične smrti (Repetto i sur., 2008).

Kao i kod svake metode, postoje prednosti i nedostaci. Prednosti ove metode su što je osjetljiva i može se odmah kvantificirati, odnosno odrediti broj vijabilnih, živih stanica. Najmanje je dva puta jeftinija od ostalih testova citotoksičnosti te ne koristi nestabilne reagense koji su potrebni u drugim testovima vijabilnosti stanica koji koriste tetrazolijeve soli (MTT, MTS, XTS,...) koji procjenjuju, odnosno kvantificiraju aktivnost dehidrogenaze kemijskom redukcijom soli do formazana. Isto tako, ova metoda zahtijeva manje opreme za procjenu vijabilnosti. Karakterizira ju jednostavnost, jeftinija je i detektira samo vijabilne stanice. Jednom kad se započne test, mora se odmah završiti jer stanice nije moguće zamrznuti. *Neutral Red* metoda je kompatibilna s određivanjem ukupnog sadržaja proteina, jer je moguće izvesti određivanje ukupnog sadržaja proteina i test *Neutral Red* na istoj kulturi, što znači da se test može provesti i nakon toga odrediti sadržaj staničnih proteina. Naravno, postoje i neka ograničenja metode, a ona ovise o karakteristikama spojeva koji se testiraju: spojevima koji su hlapljivi, nestabilni ili eksplozivni u vodi i/ili slabe, niske topljivosti (Repetto i sur., 2008). Teško je provedbom ove metode odrediti moguću toksičnost.

### 2.2.2. *Kenacid Blue* metoda

Citotoksični učinak kemikalija na stanične kulture se može pratiti promjenom količine ukupnih proteina u stanici (*Kenacid Blue* metoda). Osnova ove metode je da citotoksične kemikalije (bez obzira na mjesto ili mehanizam djelovanja) interferiraju s ovim procesom i iz tog razloga dolazi do redukcije stope rasta što se reflektira na broj stanica. Stupanj inhibicije rasta, povezan s koncentracijom spoja koji se ispituje, ukazuje na indikaciju trovanja (toksičnosti) (Clothier, 1995). Stanične kulture se tretiraju određenim spojevima koji se ispituju i to u različitom rasponu koncentracija te se broj vijabilnih stanica i/ili ukupnih staničnih proteina određuje nakon određenog vremena izloženosti metodom *Kenacid Blue*. Potonja metoda se može provesti i nakon prethodno provedene *Neutral Red* metode (Clothier,

1995). Broj stanica tretiranih s određenim spojevima koji se testiraju se uspoređuje s brojem stanica u kontroli i po tom se računa postotak inhibicije rasta.  $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$  i  $IC_{80}$  koncentracije (koncentracije koje uzrokuju 20, 50 i 80%-tnu inhibiciju rasta) se određuju i izražavaju u  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ili kao mM (Clothier, 1995).

*Kenacid Blue* metoda je relativno jednostavna tehnika koja nije skupa. Postoje i određena ograničenja ove metode. Hlapljivi spojevi imaju tendenciju isparavanja u uvjetima u kojima se metoda primjenjuje, pa  $IC_{50}$  vrijednosti mogu varirati, osobito ako je toksičnost spoja koji se ispituje prilično niska. Da bi se smanjio stupanj isparavanja, mogu se koristiti mineralna ulja. Druge kemikalije koje je teško ispitati uključuju one koje su nestabilne ili eksplozivne u vodi. Isto tako, netopljivi spojevi nisu prikladni za ovu metodu. Druge poteškoće se povezuju s prirodom staničnih linija koje se koriste, npr. ubrzani rast stanica, nediferencirajuće stanice s vrlo niskom metaboličkom aktivnošću, problemi direktne ekstrapolacije rezultata kad se metoda provodi *in vivo*. Spojevi koji specifično „napadaju“ stanice koje se dijele mogu biti toksičniji nego što bi bili u *in vivo* (Clothier, 1995).

Jedan od nedostataka spomenute metode je da se ponekad *Kenacid Blue* boja može taložiti. Vjerojatnost da će se to dogoditi se povećava s produljenjem vremena rada. Drugi problem koji se može dogoditi je taloženje prstena obojenih proteina oko stijenke jažice, na granici zrak/medij za kultivaciju stanica. Ova pojava se povećava prilikom povećane evaporacije ili ako stanični medij nije primjereno uklonjen pa će istaloženi proteini dati netočnu procjenu ukupnih staničnih proteina (Clothier, 1995).

Prednosti ove metode su da se može ponoviti više puta na istim stanicama, stanice se mogu fiksirati pa se bojanje može provesti kasnije, distribucija stanica se može jasno vidjeti golim okom kad se obojaju *Kenacid Blue* bojom prije desorpcije te na taj način brzo ukazati na uspješnost metode. Unatoč nedostacima i ograničenjima, ova metoda omogućava brzu procjenu toksičnosti spojeva i daje rezultate za veliki broj spojeva te u određenim uvjetima direktno uspoređivanje *Kenacid Blue* i *Neutral Red* metode može biti od velike važnosti, jer može pružiti, u slučaju nekih spojeva, dodatne informacije (Clothier, 1995).



### 2.2.3. Alternativni testovi toksičnosti

Alternativni testovi toksičnosti su metode koje omogućuju smanjenje broja životinja koje se koriste u testiranjima, oplemenjuju toksikološke procedure tako da budu što manje bolne i stresne za laboratorijske životinje te zamjenjuju životinjske s ne-životinjskim sustavima (*in vitro*, *ex-vivo* ili *in silico* sustavi) (Kandárová i Letašiová, 2011).

Prednosti *in vitro* testova su to što se provode u kontroliranim uvjetima, omogućuju visoku razinu standardizacije, smanjenje varijabilnosti između eksperimenata, brzinu u provođenju testova i niske troškove testiranja. Potrebna je mala količina materijala koji se testira, proizvodi se ograničena količina toksičnog otpada, mogu se koristiti ljudska tkiva i stanice, mogu se koristiti transgenične stanice koje nose ljudske gene i sveukupno se smanjuje testiranje na životinjama. Neka od ograničenja većine *in vitro* testova su: nemogućnost testiranja interakcija između tkiva i organa, nemogućnost korištenja *in vivo* doze-odgovora za procjenu rizika za čovjeka u većini *in vitro* test sustava, nemogućnost procjene sistemskih učinaka, nemogućnost procjene farmakokinetike, nemogućnost testiranja kroničnih učinaka te tehnološka ograničenja (Kandárová i Letašiová, 2011).

Postoji nekoliko validiranih metoda koje se mogu koristiti kao djelomične ili potpune zamjene za eksperimente na životinjama (npr. testiranje genotoksičnosti, ispitivanje lokalne toksičnosti, učinci kao što su iritacija, ispitivanje sigurnosti kozmetičkih proizvoda). Kao što je dokazano u nekoliko međunarodnih validacijskih studija, alternativne metode imaju potencijal smanjiti broj eksperimentalnih životinja potrebnih za pokuse ili čak u potpunosti zamijeniti životinje u testiranjima. Strategije testiranja koje kombiniraju metode *in vitro*, *ex vivo* i *in silico* mogu biti uspješne u područjima u kojima samo jedna alternativna metoda trenutno može biti nedovoljna (Kandárová i Letašiová, 2011).

## 2.3. STILBENI

Stilbeni se ubrajaju u skupinu neflavonoidnih polifenola (Crozier i sur., 2006). Predstavljaju malu skupinu biljnih sekundarnih metabolita nastalih fenilpropanoidnim putem, a proizvode ih brojne međusobno nepovezane biljne vrste (Chong i sur., 2009). Fenilpropanoidi su velika skupina biljnih sekundarnih metabolita koji su uključeni u odgovore na različite biotičke (bakterije, gljivice, virusi, paraziti) i abiotičke (temperatura, suša, sol, teški metali) stresove. Mnogi fenilpropanoidi su antimikrobni spojevi koji se sintetiziraju kao

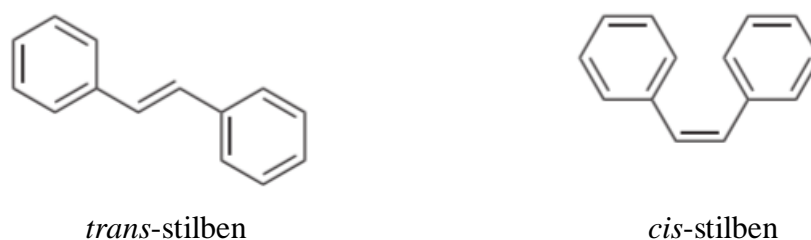
odgovor na napad patogena ili biljojeda te se klasificiraju kao fitoaleksini (Chong i sur., 2009), odnosno spojevi koje proizvode biljke kao odgovor na napad gljivica, bakterija i virusnih patogena (Crozier i sur., 2006). Ostale važne uloge fenilpropanoide su signalizacija obrambenih odgovora, zaštita od oštećenja nastalih pod utjecajem UV svjetla i porast biodostupnosti nutrijenata koji sadrže molekule koje vežu fosfor i/ili dušik (Chong i sur., 2009). Ime za stilbene (1,2-difeniletlen) dolazi od grčke riječi *stilbos*, što znači isijavanje (Likhtenshtein, 2009). Ovi spojevi imaju vrlo važan utjecaj u rezistenciji biljaka na bolesti te na ljudsko zdravlje. Postoje brojni dokazi kako stilbeni sudjeluju u obrambenim mehanizmima biljaka (Chong i sur., 2009). Najčešći i najpoznatiji spoj među stilbenima je resveratrol. Postoji u obliku *cis*- i *trans*-izomera te je u biljkama najčešće prisutan u obliku *trans*-resveratrol-3-*O*-glukozida koji je poznat kao piceid i polidatin (Crozier i sur., 2006). Uz resveratrol, reprezentativni spoj je i kombrestatin A-4 fosfat. Zajedno s resveratrolom se koristi u kliničkim istraživanjima lijekova za liječenje Alzheimerove bolesti i tumora te su pokazali zadovoljavajuće rezultate. Nove molekule stilbena koje su nedavno izolirane i otkrivene, pokazuju različite bioaktivnosti, uključujući antioksidativnu, antimikrobnu, citotoksičnu, hepatoprotektivnu, aktivnost protiv malarije te protuupalna svojstva i na temelju toga se smatra da bi mogli biti potencijalni kandidati za razvoj lijekova (Shen i sur., 2009). Najveći prehrambeni izvori stilbena su grožđe, vino, soja i proizvodi od kikirikija (Crozier i sur., 2006).

### 2.3.1. Struktura i fizikalno – kemijska svojstva stilbena

Osnovu strukture stilbena čini jedinica 1,2-difeniletlena. Stilbeni se mogu podijeliti u dvije kategorije: na monomerne i oligomerne stilbene koji se međusobno razlikuju s obzirom na prisutnost različitih jedinica, stupanj polimerizacije i strukturu oligomera. Oligomerni stilbeni se međusobno razlikuju s obzirom na „kostur“, kompleksnost konformacije i stupanj oligomerizacije te nastaju sparivanjem, odnosno povezivanjem homogenih i heterogenih monomernih stilbena pa se mogu podijeliti u nekoliko skupina. Postoji nekoliko prijedloga za njihovu podjelu, a jedan od njih je predložio Sotheeswaran 1993. godine i to na dvije grupe, grupu A i grupu B. S obzirom da je ova podjela ograničena samo na oligomere resveratrola, Lin i sur. (2001) su predložili da se oligomerni stilbeni prvo podjele u pet skupina na osnovu građevnih jedinica, a onda da se svaka skupina podijeli u dvije podskupine prema shemi koju je predložio Sotheeswaran. Kako se otkriva sve više novih oligomera, tako se u podjelu uvrštavaju nove skupine pa je klasifikacija koju su predložili Lin i suradnici proširena za još

jednu skupinu, a to su oligomeri na osnovi resveratrola (izorhapontigenin, piceatanol, oksiresveratrol, resveratrol i oksiresveratrol (spareni heterogeni) i miscelarni (različiti) oligomeri) (Shen i sur., 2009).

Stilbeni postoje u obliku *cis*- i *trans*- izomera (Slika 2). *Cis*-izomer je manje stabilan od *trans*-izomera zbog steričkih smetnji između aromatskih prstenova (Chong i sur., 2009). Točka taljenja *trans*-stilbena se kreće oko 125 °C, dok se točka taljenja *cis*-stilbena kreće oko 6°C. Stilbeni su relativno nereaktivni, nebojeni spojevi, gotovo netopljivi u vodi. Posjeduju svojstva apsorpcije i fluorescencije. U širokoj su primjeni u proizvodnji industrijskih boja, lasera za bojanje, optičkih osvjetljivača, fosfora i drugih materijala te imaju vrlo važnu ulogu u fotofizikalnim, fotokemijskim, biofizikalnim i biomedicinskim istraživanjima. Derivati stilbena se sintetiziraju relativno lako i obično su kemijski stabilni i termostabilni. Zbog kemijske stabilnosti fenilne skupine 1,2-difeniletilena, stilbeni nisu odgovarajuća skupina spojeva za početak sinteze derivata stilbena. Da bi formirali kompleksnije molekule, potrebno je sintetizirati stilbene koji će imati više reaktivnih funkcionalnih skupina (Likhtenshtein, 2009).



**Slika 2.** Strukturna formula *trans*- i *cis*-stilbena (Likhtenshtein, 2009)

Monomeri i oligomeri resveratrola su osim u egzokarpu i perikarpu bobica grožđa, pronađeni i u odrvenjelim organima vinove loze kao što su stabljika i korijenje. Zdravo korijenje vinove loze sadrži visoki sadržaj oligostilbena te tetrameri resveratrola predstavljaju glavne fenolne spojeve u korijenju vinove loze (Chong i sur., 2009). Prirodni stilbeni su skupina važnih polifenola s dvije osnovne karakteristike; imaju snažna antioksidacijska svojstva i lako se polimeriziraju pri čemu formiraju oligomere. Između 1995. i 2008. godine otkriveno je 125 novih monomernih i 275 novih oligomernih stilbena. Bitno je naglasiti da je njihova distribucija ograničena i svodi se na svega nekoliko biljnih obitelji i rodova. Pronađeni su u samo 30 obitelji biljaka (Shen i sur., 2009). Veliki broj prirodnih stilbena su oligomeri, što uključuje dimere, trimere i tetramere, koji proizlaze iz spajanja resveratrola ili derivata resveratrola. Za oligomere resveratrola se koristi termin viniferin. Viniferini se

akumuliraju u listovima vinove loze uslijed gljivične infekcije ili djelovanja UV zračenja (Chong i sur., 2009).

### 2.3.2. Biosinteza stilbena

Biljni stilbeni uglavnom nastaju u fenilpropanoidnom putu. Sve više biljke imaju sposobnost sintetizirati malonil-CoA i CoA-estere derivata cimetine kiseline, ali samo neke biljke imaju sposobnost sinteze stilbena. Stilben sintaza katalizira sintezu stilbena u jednoj reakciji iz tri malonil-CoA i jednog CoA-estera derivata cimetine kiseline (Chong i sur., 2009). *Trans*-resveratrol se sintetizira kondenzacijom *p*-kumaroil-CoA s tri jedinice malonil-CoA, od kojih svaka donira dva atoma ugljika, u reakciji koju katalizira stilben sintaza koju aktiviraju različiti stresni uvjeti kao što su UV zračenje, trauma i infekcija (Crozier i sur., 2006).

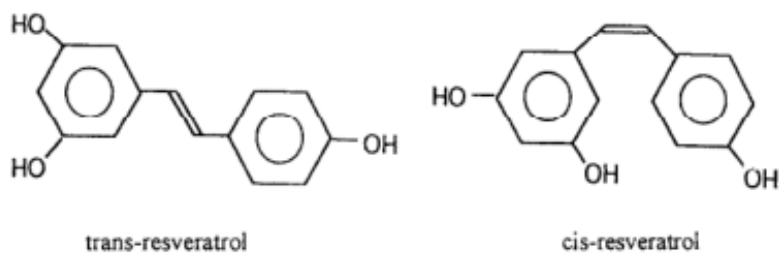
### 2.3.3. Resveratrol

Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben) je polifenolni spoj koji se ubraja u razred stilbena. 1976. godine su Langcake i Pryce prvi put detektirali resveratrol u vinovoj lozi (*Vitis vinifera*) koji je sintetiziran od strane tkiva na listovima kao odgovor na gljivičnu infekciju (*Botrytis cinerea*) ili izloženost UV svjetlu, a 1992. godine Siemann i Creasy su dokazali prisutnost resveratrola u vinu za koji su tvrdili da je potencijalni biološki aktivni sastojak crvenog vina (Fremont, 1999). Prvi put je izoliran iz *Veratrum grandiflorum* O. Loes, a pronađen je u japanskoj Itadori biljci *Polygonum cuspidatum* syn. *Fallopia japonica* (Donnez i sur., 2009) u kojoj su *trans*-resveratrol i njegovi glukozidi pronađeni u visokim količinama (Burns i sur. 2002), a raširena je na području Europe i Sjeverne Amerike (Crozier i sur., 2006). U nativnoj Aziji, korijenje Itadori biljke se suši i koristi u proizvodnji čaja. Itadori na japanskom znači „blagostanje“ i stoljećima se koristila u Japanu i Kini kao prirodni lijek za brojne bolesti, uključujući srčane bolesti (Kimura i sur., 1985). Vjeruje se da su aktivni sastojci *trans*-resveratrol i njegovi glukozidi te da pridonose kardioprotektivnom učinku crvenog vina, s obzirom da je dokazano da *trans*-resveratrol može inhibirati oksidaciju LDL-a, odnosno početni korak u patogenezi ateroskleroze (Crozier i sur., 2006).

Resveratrol je pronađen u drveću, nekoliko cvjetajućih biljaka, kikirikiju i vinovoj lozi. Glavni prehrambeni izvori su grožđe, crveno vino, kikiriki i proizvodi od kikirikija (Wenzel i Somoza, 2005). Resveratrol je fitoaleksin koji se u visokim koncentracijama nalazi u kožici

grožđa te u umjerenim koncentracijama u kikirikiju i različitom bobičastom voću. Koncentracije *trans*-resveratrola se u grožđu, kikirikiju i crvenom vinu kreću redom od 50-100 mg g<sup>-1</sup>, 0,02-1,79 mg g<sup>-1</sup> i 13,4 mg L<sup>-1</sup> (Kimura i sur., 2008). Koncentracija resveratrola u vinima ovisi o kultivaru grožđa, geografskom podrijetlu, tipu vina, infekciji uzrokovanom gljivicom *Botrytis* i enološkim praksama (Fremont, 1999). Danas se *trans*-resveratrol različitih stupnjeva čistoće uglavnom proizvodi iz biljke *Polygonum cuspidatum* (*F. japonica*), i to iz ekstrakta korijena, a glavni proizvođač je Kina. U širokoj je primjeni u proizvodnji kozmetike, a vinova loza je odgovarajući sirovi materijal kao izvor *trans*-resveratrola i njegovih derivata za proizvode poput krema za lice. Upotreba biotehnologije u proizvodnji *trans*-resveratrola ima važnu ulogu zbog upotrebe mikroorganizama ili biljaka, što snižava troškove i omogućava brzu proizvodnju biološki aktivnih molekula u velikim količinama (Donnez i sur., 2009).

Resveratrol postoji u obliku *cis*- i *trans*- izomera (Slika 3). *Trans*-izomeri su zastupljeniji od *cis*-izomera te u vinu, kao jednom od glavnih prehrambenih izvora resveratrola, prevladava *trans*-izomer, dok *cis*-izomeri nisu detektirani u vinovoj lozi, odnosno u ekstraktu grožđa. *Cis*-i *trans*-izomeri resveratrola se uglavnom akumuliraju u egzokarpu (kožici) tijekom svih stadija razvoja i gotovo ih nema u perikarpu. Ta akumulacija u egzokarpu je prisutna zbog imunolokalizacije enzima stilben sintaze koji je pronađen u egzokarpu bobica tijekom razvoja (Chong i sur., 2009). *Cis*-izomeri su dosta nestabilni zbog steričkih smetnji i mogu nastati pod utjecajem UV zračenja, dok su *trans*-izomeri stabilni kroz nekoliko mjeseci, osim kod pufera visokog pH, ako je u potpunosti zaštićen od svjetla (Fremont, 1999). *Trans*-resveratrol se povezuje s takozvanim „francuskim paradoksom“ zato što se pokazalo da dnevna konzumacija resveratrola, u obliku crvenog vina, ima pozitivne učinke na ljudsko zdravlje te da štiti od koronarnih bolesti. Ulazi u interakcije s lipoproteinima plazme i sprječava oksidaciju LDL-a. Kardioprotektivni učinak resveratrola uključuje inhibiciju agregacije trombocita i supresiju proizvodnje reaktivnih spojeva kisika (ROS) (Kimura i sur., 2008). Osim crvenog vina, postoje i druge vrste hrane koji su dobri izvori *trans*-resveratrola, poput Itadori čaja, kikirikija i proizvoda od kikirikija te čokolada (Donnez i sur., 2009).



**Slika 3.** Strukturna formula *trans*- i *cis*-resveratrola (Fremont, 1999)

Različita *in vitro* istraživanja su pokazala različite potencijalne biološke učinke resveratrola, kao što su antioksidativni, protuupalni, estrogeni, antikancerogeni, kemoprotektivni (Wenzel i Somoza, 2005), pozitivni učinci na kardiovaskularni sustav, neuroprotektivni učinci i učinak protiv starenja (Kimura i sur., 2008). Pokazalo se da se 75% polifenola iz organizma izlučuje putem urina i fecesa. Oralna biodostupnost resveratrola je približna nuli zbog brzog i opsežnog metabolizma i posljedičnih formacija različitih metabolita u obliku glukuronida i sulfata (Wenzel i Somoza, 2005). Čak su i neke biljke genetski modificirane kako bi mogle proizvesti *trans*-resveratrol u svrhu procjene njegove potencijalne uloge u promociji zdravlja i kontrole biljnih bolesti kao, na primjer, duhan i rajčica. Istraživanja su pokazala da *trans*-resveratrol ima i antioksidacijsku aktivnost te da iz tog razloga ima važnu ulogu u prevenciji kardiovaskularnih bolesti i zaštiti od određenih vrsta raka, kao i u sprječavanju dijabetesa i neurodegenerativnih bolesti (Donnez i sur., 2009). U ljudskom organizmu se resveratrol, bilo u obliku aglikona ili glikozidne forme, jako brzo apsorbira nakon oralne konzumacije. U različitim organizmima, uključujući i ljudski, resveratrol se dobro apsorbira, raspodjeljuje u različitim organima i metabolizira do glukuronid i sulfat konjugata. Istraživanja provedena na glodavcima su pokazala da je jetra jedno od ključnih mjesta akumulacije resveratrola i njegovih metabolita što je vrlo vjerojatno posljedica metabolizma resveratrola u tankom crijevu i nakon toga apsorpcije i metabolizma u samoj jetri (Wenzel i Somoza, 2005).

Istraživanja provedena na štakorima su pokazala nisku koncentraciju resveratrola u bubrezima nakon nekog vremenskog perioda što ukazuje na to da je bubrežno izlučivanje jedan od glavnih puteva eliminacije tog stilbena čime je povećana koncentracija resveratrola, glukuronida i sulfata u urinu, kako kod štakora, tako i kod čovjeka (Wenzel i Somoza, 2005).

Istraživanja su pokazala da ovisno o dozi, resveratrol može inhibirati rast kanceroznih stanica, a taj antiproliferativni učinak se pripisuje sposobnosti zaustavljanja stanične diobe u S-fazi staničnog ciklusa i izazivanju apoptoze. Zbog strukturne sličnosti s estrogenom,

resveratrol pokazuje i estrogenu učinak te se smatra fitoestrogenom, na što treba posebno obratiti pozornost kod terapije i prevencije raka dojke (Joe i sur., 2002) jer se može vezati i na  $\alpha$  i na  $\beta$  estrogen receptore te aktivirati estrogen receptor-ovisnu transkripciju u ljudskim kanceroznim stanicama dojke (Athar i sur., 2007). Izaziva apoptozu u kanceroznim stanicama dojke i kože te u staničnim linijama leukemije. Ovisno o dozi, resveratrol inhibira staničnu proliferaciju, zaustavlja stanični ciklus i izaziva apoptozu. Zbog svoje polifenolne prirode, resveratrol se može akumulirati u tumorskom tkivu u koncentracijama koje nadmašuju njegovu koncentraciju u serumu. U istraživanjima farmakokinetike resveratrola pokazalo se da se 50-75% primjenjene doze apsorbira nakon oralne primjene. Visoko je topljiv u mastima pa su neki autori utvrdili da se skladišti u adipoznom i drugim tkivima s visokim sadržajem masti (Joe i sur., 2002).

Što se tiče biodostupnosti resveratrola, nije široko rasprostranjen u biljnom svijetu. Prisutan je u nekoliko vrsta voća i povrća koji su namijenjeni prehrani ljudi. Jedan od najbogatijih izvora je, već spomenuti, *Polygonum cuspidatum*, ekstrakt korijenja koji je imao vrlo važnu ulogu u japanskoj i kineskoj narodnoj medicini. Također, prisutan je u nekoliko vrsta drveća, kao što su eukaliptus, tropsko listopadno drvo *Bauhinia racemosa* te nekim vrstama cvjetajućih biljaka kao što su dvije vrste ljubičice – *Veratrum grandiflorum* i *Veratrum formosanum*, koje imaju sposobnost sinteze ovog spoja. Visoka koncentracija resveratrola je prisutna u listovima kad je biljka oštećena djelovanjem nekih kemijskih sredstava. Kotiledoni kikirikija (*Arachis hypogaea*) sintetiziraju mnoštvo fitoaleksina stilbena, uključujući i resveratrol, u visokim koncentracijama kao odgovor na infekciju, ozljedu i zračenje ultraljubičastim (ali ne i vidljivim) svjetlom (Soleas i sur., 1997). Apsorpcija i metabolizam resveratrola su naizgled slični onima kao i drugih polifenola, kao što su to kvercetin i katehin, iako brojni faktori mogu utjecati na farmakokinetiku svakog od njih (Smoliga i sur., 2011).

#### **2.4. POLIKLORIRANI BIFENILI (PCB-i)**

Poliklorirani bifenili (PCB-i) su sintetski, klorirani ugljikovodični spojevi koji se sastoje od dva povezana benzenska prstena u kojima su pojedini ili svi vodikovi atomi supstituirani atomima klora (WHO, 2003). Pripadaju velikoj skupini sintetskih organoklornih spojeva koji se međusobno razlikuju u fizikalno–kemijskim i toksikološkim svojstvima te imaju tendenciju bioakumulacije i biomagnifikacije u okolišu i unutar hranidbenih lanaca. Uslijed toga, ljudi

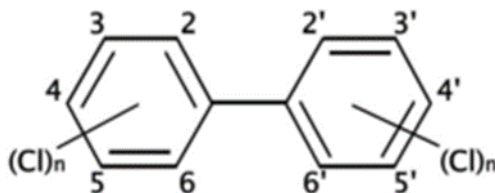
moгу biti izloženi PCB-ima preko kontaminirane vode i hrane (riba, meso i mliječni proizvodi) (Kmetič i sur., 2012). PCB-i se proizvode od 1929. godine, a prodavali su se kao smjese pod različitim imenima, uključujući *Arochlor*, *Pyranol*, *Pyrochlor* (SAD), *Phenochlor*, *Pyralene* (Francuska), *Clopehn*, *Elaol* (Njemačka), *Kanechlor*, *Santotherm* (Japan), *Fenchlor*, *Apirolio* (Italija) i *Sovol* (WHO, 2003). Koriste se u proizvodnji plastifikatora, površinskih premaza, boja, ljepila, usporivača plamena, punila za pesticide i kod mikrokapsuliranja boja. Zbog rezistencije koju pokazuju prema kiselinama i lužinama te relativne stabilnosti na visokim temperaturama, PCB-i se koriste u dielektričnim tekućinama u transformatorima i kondenzatorima. Do zagađenja okoliša dolazi dodatno zbog odlaganja stare električne opreme koja sadrži poliklorirane bifenile. Pirolizom smjesa polikloriranih bifenila nastaju klorovodik i poliklorirani dibenzofurani (eng. *polychlorinated dibenzofurans*, PCDF), a pirolizom smjesa koje sadrže klorobenzene nastaju poliklorirani dibenzodioxini (eng. *polychlorinated dibenzodioxins*, PCDD). Mnoge države su strogo ograničile ili zabranile proizvodnju PCB-a (WHO, 2003). Dosadašnja znanstvena istraživanja ukazuju na različite negativne učinke PCB-a na ljudsko zdravlje. Dokazano je da PCB-i mogu poremetiti endokrinu homeostazu organizma i izazvati reprodukciju toksičnost te da djeluju imunotoksično, neurotoksično i genotoksično. Stupanj toksičnosti pojedinog PCB kongenera uvelike ovisi o položaju i broju supstituiranih atoma klora, pri čemu se planarni PCB-i koji u *ortho*- položaju ne sadrže atome klora (ili sadrže svega jedan atom klora) smatraju toksičnijima. Strukturna sličnost između planarnih kongenera i dioksina objašnjava njihov mehanizam djelovanja posredovan aril ugljikovodičnim receptorom (eng. *aryl hydrocarbon receptor*, AhR), dok su neplanarni PCB-i slabi antagonisti AhR-a (Kmetič i sur., 2012).

PCB-i se jako brzo apsorbiraju u gastrointestinalnom traktu te distribuiraju i akumuliraju u jetri i adipoznom tkivu. Lako prolaze kroz placentu (posteljicu), izlučuju se u mlijeko i akumuliraju u fetusu/dojenčetu. PCB-i se metaboliziraju reakcijama hidrosilacije i potom reakcijama konjugacije. Stope metabolizma i posljedično ekskrecije (izlučivanja) se razlikuju između različitih kongenera. Ljudi mogu biti izloženi PCB-ima udisanjem kontaminiranog zraka i konzumacijom kontaminirane vode i hrane. Istraživanja provedena na ljudima izloženima PCB-ima su pokazala učinke na pokretljivost spermija, stopu fetalnog rasta (niža porođajna masa, manji opseg glave) i razvoj (kraća gestacijska dob, neuromuskularna nezrelost) te neurološke funkcije potomka (poremećaj autonomne funkcije, povećan broj abnormalno slabih refleksa, smanjen kapacitet pamćenja, niži IQ i nedostatak pažnje). Neki neurološki nedostaci u mlađoj dobi mogu nestati kasnije u djetinjstvu (WHO, 2003).



#### 2.4.1. Struktura i fizikalno – kemijska svojstva PCB-a

Poliklorirani bifenili (PCB-i) su kemijski spojevi s dva međusobno povezana benzenska prstena u kojima atomi klora zamjenjuju pojedine ili sve vodikove atome (Slika 4) (WHO, 2003). Kemijska formula PCB-a glasi  $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ , gdje  $n$  predstavlja broj atoma klora (ATSDR, 2000). Supstituirani atomi klora u molekuli PCB-a se mogu nalaziti u tri položaja: *ortho*- (2, 2', 6, 6'), *meta*- (3, 3', 5, 5') i *para*- (4, 4') položaju te je, s obzirom na stupanj kloriranja na mogućih deset različitih položaja bifenilnih prstena, moguće razlikovati 209 PCB kongenera, od kojih je 135 detektirano u okolišu (Sánchez-Alonso i sur., 2003). Benzenski prstenovi mogu se rotirati oko veze koja ih povezuje pri čemu se formiraju različite konfiguracije. S obzirom na položaj benzenskih prstenova u ravnini, konfiguracija može biti planarna (kada se dva benzenska prstena nalaze u istoj ravnini) i neplanarna (u kojoj se benzenski prstenovi nalaze pod kutem od  $90^\circ$ ) (IARC, 2016). Stupanj planarnosti ovisi o broju supstituiranih atoma klora u *ortho*- položaju. Supstitucija atoma vodika s većim atomima klora u *ortho*-položaju uzrokuje steričke smetnje koje otežavaju rotaciju benzenskih prstenova i dovode do gubitka planarne konfiguracije i svojstava sličnih dioksinu (Sánchez-Alonso i sur., 2003).



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

Čisti kongeneri PCB-a bez primjesa su bezbojni i često u kristalnom obliku. Komercijalne mješavine PCB-a imaju konzistenciju ulja ili smole te najčešće ne kristaliziraju, čak ni na nižim temperaturama (WHO, 2000). Jedino *ortho*-supstituirani kongeneri mogu biti polarne molekule sa sposobnošću formiranja vodikovih veza što ih onda čini više topljivima u vodi (WHO, 2003). Činjenica je da su PCB kongeneri hidrofobni, imaju ograničenu topljivost u vodi i može se očekivati da komponente seruma, kao što su proteini i lipidi, imaju značajan utjecaj na biodostupnost PCB-a za unos u stanicu (Sánchez-Alonso i sur., 2003). *Meta*- i *para*- kongeneri su češće ne-planarni i više topljivi u lipidima. Planarni kongeneri se smatraju najtoksičnijima s obzirom na njihove učinke na zdravlje (WHO, 2003).

Vrlo važno svojstvo PCB-a je njihova inertnost. Odolijevaju kiselinama i lužinama te su termostabilni, što ih čini korisnima za različite primjene, uključujući dielektrične tekućine u transformatorima i kondenzatorima, tekućinama za prijenos topline i lubrikantima (Oliver i sur., 1989). Na visokim temperaturama su zapaljivi i produkti koji posljedično nastaju mogu biti štetniji za okoliš nego ishodni spojevi. Formiraju pare koje su teže od zraka, ali nisu eksplozivne. Imaju nisku električnu vodljivost, visoku toplinsku provodljivost i visoku otpornost prema toplinskoj razgradnji. Kao i mnogi organoklorni spojevi, različiti kongeneri su visoko postojani te se koncentriraju u hranidbenom lancu (WHO, 2000). Produkti izgaranja uključuju klorovodik i PCDF (WHO, 2003).

#### 2.4.2. Toksikokinetika i izloženost PCB-ima

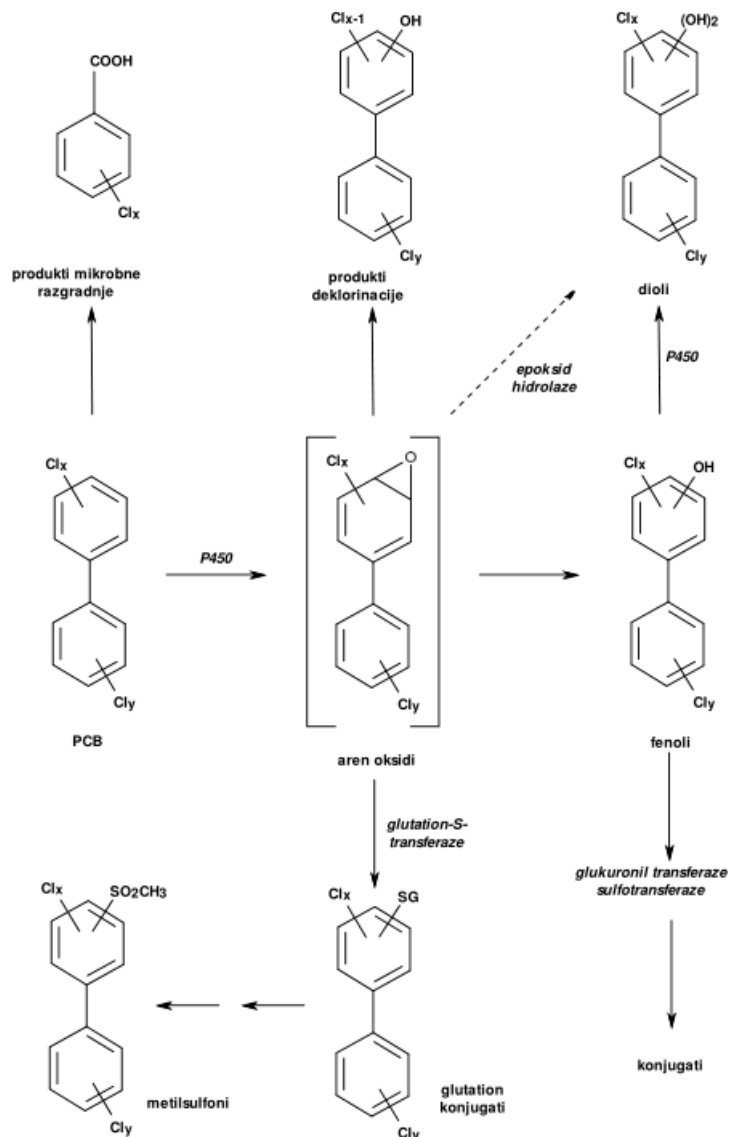
S obzirom da su PCB-i lipofilni spojevi i imaju visoki afinitet za masti, prvenstveno se akumuliraju u adipoznom tkivu i u tkivima bogatim mastima, iako su detektirani i u nekim drugim tkivima. Većina istraživanja na eksperimentalnim životinjama je pokazala da su inicijalna mjesta akumulacije PCB-a jetra i mišići, što je vrlo vjerojatno posljedica visoke prokrvljenosti jetre i relativno velikog volumena mišićnog tkiva (US EPA, 1990). Također, postoje istraživanja provedena na miševima i štakorima koja su pokazala da se određeni PCB kongeneri zadržavaju u pojedinim organima, kao što su to pluća i slezena (IARC, 2016). Kongeneri s većim stupnjem klorinacije se uglavnom preraspodijeljuju u masno tkivo i kožu, dok PCB-i bez supstituiranog klora na *ortho*-položaju pokazuju viši afinitet za jetru nego za masno tkivo u usporedbi s PCB kongenerima koji imaju atom klora u *ortho*-položaju (Yoshimura i sur., 1985; Van Birgelen i sur., 1994a; Van Birgelen i sur., 1994b).

Zahvaljujući svojoj strukturi i fizikalno-kemijskim svojstvima, PCB-i mogu prolaziti kroz stanične membrane, posteljicu (placentu), krvno-moždanu barijeru te se apsorbirati udisanjem, oralnim i dermalnim putem (Arnold i Feeley, 2003; WHO, 2003; IARC, 2016). Neka istraživanja su pokazala da se 50 – 100% količine unesene oralnim putem apsorbira u gastrointestinalnom traktu. Eksperimentalne studije na životinjama su pokazale da je apsorpcija PCB-a veća udisanjem nego prilikom unosa putem hrane, dok se od 20 – 40% PCB-a apsorbira putem kože (IARC, 2016). Čovjek je PCB-ima najviše izložen putem kontaminirane hrane koju konzumira u svakodnevnoj prehrani, a posebno putem masne hrane životinjskog podrijetla (meso, određene vrste ribe i mliječni proizvodi) zbog lipofilnosti PCB-a i visokog afiniteta za masti i masna tkiva. Procjenjuje se da odrasle osobe putem hrane u

prosijeku dnevno unesu od 10 – 45 ng kg<sup>-1</sup> tjelesne mase neplanarnih PCB-a (EFSA, 2005), odnosno da odrasle osobe u zapadnim zemljama putem hrane u prosjeku dnevno unesu oko 50 ng kg<sup>-1</sup> tjelesne mase ukupnih PCB-a (WHO, 2003). Dostupni podaci o izloženosti djece u dobi do šest godina su ograničeni i ne uključuju unos dojenjem, ali se procjenjuje da je prosječan dnevni unos *ortho*-PCB-a djece u toj dobi 27-50 ng kg<sup>-1</sup> tjelesne mase (EFSA, 2005).

#### 2.4.3. Metabolizam PCB-a

Glavni put eliminacije PCB-a iz tijela je metabolizam koji se prvenstveno odvija djelovanjem enzima citokrom P-450 monooksigenaznog sustava u jetri i ovisi o kloriranoj strukturi kongenera (Slika 5). Stupanj i brzina biotransformacije određenog PCB kongenera ovisi o mjestu klorinacije, broju supstituenata klora, vrsti, dobi, ponekad i o spolu životinje i, u nekim slučajevima, o duljini izloženosti (ekspoziciji) (je li ona kontinuirana ili se jednom dogodila) (Matthews i Dedrick, 1984). Generalno, kongeneri s više od četiri supstituenta klora se sporije metaboliziraju od onih koji sadrže četiri ili manje (IARC, 2016). PCB-i se metaboliziraju reakcijama hidroksilacije i konjugacije. Hidroksilacija se primarno odvija na *para*- ili *meta*-položaju ukoliko ta mjesta nisu supstituirana te se nastali hidroksilirani produkti mogu naknadno konjugirati s aktiviranom glukuronskom kiselinom ili sulfatom. Oksidacijom nekih PCB-a kao međuprodukti mogu nastati arenoksidi, reaktivni spojevi koji se mogu bilo spontano ili enzimatskim putem pregraditi u produkte koji se mogu ili izlučiti iz organizma (fenoli, dihidrodioni, konjugati glutaciona) ili mogu formirati potencijalno toksične (citotoksične, mutagene, karcinogene) makromolekularne spojeve. Među metaboličkim produktima su također identificirani i parcijalno deklorirani metaboliti te metaboliti koji sadrže sumpor (Kato i sur., 2000; LUBW, 1995). Izlučivanje kongenera najviše ovisi o brzini njihova metabolizma i nastanku polarnijih spojeva. Metaboliti većine do sada ispitanih kongenera se primarno eliminiraju putem žuči i fecesa, iako neki kongeneri s nižim stupnjem kloriranja se u većoj mjeri izlučuju putem urina u odnosu na one kongenere s višim stupnjem kloriranja (US EPA, 1990).

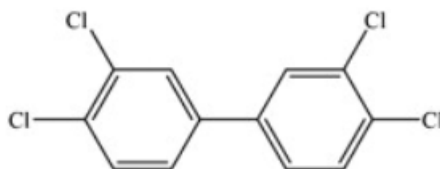


**Slika 5.** Reakcije biotransformacija PCB-a (LUBW, 1995)

#### 2.4.4. PCB 77 (3,3',4,4'-tetraklorbifenil)

PCB 77 je *non-ortho*-kongener planarne konfiguracije. Njegova strukturna formula prikazana je na Slici 6, a molekularna formula je C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>4</sub>. Na oba benzenska prstena, na položajima 3 i 4 vodikovi atomi su zamijenjeni atomima klora (RSC, 2019a). PCB 77 je planarni kongener koji se veže na Ah receptor s visokim afinitetom. Nakon vezanja ksenobiotika, Ah receptor se premješta u jezgru gdje aktivira transkripciju odgovarajućih gena. Planarni kongeneri mogu potaknuti apoptozu mehanizmom ovisnim o aktivaciji Ah receptora. Postoje znanstveni radovi koji potvrđuju aktivaciju apoptotskog puta odumiranja stanica nakon izloženosti planarnim PCB-ima, no postoje i radovi kod kojih je pokazano

suprotno. Ovi kontradiktorni rezultati mogu biti posljedica korištenja različitih tkiva/kultura stanica u istraživanjima. PCB 77 inicira apoptozu u endotelnim stanicama krvnih žila, tubularnim stanicama korteksa bubrega i neuralnim staničnim kulturama, ali ne potiče apoptozu u monocitima (Sánchez-Alonso i sur., 2003). PCB 77 je prepoznat i kao endokrino modulirajuća tvar koja povećava rizik za poremećaje reproduktivnog sustava i poremećaje u razvoju (Murati i sur., 2015).

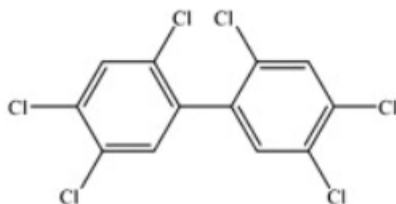


**Slika 6.** Strukturna formula PCB-a 77 (Al-Salman i Plant, 2012)

#### 2.4.5. PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-heksaklorbifenil)

PCB 153 je kongener neplanarne konfiguracije. Njegova strukturna formula je prikazana na Slici 7, a molekularna formula je  $C_{12}H_4Cl_6$  (RSC, 2019b). Iz njegove strukture je vidljivo da su na položajima 2, 4 i 5 na oba benzenska prstena vodikovi atomi zamijenjeni atomima klora. PCB 153 je ne-dioksinu sličan PCB kongener za kojeg je poznato da djeluje kao promotor tumora jetre glodavaca (Buchmann i sur., 1986). Mnogi učinci ne-dioksinu sličnih PCB-a, kao što je PCB 153, pretpostavlja se da su posredovani aktivacijom nuklearnog receptora CAR (eng. *Constitutive Androstane Receptor*) (Waxman, 1999; Sanders i sur., 2005.). Aktivacija CAR-a može biti uključena u promociju tumora djelovanjem PCB 153 i ostalih ne-dioksinu sličnih PCB kongenera. Za razliku od ne-dioksinu sličnih PCB-a, dioksinu slični PCB-i prvenstveno djeluju vezanjem na AhR, slično dioksinima i furanima, i stoga aktiviraju različiti set staničnih odgovora. Nedavne studije su pokazale da smjese PCB-a mogu pokazati dodatne, sinergističke ili čak antagonističke učinke na razvoj tumora u usporedbi s individualnim kongenerima. Na primjer, PCB 153 je pokazao aditivni ili sinergistički učinak u kombinaciji s PCB-em 126 (Bager i sur., 1995), dok su druge studije pokazale antagonistički učinak te kombinacije (Haag- Grönlund i sur., 1998; Dean i sur., 2002;) i PCB-a 153 u kombinaciji s PCB-em 77 (Berberian i sur., 1995; Tharappel i sur., 2002). Jedna studija je pokazala da je, pri tretmanu jetrenih stanica štakora kombinacijom PCB-a 77 i PCB-a 153, PCB 77 povećao postotak stanica u apoptozi, dok je PCB 153 smanjio

postotak apoptotičkih stanica za 50% (Tharappel i sur., 2002). Druga studija je provedena na štakorima koji su bili na prehrani s niskim ili visokim koncentracijama vitamina A, odnosno retinoil palmitata. Do smanjenja koncentracije retinoil estera u jetri pri tretmanu s PCB-em 77 je došlo kod štakora koji su bili i na prehrani siromašnoj i na prehrani bogatoj vitaminom A. S druge strane, tretman s PCB-em 153 rezultirao je smanjenjem koncentracije retinoil estera samo kod štakora koji su bili na prehrani siromašnoj vitaminom A (Berberian i sur., 1995).



**Slika 7.** Strukturna formula PCB-a 153 (Al-Salman i Plant, 2012)

## 2.5. STANIČNA SMRT

Stanica bi se trebala smatrati mrtvom kad se zadovolji bilo koji od sljedećih molekularnih ili morfoloških kriterija: 1) stanica je izgubila integritet svoje plazma membrane, što je definirano ugradnjom vitalnih boja *in vitro*, 2) stanica, uključujući i njezinu jezgru, je doživjela potpunu fragmentaciju u zasebna tijela („apoptotička tjelešca“) i/ili 3) „apoptotičko tjelešce“ ili njegovi fragmenti su zahvaćeni susjednom stanicom *in vivo* (Kroemer i sur., 2009). Stanična smrt je visoko organizirana, a regulacija je jednako kompleksna kao i u stanične diobe i/ili diferencijacije (Danial i Hockenbery, 2018). U fiziološkom kontekstu embrionalnog razvoja i obnove tkiva, ili kao patološkog odgovora na ozljedu stanice i infekciju patogenima, različite vrste stanične smrti imaju brojne svrhe koje imaju pozitivne učinke na organizam. To uključuje održavanje funkcije epitelnog tkiva, uništavanje mikroba, izazivanje imunološkog odgovora, obnavljanje, odnosno „recikliranje“ bioloških makromolekula, unutarstaničnu signalizaciju i očuvanje genomske integriteta. Većina oblika stanične smrti kod sisavaca ima morfološke i biokemijske značajke apoptoze, programirane stanične smrti kodirane u genetičkom materijalu svih stanica (Danial i Hockenbery, 2018). Nekroza, alternativni mehanizam stanične smrti, događa se kao posljedica ekstremne stanične ozljede (djelovanje toksina i toksikanata, mehaničke traume, topline ili infekcije) i može se

smatrati narušavanjem stanične homeostaze (Danial i Hockenbery, 2018; Niemann i Rohrbach, 2016). Stanična smrt je usko povezana s ostalim esencijalnim staničnim putovima (Danial i Hockenbery, 2018).

### 2.5.1. Apoptoza

Termin apoptoza dolazi od grčke riječi *ἀπόπτωσης*, čiji se prefiks „apo“ (*ἀπό*) može prevesti kao „razdvajanje“ (Navarro-Beltran, 1999), a sufiks „ptosis“ (*πτωσις*) kao „otpadanje“ (Gerschenson i Rotello, 1992; Barlow, 2000). U neuroznanosti, odnosi se na promjene koje, između ostalog, uključuju i oslobađanje malih tijela (Ferrari i sur., 1998; Fröhlich i Madeo, 2000; Mattson, 2000; Oppenheim i von Bartheld, 2008), nastalih kao rezultat fragmentacije stanice koja umire (Kandel i sur., 2001). Termin apoptoza (*a-po-toe-sis*) je prvi put korišten u radu Kerr, Wyllie i Currie 1972. godine kako bi se opisali različiti morfološki tipovi staničnih smrti, iako su određene komponente apoptoze eksplicitno opisane mnogo godina prije (Kerr i sur., 1972; Paweletz, 2001; Kerr, 2002). Apoptoza ili programirana smrt stanice je kompliciran proces. Okarakterizirana je kao osnovna aktivnost stanice koja se događa u različitim fiziološkim i patološkim stanjima. Aktivnost velikog broja gena je uključena u aktivaciju samo-uništenja. Višestanični organizmi često se moraju „riješiti“ stanica koje su višak ili predstavljaju potencijalnu opasnost. Regulirana ili programirana smrt stanice omogućava organizmu da kontrolira broj stanica i veličinu tkiva te da se štiti od „loših“ stanica koje predstavljaju prijetnju homeostazi (Hengartner, 2000).

Proces programirane smrti stanice, ili apoptoza, generalno je okarakterizirana posebnim morfološkim karakteristikama i o energiji ovisnim biokemijskim mehanizmima. Apoptoza rezultira raspadom na apoptotička tjelešca koja prepoznaju i fagocitiraju fagociti te se ne pokreće upalni odgovor, već on ovisi o aktivaciji obitelji cistein proteaza, takozvanih kapaza. Kapaze su visoko konzervirane tijekom evolucije i mogu se pronaći u različitim živim organizmima, od čovjeka pa do insekata, nematoda i hidra (Hengartner, 2000). Apoptotičke kapaze se mogu podijeliti na inicijatore (pokretače) apoptoze (kapaza -2, -8, -9, -10) i njene izvršitelje (egzekutore) (kapaza -3, -6, -7). Apoptoza se može odvijati dvama različitim biokemijskim putevima: unutarnji (intrinzični) ili vanjski, sporedni (ekstrinzični), koji rezultira aktivacijom specifičnih kapaza (Niemann i Rohrbach, 2016). Glavna uloga apoptoze je protektivni učinak, odnosno mehanizam protiv neoplastičnog razvoja u organizmima eliminacijom genetički oštećenih stanica ili viška stanica koje se nepravilno dijele mitotičkom

diobom. *In vitro* i *in vivo* istraživanja su pokazala da zaustavljanje apoptoze dovodi do promocije tumora djelovanjem različitih agensa (Huang i sur., 1999). Apoptoza se smatra vitalnim fiziološkim procesom važnim za kontrolu proliferacije stanica, pravilnog razvoja i funkcioniranje imunološkog sustava, hormon ovisne atrofije, embrionalnog razvoja i kemijskim tvarima potaknutu staničnu smrt. Nepravilna apoptoza je faktor brojnih ljudskih patoloških stanja poput neurodegenerativnih bolesti, ishemijskih oštećenja, autoimunih poremećaja i različitih vrsta raka (Elmore, 2007).

### 2.5.2. Nekroza

Termin nekroza dolazi od grčke riječi *necros*, što znači smrt, a odnosi se na smrt stanice izložene ekstremnim vanjskim (okolišnim) ili genetskim utjecajima (Walker i sur., 1988). Nekroza se dugo smatrala neprogramiranim oblikom staničnom smrti koja ne ovisi o visoko reguliranim unutarstaničnim signalnim putovima te se, za razliku od apoptoze, smatra pasivnim oblikom stanične smrti (Edinger i Thompson, 2004) jer ne zahtijeva sintezu novih proteina, ima minimalne enegretske potrebe i nije regulirana niti jednim homeostatskim mehanizmom (Syntichaki i Tavernarakis, 2002) te je posljedica ispreplitanja različitih molekularnih događanja (Niemann i Rohrbach, 2016). Nekroza uzrokuje smanjenje bioenergetskog potencijala mitohondrija što posljedično dovodi do smanjivanja razine ATP-a do razine na kojoj stanica nije sposobna za preživljavanje. Smatra se da nekrozu uzrokuju toksični uvjeti ili fizička oštećenja stanice. Nekroza rezultira gubitkom integriteta stanične membrane i nekontroliranim otpuštanjem staničnog sadržaja u izvanstanični prostor što dovodi do upalnog odgovora. Tipične morfološke promjene nekrotične smrti stanice koje se događaju u većini, ali ne i u svim eukariotskim stanicama, uključuju nabreknuće mitohondrija te rupturu (puknuće) lizosoma i plazmatske membrane (Niemann i Rohrbach, 2016).

Nekrozu mogu izazvati ozljede, infekcije, toplina, karcinom, infarkt, toksini i upalne reakcije. Neke studije su pokazale da neki neurodegenerativni poremećaji i bolesti, poput Alzheimerove, Huntingtonove, Parkinsonove bolesti, amiotrofijske lateralne skleroze (Price i sur., 1998) i epilepsije, uključuju nekrozu. Nekroza je popraćena otpuštanjem specifičnih enzima koji su pohranjeni u lizosomima i imaju sposobnost razgradnje staničnih komponenata (Niemann i Rohrbach, 2016). Stanice koje često umiru nekrozom mogu pokazati promjene u nuklearnoj morfologiji, ali ne i u kondenzaciji i fragmentaciji DNK u fragmenete od 200 bp koji su karakteristični za stanice koje umiru apoptozom (Edinger i Thompson, 2004). Postoje



i dokazi da značajke koje su dodijeljene apoptozi, ali ne i nekrozi, poput odsutnosti upalnog procesa, genetičke kontrole, metode stanične delecije ovisne o energiji, koja slijedi koordinirani, predviđeni i predodređeni put te kondenzacija kromatina, ne moraju biti isključivo karakteristike apoptoze. Apoptoza i nekroza su zapravo dvije krajnosti. Mnogi ksenobiotici/toksikanti mogu izazvati apoptozu u nižim i nekrozu u višim dozama (Niemann i Rohrbach, 2016).

## **2.6. PROTEKTIVNI UČINCI RESVERATROLA NA TOKSIČNOST INDUCIRANU PCB-ima**

Poliklorirani bifenili su perzistentni organski zagađivači čija je uporaba zabranjena 1970-ih u Sjedinjenim Američkim Državama, no nedavne studije procjenjuju da je prosječan Amerikanac i dalje izložen, u prosjeku, 33 ng PCB-a na dan kroz prehranu (Schechter i sur. 2010). Nekoliko epidemioloških studija tvrdi da izloženost niskim koncentracijama PCB-a potiče razvoj dijabetesa tipa 2 kod ljudi (Lee i sur., 2010; Lee i sur., 2011). Nedavne studije su pokazale da planarni PCB-i koji su ligandi AhR uzrokuju poremećaje homeostaze glukoze kod miša (Baker i sur., 2013a). Ovi učinci se povezuju s upalnim procesima u adipoznom tkivu, mjestu na kojem se PCB-i akumuliraju (Baker i sur., 2013a).

Biljni polifenol resveratrol pokazuje protektivni učinak u adipocitima. U 3T3-L1 adipocitima (preadipociti miša), resveratrol inhibira stimulaciju upalnih adipokina (Ahn i sur., 2007; Zhu i sur., 2008; Szkudelska i sur., 2009; Kang i sur., 2010; Olholm i sur., 2010; Yen i sur., 2011; Rosenow i sur., 2012). Resveratrol je pokazao protektivni učinak prema inzulinskoj rezistenciji u kultiviranim adipocitima (Kang i sur., 2012). Primjena resveratrola poboljšava toleranciju na glukozu i smanjuje inzulinsku rezistenciju kod miševa s izazvanom pretilošću (Baur i sur., 2006; Lagouge i sur., 2006; Jeon i sur., 2012), kod genetski uvjetovano-pretilih glodavaca (Milne i sur., 2007; Rivera i sur., 2009; Chen i sur., 2012) i ljudi s dijabetesom tipa 2 (Bhatt i sur., 2012). Resveratrol ulazi u interakcije s AhR rezultirajući translokacijom receptora u jezgru, a te interakcije ne rezultiraju aktivacijom (Casper i sur., 1999; Beedanagari i sur., 2009). Prema tome, resveratrol smanjuje toksične učinke liganada koji se vežu za AhR *in vitro* i *in vivo* (Casper i sur., 1999; Chen i sur., 2004; Lu i sur., 2008; Ishida i sur., 2009; Singh i sur., 2011). Još uvijek nije poznato ima li resveratrol protektivne učinke na toksičnost potaknutu PCB ligandima AhR-a te uključuje li ta zaštita obnavljanje mjera inzulinske osjetljivosti u adipocitima, primarnom mjestu za PCB-

ima izazvanu aktivaciju upalnih citokina koji su povezani s razvojem inzulinske rezistencije (Arsenescu i sur., 2008; Baker i sur., 2013a).

Rezultati studije (Baker i sur., 2013b) su pokazali da suplementacija s resveratrolom u prehrani u potpunosti sprječava PCB-em 77 izazvan poremećaj glukoze i inzulinsku rezistenciju kod miša. PCB rezultira supresijom inzulinske stimulirajućih razina pAkt (fosforilirani Akt – protutijelo) u adipoznom tkivu te je taj učinak spriječio resveratrol. U kultiviranim adipocitima, PCB 77 povećava oksidacijski stres i smanjuje inzulinske stimulirane razine p-Akt i unos glukoze, a ovi učinci mogu biti ublaženi ovisno o dozi resveratrola. Mehanizmi kojima resveratrol štiti od PCB izazvanog oksidacijskog stresa i poremećaja unosa glukoze u 3T3-L1 adipocitima mogu uključivati aktivaciju antioksidacijskog Nrf2 signalizirajućeg puta s obzirom da se pokazalo da resveratrol stimulira Nrf2 i/ili NQO1 ekspresiju u adipocitima i povećava ekspresiju NQO1 u adipoznom tkivu miša. Na tkivne razine PCB-a 77 i metabolita nije utjecala istodobna izloženost resveratrolu u miševa, što upućuje na to da protektivni učinci na PCB-ima narušenu homeostazu glukoze nisu rezultat promjena u distribuciji ili metabolizmu PCB-a 77. Studija (Baker i sur., 2013b) je pokazala da suplementacija s resveratrolom učinkovito štiti od dijabetoloških učinaka PCB-a 77 *in vitro* i *in vivo*. Nedavna klinička studija provedena na pacijentima s dijabetesom tipa 2, koji su uzimali oralne suplemente resveratrola tri mjeseca, pokazala je značajno poboljšanje svih biomarkera povezanih s bolešću (Bhatt i sur., 2012). Zanimljivo je da su neki biljni izvori hrane bogati s resveratrolom, a siromašni s PCB-ima uslijed akumulacije iz okoliša, s obzirom da je ukupna koncentracija PCB-a u hrani životinjskog podrijetla (meso i riba) veća nego u drugim prehrambenim izvorima (Schechter i sur., 2010). To znači da bi prehrana s više povrća i manje mesa istodobno pružila antioksidacijsku zaštitu te smanjila ukupno opterećenje organizma sa zagađivačima okoliša (Baker i sur., 2013b).

Rezultati ove studije (Baker i sur., 2013b) upućuju na to da resveratrol smanjuje oksidacijski stres u adipoznom tkivu izazvan s PCB-em 77 dok istovremeno povećava Nrf2 signalizaciju. Moguće je da ta resveratrolom posredovana stimulacija Nrf2 signalizacije doprinosi zaštiti od PCB-em 77 izazvanog poremećaja glukoze i tolerancije na inzulinske. Ovi rezultati dovode do zaključka da bi suplementacija s resveratrolom mogla biti potencijalna terapija kod populacije s poznatom izloženosti PCB-ima kako bi se smanjio rizik od razvoja dijabetesa (Baker i sur., 2013b).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijal

#### 3.1.1. Biološki materijal

U radu je korištena stanična linija ovarija kineskog hrčka CHO (*Chinese hamster ovary*) - K1 koja raste u monosloju. Stanice su subklonovi roditeljske stanične linije CHO izolirane iz ovarija odraslog kineskog hrčka (ATCC, 2019). Stanice su uzgajane pri 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> u Dulbecco's MEM/F-12 mediju uz dodatak 5-20% fetalnog goveđeg seruma.

#### 3.1.2. Kemikalije

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

- apsolutni etanol, Alkaloid, Skoplje, Makedonija
- boja tripan plavo (Trypan Blue), Sigma – Aldrich Co., St. Louis, SAD
- destilirana voda (dH<sub>2</sub>O)
- DMSO (dimetilsulfoksid), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Dulbecco's MEM/F-12, Sigma – Aldrich Co., St. Louis, MO, SAD
- Fetal Bovine Serum (FBS – fetalni goveđi serum), GIBCO, Paisley, Ujedinjeno Kraljevstvo
- KCl, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- ledena octena kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Muse annexin V & dead cell assay kit, kat. broj MCH 100105, Millipore, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- NaCl, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Neutralrot, E. Merck Ag – Darmstadt, Njemačka
- PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-heksaklorbifenil), Sigma – Aldrich Co., St. Louis, SAD
- PCB 77 (3,3',4,4'-tetraklorbifenil), Sigma – Aldrich Co., St. Louis, SAD
- Resveratrol, Sigma – Aldrich Co., St. Louis, SAD
- tripsin – EDTA, GIBCO, Paisley, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Coomassie brilliant blue R-250, LKB, Bromma, Švedska

### 3.1.3. Otopine i puferi

Dulbecco's MEM/F12 (GIBCO)

Sastav Dulbecco medija:

<b>Sastojci:</b>	<b>Koncentracija (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>aminokiseline:</b>	
L –Alanin	4,45
L -Arginin hidroklorid	147,50
L -Asparagin × H <sub>2</sub> O	7,50
L -Asparaginska kiselina	6,65
L -Cistein hidroklorid ×H <sub>2</sub> O	17,56
L -Cistein 2 HCl	31,29
L -Glutaminska kiselina	7,35
L –Glutamin	365,00
L -Histidin hidroklorid × H <sub>2</sub> O	31,48
L –Izoleucin	54,47
L –Leucin	59,05
L -Lizin hidroklorid	91,35
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	2,00
Riboflavin	0,219
Tiamin hidroklorid	2,17
Vitamin B <sub>12</sub>	0,68
I –inozitol	12,61

**anorganske soli:**

CaCl <sub>2</sub>	116,60
CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	0,0013
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> × 9 H <sub>2</sub> O	0,050
FeSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,417
MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	61,00
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	100,00
KCl	311,80
NaHCO <sub>3</sub>	1200,00
NaCl	6995,50
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	134,00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	62,50
ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,432

**ostali sastojci:**

D –Glukoza	3151,00
HEPES	3075,40
Hipoksantin Na	2,39
Linolna kiselina	0,042
Lipoična kiselina	0,105
Fenol crvenilo	8,100

Putrescin 2 HCl	0,081
Natrij piruvat	55,00
Timidin	0,365

**PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pufer**

**pH=7,4**

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
NaHPO <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***

Trypan Blue	0,08 g
PBS pufer	20 mL
Profiltrirati.	

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

Neutral Red	4,00 g
dH <sub>2</sub> O	100 mL
Sterilno profiltrirati.	

**Radna otopina *Neutral Red***

ishodna otopina <i>Neutral Red</i>	125 µL
medij za uzgoj	100 mL

**Otopina za odbojavanje**

apsolutni etanol	50 %
ledena octena kiselina	1 %
dH <sub>2</sub> O	49 %

**Kenacid Blue R stock otopina**

<i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>	0,4 g
Apsolutni etanol	250 mL
dH <sub>2</sub> O	630 mL

**Radna otopina Kenacid Blue**

<i>Kenacid Blue R stock otopina</i>	88 mL
Ledena octena kiselina	12 mL

**Otopina za fiksiranje Kenacid Blue boje**

Apsolutni etanol	50 %
Ledena octena kiselina	1 %
dH <sub>2</sub> O	49 %

**Otopina za ispiranje Kenacid Blue boje**

Apsolutni etanol	10 %
Ledena octena kiselina	5 %
dH <sub>2</sub> O	85 %

**Otopina za desorpciju**

Kalijev acetat	98,15 g
Apsolutni etanol	700 mL
dH <sub>2</sub> O	300 mL

**Ishodna otopina PCB 77**

PCB 77	10,00 mg
DMSO	3,42 mL

- pripremljena je otopina PCB 77 tako da se u mediju za uzgoj postigne koncentracija od 75  $\mu$ M PCB 77.

### **Ishodna otopina PCB 153**

PCB 153 10,00 mg

DMSO 2,77 mL

- pripravljena je otopina PCB 153 tako da se u mediju za uzgoj postigne koncentracija od 75  $\mu$ M PCB 153.

### **Ishodna otopina resveratrola**

Resveratrol 100 mg

Etanol 1 mL

- pripravljene su otopine resveratrola tako da se u mediju za uzgoj postignu koncentracije od 2,5, 5, 10, 15 i 20  $\mu$ M resveratrola.

#### 3.1.4. Oprema i uređaji

U radu je korištena sljedeća oprema:

- analitička vaga, Mettler, Zürich, Švicarska
- centrifuga, Centric 322A, Tehnica Železniki, Slovenija
- Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica; Assistant, Bright-Line, Njemačka
- inkubator s kontroliranom atmosferom; IR 1500, Automatic CO 2 , Flow Laboratories, Velika Britanija
- inverzni mikroskop; Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- komora za sterilan rad (laminar); Twin 30, Gelaire Flow Laboratories, Velika Britanija
- precizna vaga, Mettler P1210, Zürich, Švicarska
- spektrofotometar, Helios- $\gamma$ , Thermo Electron Corporation, Velika Britanija
- svjetlosni mikroskop; LABOVAL 4, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
- vibracijska mješalica, Tehnica Železniki, Slovenija
- MUSE (Muse Cell Analyzer), Millipore, Merck, Darmstadt, Njemačka



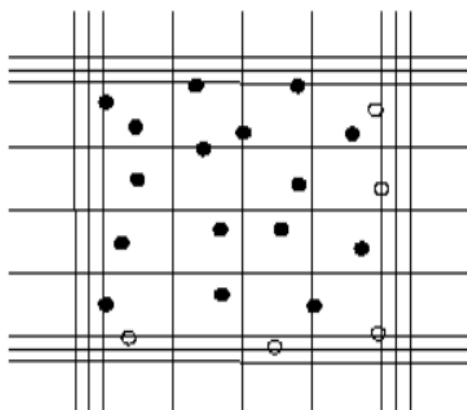
## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Održavanje CHO-K1 stanica u kulturi

CHO-K1 stanice se čuvaju na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  u mediju za zamrzavanje koji se sastoji od 80% Dulbecco's MEM/F-12 medija, 10% FBS-a i 10% DMSO-a. Uzgoj i održavanje stanica započinje naglim odmrzavanjem na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , u atmosferi od 95% zraka i 5%  $\text{CO}_2$ . Nakon odmrzavanja stanica slijedi centrifugiranje pri  $1000\text{ okretaja min}^{-1}$  u trajanju od 5 minuta te uklanjanje supernatanta. Talog stanica se resuspendira u 90% Dulbecco's MEM/F-12 medija i 10% FBS-a te prenese u T-bocu radi daljnje kultivacije. Uvjeti kontrolirane atmosfere ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 95% zraka i 5%  $\text{CO}_2$ ) potrebni su za optimalni rast i razvoj stanica, a osiguravaju se uzgojem stanica u inkubatoru u kojem vladaju navedeni uvjeti. Uz to potrebno je redovito mijenjanje medija za uzgoj. Monoslojne stanice u T-boci je prvo potrebno isprati od ostatka iskorištenog seruma i medija, a zatim odvojiti od površine T-boce dodavanjem 1-2 mL tripsina (proteolitički enzim). Tripsiniziranim stanicama se dodaje medij za uzgoj (90% Dulbecco's MEM/F-12 medija i 10% FBS-a) te se stanice resuspendiraju u mediju za uzgoj. Uzima se uzorak stanične suspenzije za određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*. Nakon izračunavanja broja stanica u uzorku, stanice se razrijeđuju na koncentraciju  $2 \times 10^5$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj dodatkom novog medija.

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

Iz suspenzije prethodno tripsiniziranih stanica izdvoji se  $20\text{ }\mu\text{L}$  stanica te im se dodaje  $20\text{ }\mu\text{L}$  0,4%-tne boje *Trypan Blue*. Dobivena suspenzija se resuspendira te se nanosi  $20\text{ }\mu\text{L}$  te suspenzije na Fuchs-Rosenthalovu komoricu te se broje stanice pod svjetlosnim mikroskopom. Žive stanice ostaju nebojane, dok su mrtve plavo obojane zbog oštećenja stanične membrane. Fuchs-Rosenthalova komorica je podijeljena na 16 kvadrata, a broje se stanice na unutarnja četiri i to tako da se uvijek broje sve stanice unutar kvadrata te one u donjem i desnom rubu kako bi se izbjeglo brojanje istih stanica više puta. Komorica je dubine  $0,2\text{ mm}$  i površine  $0,0625\text{ mm}^2$  (Slika 8). Broj stanica po mililitru medija za uzgoj se određuje na način da se izračuna srednja vrijednost broja živih stanica izbrojanih u četiri središnja kvadrata i pomnoži s  $10^4$ .



**Slika 8.** Fuchs-Rosenthalova komorica (FAO, 1996)

### 3.2.3. Određivanje učinka resveratrola pri citotoksičnom djelovanju PCB kongenera na vijabilnost CHO-K1 stanica *Neutral Red* metodom

U bunariće na mikrotitarskoj ploči nacijepljuje se po 2 mL suspenzije CHO-K1 stanica u koncentraciji  $2 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj te se nakon sat vremena dodaje pripremljena otopina resveratrola u apsolutnom etanolu, tako da se dodatkom 10  $\mu\text{L}$  otopine resveratrola po bunariću u mediju za uzgoj postignu koncentracije resveratrola od 2,5, 5, 10 i 20  $\mu\text{M}$  (prema Tablici 1). Predinkubacija resveratrolom trajala je 24 sata, nakon čega su stanice tretirane s 20  $\mu\text{L}$  75  $\mu\text{M}$  PCB-a 77, odnosno s 20  $\mu\text{L}$  75  $\mu\text{M}$  PCB-a 153 bez prethodnog uklanjanja medija s resveratrolom. Inkubacija s PCB kongenerima trajala je 24 sata. Istovremeno s praćenjem učinka resveratrola i PCB kongenera na stanice, praćen je i kontrolni uzorak stanica tretiran s istim volumenom (10  $\mu\text{L}$ ) apsolutnog etanola u kojem je dodavan resveratrol i istim volumenom (20  $\mu\text{L}$ ) DMSO-a u kojem su dodavani PCB kongeneri (20  $\mu\text{L}$ ) s ciljem određivanja mogućeg toksičnog djelovanja samih otapala. U jednom od 6 bunarića na mikrotitarskoj ploči stanice su tretirane sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77 ili PCB-em 153 bez prethodne predinkubacije resveratrolom dok jedan bunarić služi kao kontrolni uzorak (10  $\mu\text{L}$  DMSO  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj i 5  $\mu\text{L}$  apsolutnog EtOH  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj). Nakon inkubacije se vijabilnost stanica provjerava metodom *Neutral Red*.

Postupak određivanja vijabilnosti stanica *Neutral Red* metodom započinje uklanjanjem medija za uzgoj iz jažica *multiwell* ploča te ispiranjem stanica s 1 mL sterilnog PBS pufera kako bi se uklonili tragovi medija za uzgoj koji mogu utjecati na rezultate mjerenja. Potom se u svaku jažicu doda 1 mL radne otopine *Neutral Red*. Nakon toga slijedi inkubacija pri 37 °C u sterilnim uvjetima. Nakon 3 sata inkubacije iz jažica *multiwell* ploča se uklanja otopina boje

te se stanice ispiru PBS puferom. U jažice se potom dodaje 2 mL otopine za odbojavanje koje se provodi na tresilici u trajanju od 20 minuta. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540 nm u odnosu na slijepu probu.

#### 3.2.4. Određivanje učinka resveratrola pri citotoksičnom djelovanju PCB kongenera na vijabilnost CHO-K1 stanica *Kenacid Blue* metodom

Na istim stanicama je nakon provedene metode *Neutral Red*, provedena metoda *Kenacid Blue*. Postupak određivanja vijabilnosti stanica *Kenacid Blue* metodom započinje uklanjanjem otopine za odbojavanje i u svaku jažicu na ploči doda se 1 mL radne otopine *Kenacid Blue* boje pripremljene neposredno prije eksperimenta. Bojanje se provodi 20 minuta na tresilici, nakon čega se uklanja boja. Jažice se ispiru po dva puta s 1 mL otopine za ispiranje te se nakon drugog ispiranja ponovno stavljaju na tresilicu. Nakon 20 minuta ukloni se otopina za ispiranje, u svaku jažicu *multiwell* ploče se dodaje 2 mL otopine za desorpciju i ploče se ostave 20 minuta na tresilici. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 577 nm u odnosu na slijepu probu.

**Tablica 1.** Plan pokusa praćenja učinka resveratrola pri tretmanu stanica s PCB 77 i PCB 153

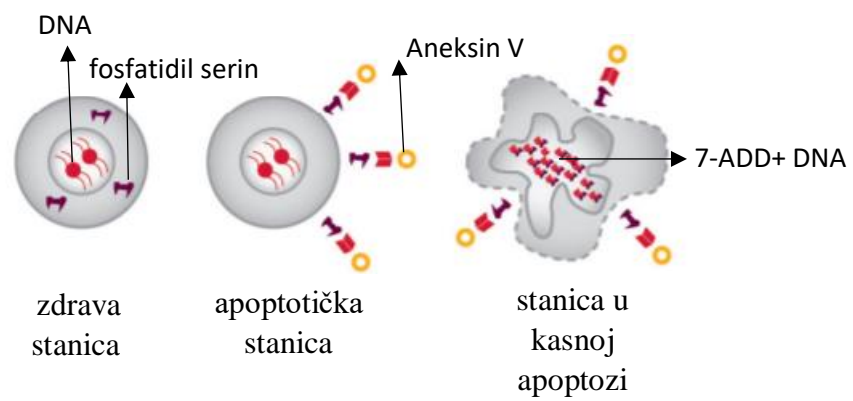
	Apsolutni etanol	DMSO	PCB 77	PCB 153	Resveratrol
<b>kontrolni uzorci</b>	+	+			
<b>praćenje proliferacije stanica uz PCB 77</b>	+		+		
<b>praćenje proliferacije stanica uz PCB 153</b>	+			+	
<b>praćenje proliferacije stanica prethodno inkubiranih resveratrolom, a potom tretiranih s PCB 77</b>			+		+
<b>praćenje proliferacije stanica prethodno inkubiranih resveratrolom, a potom tretiranih s PCB 153</b>				+	+

### 3.2.5. Određivanje učinka resveratrola pri citotoksičnom djelovanju PCB kongenera protočnim citometrom Muse-om

Muse je novi instrument koji omogućava multidimenzionalnu analizu zdravlja stanice. Karakterizira ga brzo dobivanje rezultata, odnosno koncentracije stanica, stanične vijabilnosti, apoptotičkog statusa i distribucije stanica unutar staničnog ciklusa (Gillis i sur., 2011). Bazira se na detekciji fosfatidil serina na površini apoptotičkih stanica te koristi reagens koji sadrži fluorescentno označeni Aneksin V (eng. *Annexin V*) u kombinaciji s markerom stanične smrti, 7-amino aktinomicin D (eng. *7-amino actinomycin D*, 7-AAD). Aneksin V je  $\text{Ca}^{2+}$ -ovisni fosfolipid-vezujući protein koji ima visoki afinitet za fosfatidil serin koji se nalazi na unutarnjoj površini stanične membrane (Khan i sur., 2012).

U ovom radu korišten je jedan od dostupnih kitova za određivanje apoptoze, kit kat. br. MCH100105 (*Muse annexin V & dead cell assay kit*) koji se skladišti zaštićen od svjetla na temperaturi od 2 do 8°C, a sadrži dvije boje: 7-aktinomicin D i fikoeritrin (PE). Fluorescentna boja 7-AAD izlučuje se iz živih i zdravih stanica dok se zadržava u mrtvim stanicama kao i u stanicama u kasnoj apoptozi (Merck Millipore, 2019). Uz argon-ion laser 7-AAD može biti u pobuđenom stanju kod 488 nm i emitira kod maksimalne valne duljine 647 nm. Stoga je pogodan za korištenje s drugim fluorokromima koji emitiraju kod 488 nm kao što su FITC i PE (R&D Systems, 2019). U fazi rane apoptoze fosfatidil serin se premješta na vanjsku površinu stanične membrane gdje ga Aneksin V-PE (anneksin V označen fluorescentnim fikoeritriinom) uočava te se veže na njega (Slika 9). U fazi kasne apoptoze stanice pokazuju gubitak membranskog integriteta (Khan i sur., 2012). Uz pomoć ovog kita može se odrediti udio živih i mrtvih stanica te udio stanica u ranoj i kasnoj apoptozi (Merck Millipore, 2019).

Na *multiwell* ploči sa 6 jažica nacijepi se 2 mL CHO-K1 stanica u koncentraciji  $2 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj. Sat vremena nakon nacijepijivanja stanice su tretirane resveratrolom, a zatim se, nakon 24 sata, stanice tretiraju s PCB-em 77 ili PCB-em 153. Nakon inkubacije od 48 sati metodom protočne citometrije određuje se udio živih, nekrotičnih i apoptotičnih stanica u populaciji. Postupak započinje tripsinizacijom i sakupljanjem stanica. Iz jažica se ukloni medij te se na stanice dodaje 500  $\mu\text{L}$  tripsina i kada se sve stanice odvoje od podloge u jažice se vraća 500  $\mu\text{L}$  prethodno izvađenog medija. Dobiva se suspenzija stanica u mediju iz koje se izdvaja 100  $\mu\text{L}$  za daljnju analizu. Test se provodi tako da se pomiješa 100  $\mu\text{L}$  kit-a kat. br. MCH100105 i 100  $\mu\text{L}$  uzorka. Slijedi inkubacija 20 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, a zatim nanošenje uzorka na protočni citometar i očitavanje rezultata mjerenja.



**Slika 9.** Kombinirana upotreba Aneksina V i 7-AAD omogućava razlikovanje živih stanica te stanica u ranoj i kasnoj apoptozi (Khan i sur., 2012)

### 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 ovog rada bio je ispitati učinak resveratrola pri citotoksičnom djelovanju PCB-a 77 i PCB-a 153. Prethodnim istraživanjima provedenim u Laboratoriju za toksikologiju utvrđen je izražen inhibitorni učinak PCB-a na staničnu proliferaciju pri dozama  $\geq 50 \mu\text{M}$  te je stoga odabrana doza od  $75 \mu\text{M}$  PCB-a 77, odnosno PCB-a 153 za istraživanja obuhvaćena ovim radom (Murati i sur., 2015). U tu svrhu korištena je CHO (*Chinese Hamster Ovary*) – K1 stanična linija. Nakon postavljanja pokusa, odnosno naciepljivanja 2 mL stanica pripremljenih prema protokolu u jažice *multiwell* ploča, uslijedila je inkubacija u trajanju od jednog sata. Stanice su potom tretirane resveratrolom tako da su u mediju za uzgoj postignute koncentracije od 2,5, 5, 10 i  $20 \mu\text{M}$  (pri dozama višim od  $50 \mu\text{M}$  resveratrol djeluje citotoksično na CHO-K1 stanice, Marđetko, 2015) te inkubirane tijekom 24 sata, nakon čega su tretirane sa  $75 \mu\text{M}$  PCB-em 77 ili PCB-em 153 i ponovno inkubirane tijekom 24 sata. Mogući protektivni učinak resveratrola na CHO-K1 stanice pri citotoksičnom djelovanju PCB-kongenera ispitan je metodama *Neutral Red* i *Kenacid Blue* te metodom protočne citometrije. Dobiveni rezultati su statistički obrađeni te prikazani u obliku grafova.

Metode *Neutral Red* i *Kenacid Blue* su jedne od najčešće korištenih testova citotoksičnosti zbog jednostavnosti izvođenja te mogućnosti brzog dobivanja rezultata. *Neutral Red* se temelji na sposobnosti živih (vijabilnih) stanica da inkorporiraju i vežu boju *Neutral Red* u lizosomima (Repetto i sur., 2008), dok se *Kenacid Blue* metoda temelji na vezanju boje na ukupne stanične proteine (Clothier, 1995).

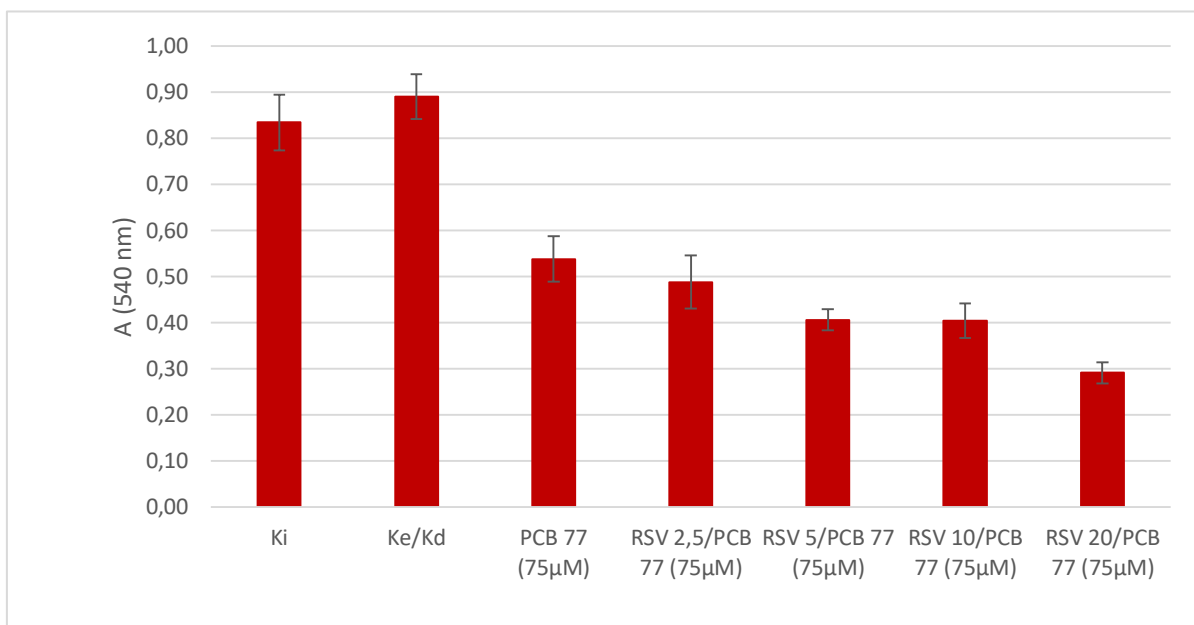
Protočna citometrija je metoda koja se zasniva na laserskoj tehnologiji, a koristi se za analizu stanice ili njezinih dijelova. Njome se mogu utvrditi proteini na površini stanice, kao i molekule unutar stanice, veličina i volumen stanice, različite stanice u heterogenoj staničnoj populaciji te čistoća izoliranih subpopulacija. Često se koristi za određivanje proteina na koje se vežu fluorescentno označeni ligandi ili antitijela mjerenjem fluorescencije (Abcam, 2019). U ovom radu učinak resveratrola pri citotoksičnom djelovanju PCB kongenera određen je pomoću protočnog citometra Muse i kita za određivanje apoptoze (*Muse annexin V & dead cell assay kit*), koji se bazira na detekciji fosfatidil serina na površini apoptotičkih stanica. Ova metoda omogućava kvantitativnu analizu živih, apoptotičkih (u ranoj i kasnoj apoptozi) i mrtvih (nekrotičnih) stanica te daje točne i precizne rezultate koji su izraženi kao koncentracija (stanice  $\text{mL}^{-1}$ ) i postotak prethodno navedenih stanica (Merck Millipore, 2019).

#### **4.1. UČINAK RESVERATROLA PRI CITOTOKSIČNOM DJELOVANJU PCB-a 77 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN METODAMA *NEUTRAL RED* I *KENACID BLUE***

Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben) je prirodni antioksidans, polifenolni spoj koji pripada razredu stilbena, odnosno podskupini ne-flavonoidnih fenolnih spojeva (Bastin i Djouadi, 2016; Waterhouse, 2002). Pripisuju mu se brojni biološki učinci na zdravlje: antioksidacijska aktivnost, modulacija metabolizma lipida i lipoproteina, antitrombocitno djelovanje, vazodilatacijski učinak, antikancerogeni učinak, estrogena aktivnost (Fremont, 1999), protuupalni i kemopreventivni učinci (Wenzel i Somoza, 2005) te zaštita od razvoja dijabetesa (Sharma i sur., 2007) i neurodegenerativnih bolesti (Anekonda, 2006). Neka *in vitro*, ali i *in vivo* istraživanja su pokazala da resveratrol ima sposobnost inhibicije rasta nekoliko vrsta ljudskih kancerogenih stanica, ovisno o dozi u kojoj se primjenjuje, a taj antiproliferativni učinak se pripisuje sposobnosti zaustavljanja stanica u S-fazi staničnog ciklusa i indukciji apoptoze (Joe i sur., 2002).

Moguće protektivno djelovanje resveratrola na PCB-em 77 (75  $\mu$ M) inducirano smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica određeno je 24 sata nakon tretmana stanica s tim „dioksinu“ sličnim PCB kongenerom metodom *Neutral Red*, a potom i metodom *Kenacid Blue*.





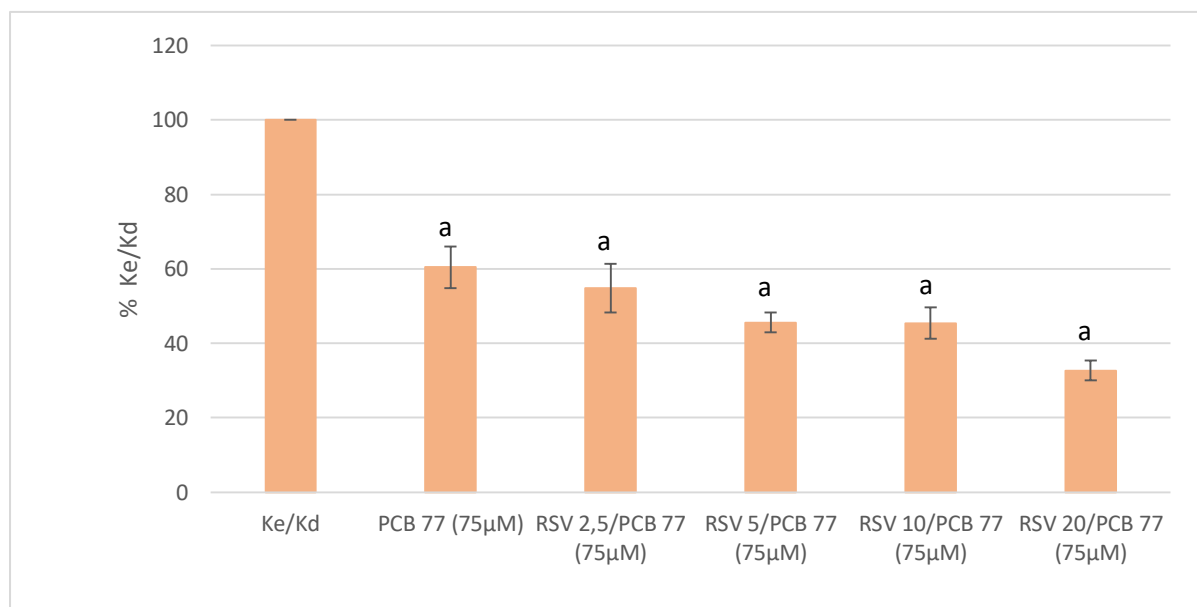
**Slika 10.** Učinak resveratrola (2,5 – 20 µM) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih sa 75 µM PCB-em 77 određen metodom *Neutral Red* (Ki – intaktne stanice; Ke/Kd – stanice tretirane s etanolom u koncentraciji od 5 µL mL<sup>-1</sup> i DMSO u koncentraciji od 10 µL mL<sup>-1</sup>; PCB 77 – stanice tretirane s PCB 77 i etanolom u koncentraciji od 5 µL mL<sup>-1</sup>; RSV 2,5/PCB 77 – RSV 20/PCB 77 – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 20 µM te zatim tretirane sa 75 µM PCB 77. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

Poliklorirani bifenili su sveprisutni zagađivači okoliša, visoko stabilni spojevi pa se koriste u proizvodnji brojnih industrijskih proizvoda. Fizikalno – kemijska svojstva pojedinih PCB kongenera se razlikuju, što utječe na njihovu apsorpciju u organizmu, kumulaciju i metabolizam (Bonefeld-Jørgensen i sur., 2001). Dokazano je da PCB-i mogu poremetiti endokrinu homeostazu organizma i izazvati reproduktivnu toksičnost te da djeluju imunotoksično, neurotoksično i genotoksično. Stupanj toksičnosti pojedinog PCB kongenera uvelike ovisi o poziciji i broju supstituiranih atoma klora na bifenilnom prstenu (Kmetič i sur., 2012).

PCB kongeneri su hidrofobni te imaju ograničenu topljivost u vodi pa se može očekivati da komponente seruma (proteini i lipidi) imaju značajan utjecaj na biodostupnost PCB-a za unos u stanicu. Od mogućih 209 PCB kongenera, u ovom radu korištena su dva, PCB 77 i PCB 153. PCB 77 je kongener planarne konformacije s visokim, a PCB 153 je kongener neplanarne konformacije s niskim afinitetom za Ah receptor. Pri tretmanu CHO-K1 stanica sa

75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77 vidljivo je da je došlo do smanjenja broja vijabilnih stanica u odnosu na kontrolne uzorke (Ki – intaktne stanice; Ke/Kd – stanice tretirane s etanolom i DMSO) (Slika 10). Istraživanja drugih znanstvenika su pokazala da tretman i s planarnim (PCB 77) i s neplanarnim (PCB 153) PCB kongenerima dovodi do gubitka stanične vijabilnosti i ubrzava proces apoptoze (Sánchez-Alonso i sur., 2003). Međutim, postoje neki autori koji su dokazali da PCB kongeneri planarne konfiguracije i s visokim afinitetom za Ah receptor ne iniciraju apoptozu i ne utječu na vijabilnost stanica (Shin i sur., 2000). Takvi kontradiktorni rezultati mogu biti posljedica korištenja različitih modela u istraživanjima (Sánchez-Alonso i sur., 2003). Većina istraživanja o mehanizmima toksičnosti PCB-a su fokusirana na planarne, dioksinu slične kongenere s pretpostavkom da je Ah receptor uključen u toksične učinke ovih spojeva (Sánchez-Alonso i sur., 2003), ali je bitno napomenuti da i PCB kongeneri neplanarne konfiguracije mogu izazvati toksične učinke nekim drugim mehanizmima (Kmetič i sur., 2012).

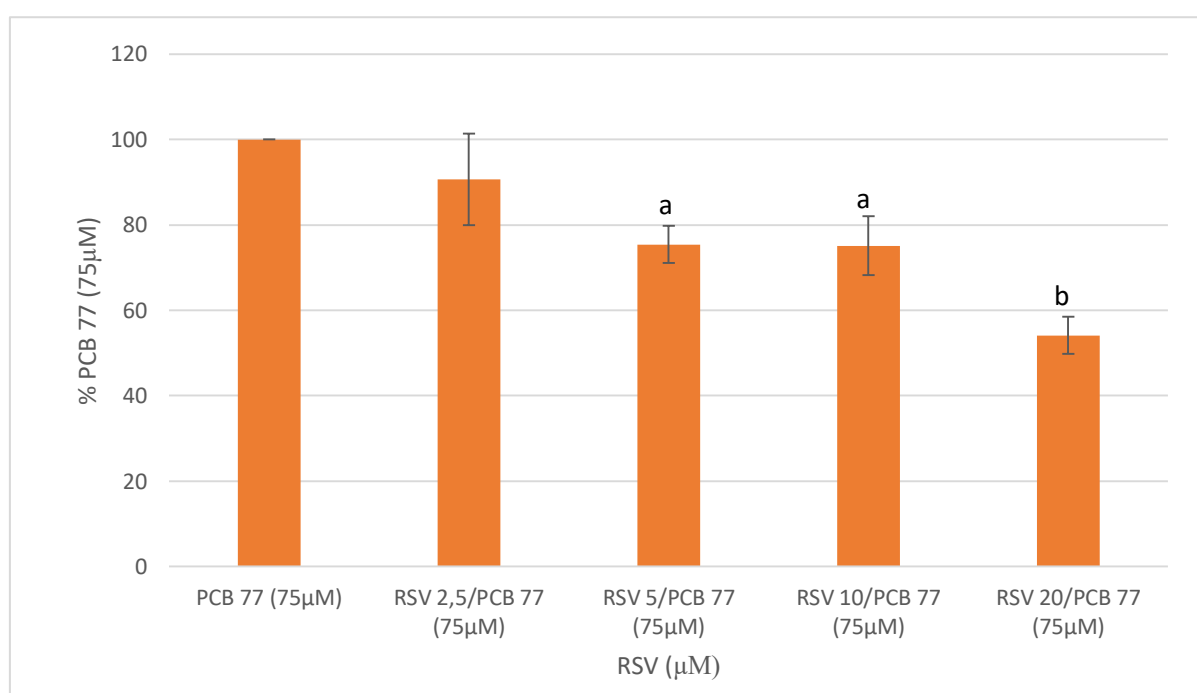
Učinak različitih koncentracija resveratrola (2,5 - 20  $\mu\text{M}$ ) na staničnu vijabilnost, na Slici 11 prikazan je kao postotak preživljenja stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77 uz predtretman s resveratrolom u odnosu na kontrolni uzorak (Ke/Kd).



**Slika 11.** Učinak resveratrola (2,5 -20  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77 u odnosu na kontrolni uzorak (Ke/Kd - stanice tretirane s etanolom i DMSO) određen metodom *Neutral Red*. Podaci su izraženi izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup> $p < 0,001$ .

Iz Slike 11 je vidljiv statistički značajan citotoksični učinak PCB 77 u odnosu na kontrolni uzorak (Ke/Kd) određen metodom *Neutral Red*. Predtretman stanica s resveratrolom nije doveo do željenog protektivnog učinka na vijabilnost stanica tretiranih s PCB-em 77. Bez obzira na predtretman s resveratrolom, preživljenje s PCB-em 77 tretiranih stanica i dalje je statistički značajno niže u odnosu na kontrolu.

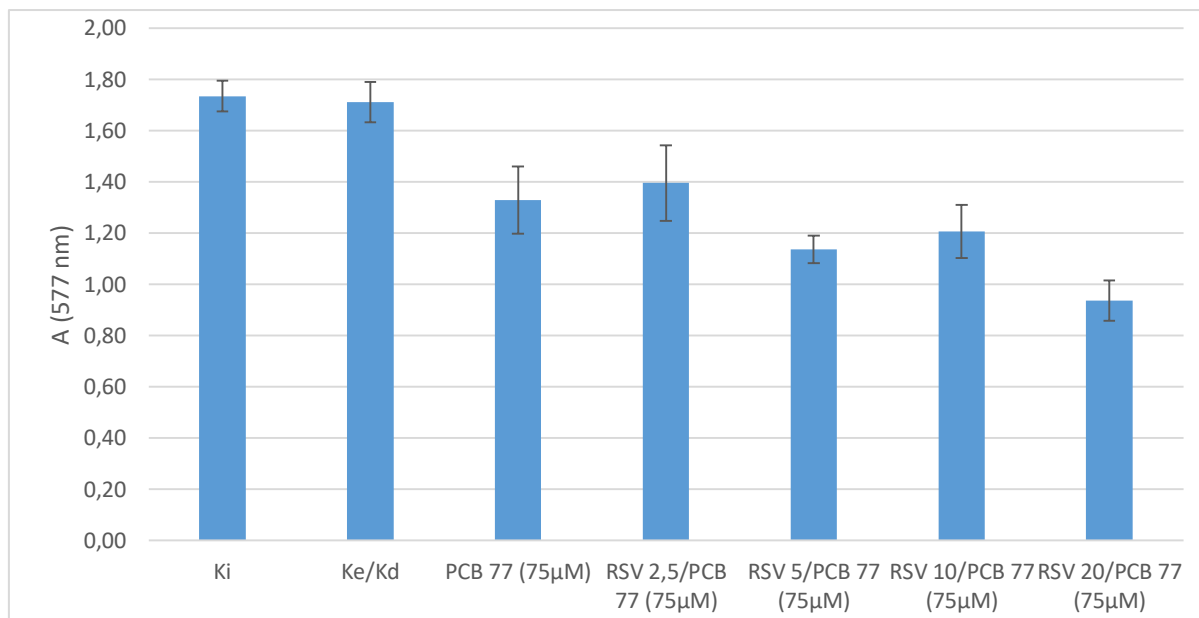
Učinak resveratrola na vijabilnost PCB-em tretiranih stanica na Slici 12 prikazan je kao postotak preživljenja stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77 uz predtretman s resveratrolom u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 77.



**Slika 12.** Učinak resveratrola (2,5 -20  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica 24 sata nakon tretmana sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77 u odnosu na stanice tretirane sa PCB 77 bez prethodnog tretmana s resveratrolom (PCB 77) određen metodom *Neutral Red*. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup> $p < 0,05$ ; <sup>b</sup> $p < 0,001$ .

Kod stanica predtretiranih s resveratrolom, a zatim inkubiranih s PCB-em 77 u odnosu na one tretirane samo s PCB-em 77 ne samo da nije došlo do poboljšanja vijabilnosti što je bila hipoteza istraživanja, već je obrnuto – primijećeno je sinergističko inhibitorno djelovanje resveratrola pri koncentracijama od 5  $\mu\text{M}$  i višim ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$ ) (Slika 12).

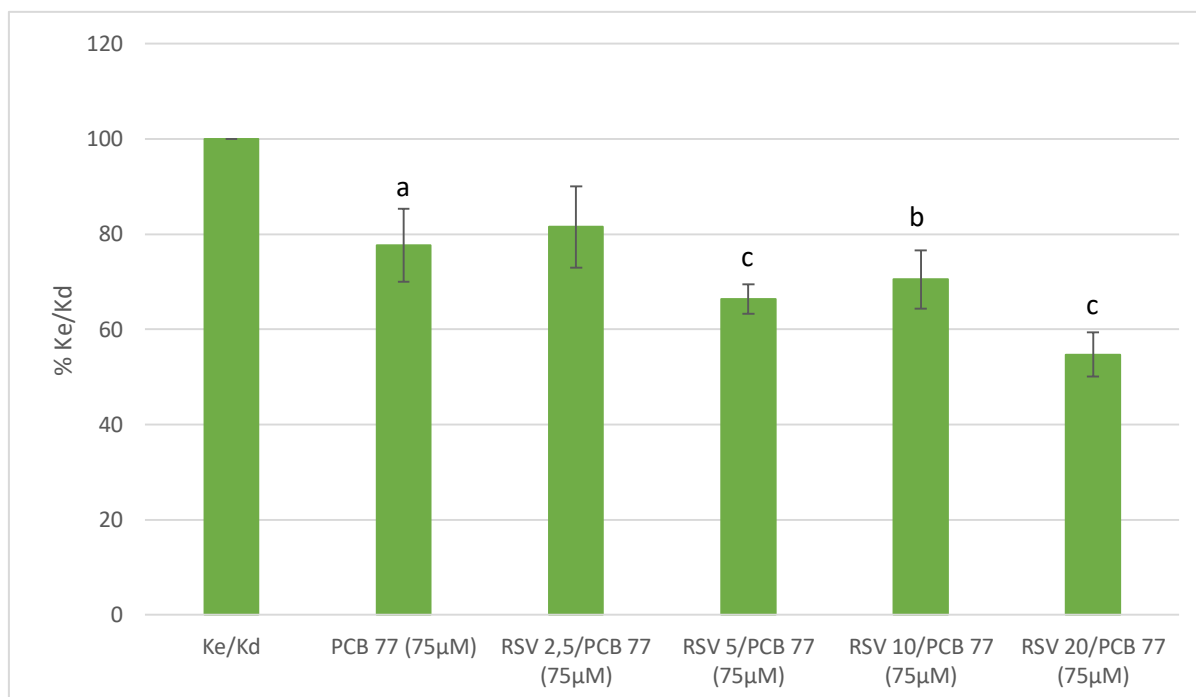
Moguće protektivno djelovanje resveratrola u različitim koncentracijama (2,5 – 20  $\mu\text{M}$ ) na smanjenu vijabilnost stanica 24 sata nakon tretmana s PCB-em 77 određeno je i metodom *Kenacid Blue*, nakon provedene *Neutral Red* metode.



**Slika 13.** Učinak resveratrola (2,5 – 20  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77 određen metodom *Kenacid Blue* (Ki – intaktne stanice; Ke/Kd – stanice tretirane s etanolom u koncentraciji od 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  i DMSO u koncentraciji od 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; PCB 77 – stanice tretirane s PCB 77 i etanolom u koncentraciji od 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; RSV 2,5/PCB 77 – RSV 20/PCB 77 – stanice predinkubirane s resveratrolo u koncentracijama od 2,5 – 20  $\mu\text{M}$  te zatim tretirane sa 75  $\mu\text{M}$  PCB 77. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška.

Nakon tretmana CHO-K1 stanica sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77 uz prethodnu inkubaciju s različitim koncentracijama resveratrola (2,5 – 20  $\mu\text{M}$ ), metodom *Kenacid Blue* je utvrđeno da je došlo do smanjenja vijabilnosti stanica zbog citotoksičnog djelovanja PCB-a 77 u odnosu na kontrolne uzorke (Ki i Ke/Kd) te da nijedna koncentracija resveratrola nije pokazala protektivni učinak na smanjenje vijabilnosti stanica nakon tretmana s PCB-em 77 (Slika 13).

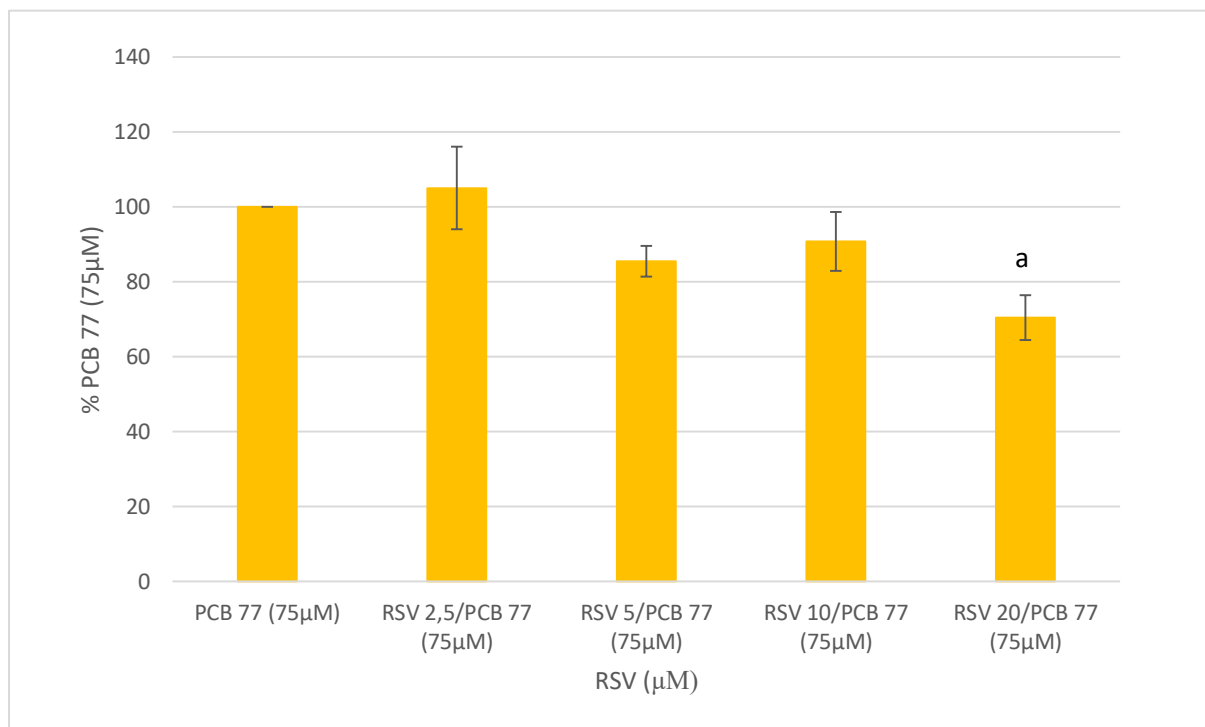
Učinak različitih koncentracija resveratrola (2,5 - 20  $\mu\text{M}$ ) na staničnu vijabilnost prikazan je kao postotak preživljenja stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77, uz predtretman s resveratrolom u odnosu na kontrolni uzorak (Ke/Kd) (Slika 14).



**Slika 14.** Učinak resveratrola na vijabilnost (2,5 -20  $\mu\text{M}$ ) CHO-K1 stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77 u odnosu na kontrolni uzorak (Ke/Kd - stanice tretirane s etanolom i DMSO) određen metodom *Kenacid Blue*. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup> $p < 0,025$ ; <sup>b</sup> $p < 0,005$ ; <sup>c</sup> $p < 0,001$ .

Metodom *Kenacid Blue* uočeno je da je 75  $\mu\text{M}$  PCB 77 citotoksično djelovao na CHO-K1 stanice i uzrokovao statistički značajno smanjenje vijabilnosti stanica (PCB 77) u odnosu na kontrolni uzorak stanica (Ke/Kd) ( $p < 0,025$ ). Stanice koje su bile predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 5, 10 i 20  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$ ;  $< 0,001$ ), a zatim tretirane s PCB-em 77 nisu pokazale poboljšanu vijabilnost, što znači da nijedna koncentracija resveratrola nije imala protektivni učinak na stanice. Blagi porast vijabilnosti uočen je kod stanica koje su prethodno bile inkubirane s resveratrolom u koncentraciji od 2,5  $\mu\text{M}$ , ali nije statistički značajan (Slika 14).

Učinak resveratrola na vijabilnost stanica određen metodom *Kenacid Blue* prikazan je kao postotak preživljenja stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77 uz predtretman s resveratrolom u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 77 (Slika 15).

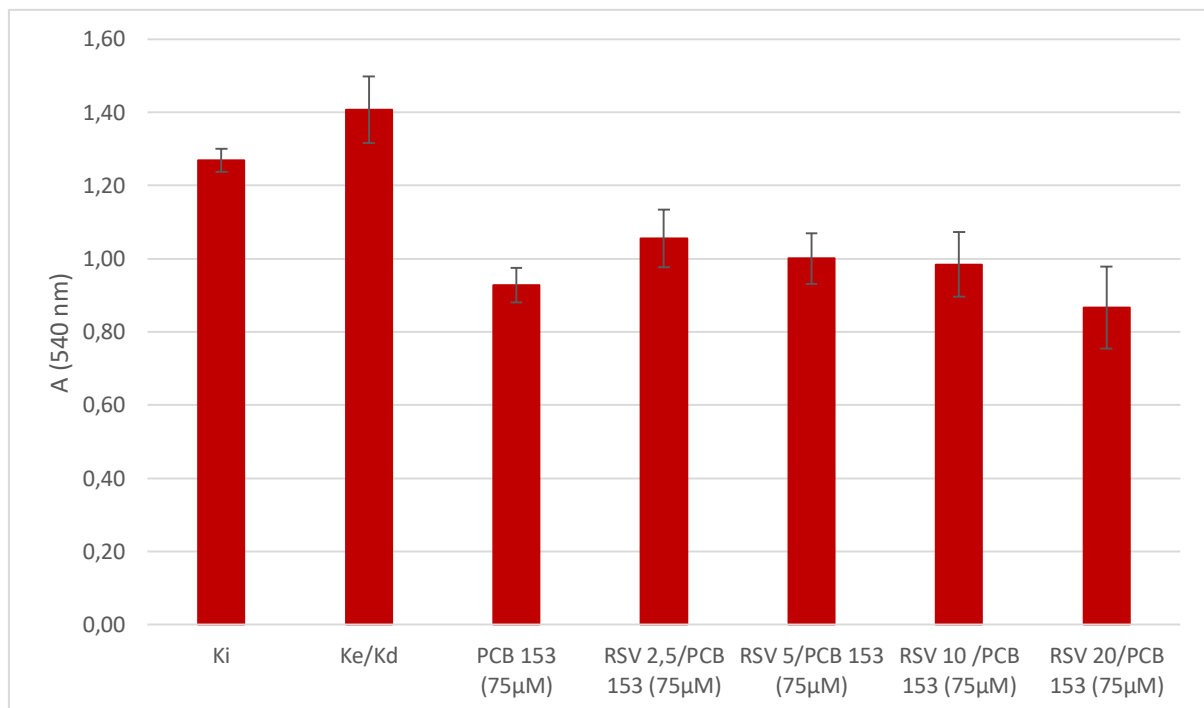


**Slika 15.** Učinak resveratrola (2,5 -20  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77 u odnosu na stanice tretirane s PCB-em 77 bez prethodnog tretmana s resveratrolom određen metodom *Kenacid Blue*. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup> $p < 0,025$ .

Ispitivanjem učinka resveratrola primjenjenog u različitim koncentracijama (2,5 – 20  $\mu\text{M}$ ) pri citotoksičnom djelovanju PCB-a 77 u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 77 *Kenacid Blue* metodom, uočeno je statistički značajno smanjenje vijabilnosti kod stanica prethodno inkubiranih s resveratrolom u koncentraciji 20  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,025$ ). Niti jedna koncentracija resveratrola nije pokazala statistički značajan protektivni učinak na vijabilnost stanica tretiranih s PCB-em. Do blagog, ali ne i statistički značajnog porasta vijabilnosti stanica došlo je kod stanica predinkubiranih s resveratrolom u koncentraciji od 2,5  $\mu\text{M}$ , u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 77 (Slika 15).

#### 4.2. UČINAK RESVERATROLA PRI CITOTOKSIČNOM DJELOVANJU PCB-a 153 NA CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI ODREĐEN METODAMA *NEUTRAL RED* I *KENACID BLUE*

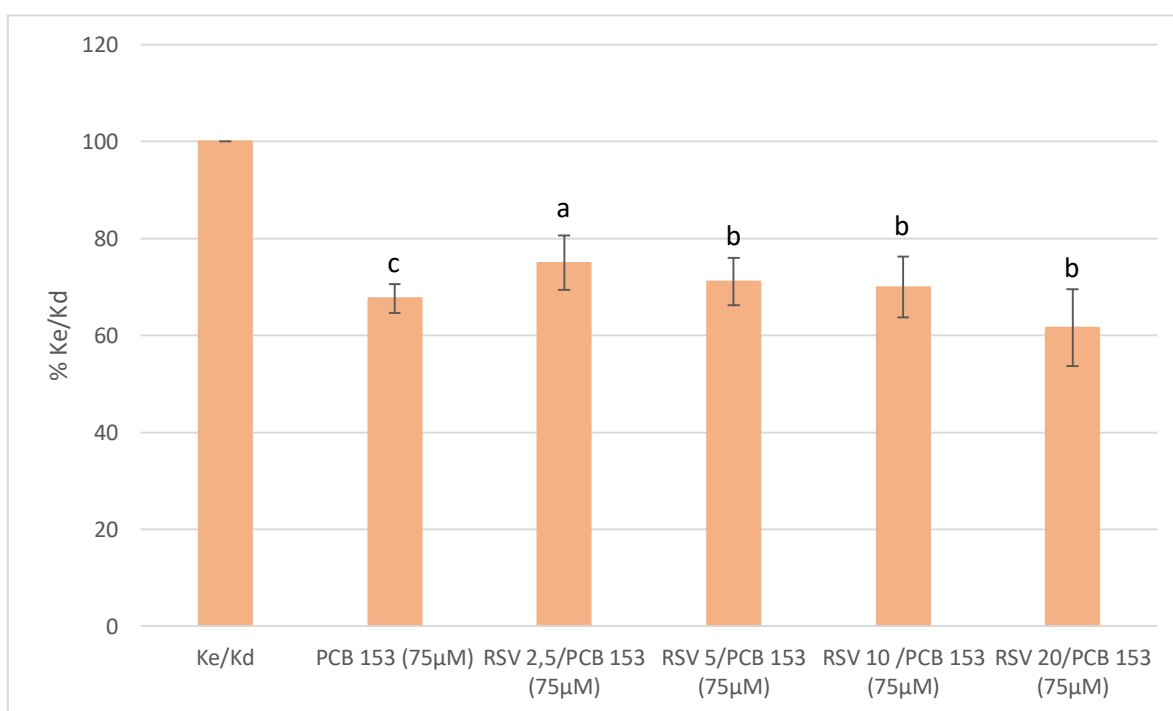
Moguće protektivno djelovanje resveratrola na PCB-em 153 (75  $\mu\text{M}$ ) inducirano smanjenje vijabilnosti CHO-K1 stanica određeno je 24 sata nakon tretmana s PCB kongenerom metodom *Neutral Red*, a potom i *Kenacid Blue* metodom.



**Slika 16.** Učinak resveratrola (2,5 – 20  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 153 određen metodom *Neutral Red* (Ki – intaktne stanice; Ke/Kd – stanice tretirane s etanolom u koncentraciji od 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  i DMSO u koncentraciji od 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; PCB 153 – stanice tretirane s PCB-em 153 i etanolom u koncentraciji od 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  ; RSV 2,5/PCB 153 – RSV 20/PCB 153 – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 20  $\mu\text{M}$  te zatim tretirane sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 153). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška.

Na Slici 16 može se uočiti citotoksičan učinak PCB-a 153 na CHO-K1 stanice – vijabilnost stanica tretiranih s PCB-em 153 značajno je niža u odnosu na kontrolni uzorak stanica (Ke/Kd) određen metodom *Neutral Red*. Predtretman stanica s resveratrolom (2,5 – 20  $\mu\text{M}$ ) pokazao je blagi protektivni učinak na vijabilnost stanica tretiranih s PCB-em 153, no preživljenje je i dalje bilo značajno niže u odnosu na kontrolu.

Učinak različitih koncentracija resveratrola (2,5 - 20  $\mu\text{M}$ ) na staničnu vijabilnost prikazan je kao postotak preživljenja stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 153, uz predtretman s resveratrolom u odnosu na kontrolni uzorak (Ke/Kd) (Slika 17).



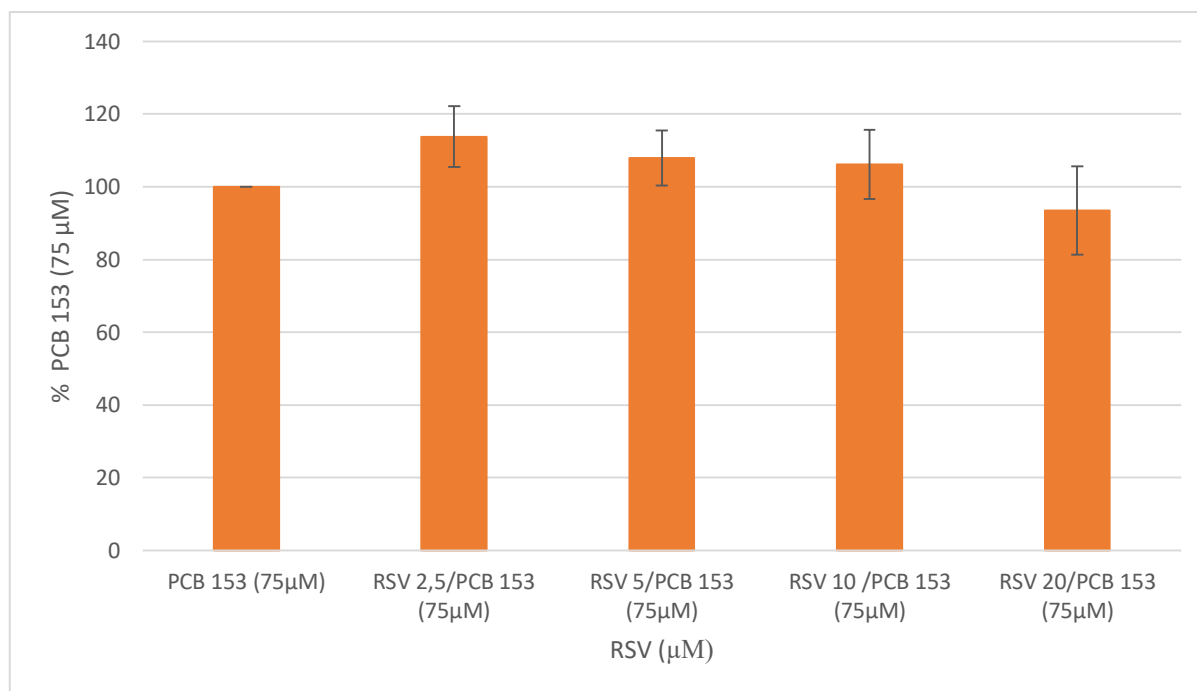
**Slika 17.** Učinak resveratrola (2,5 -20  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 153 u odnosu na kontrolni uzorak (Ke/Kd - stanice tretirane s etanolom i DMSO) određen metodom *Neutral Red*. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup> $p < 0,01$ ; <sup>b</sup> $p < 0,005$ ;

Iz Slike 17 vidljiv je statistički značajan citotoksični učinak PCB-a 153 u odnosu na kontrolne stanice (Ke/Kd) ( $p < 0,001$ ) određen metodom *Neutral Red*. Predtretman s resveratrolom u koncentracijama 2,5, 5 i 10  $\mu\text{M}$  je doveo do blagog protektivnog učinka na vijabilnost stanica tretiranih s PCB-em 153, dok taj isti učinak nije primijećen kod stanica prethodno tretiranih s resveratrolom u koncentraciji 20  $\mu\text{M}$ . Bez obzira na predtretman s



resveratrolom, preživljenje PCB-em 153 tretiranih stanica i dalje je statistički značajno niže u odnosu na kontrolu.

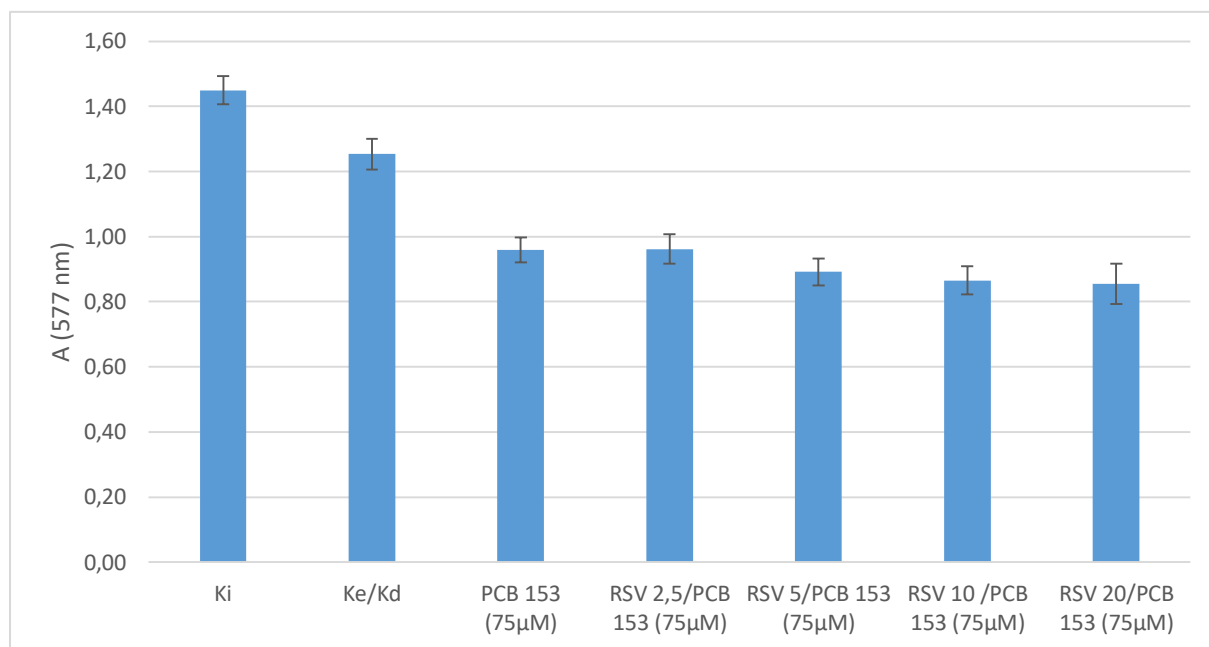
Učinak resveratrola na vijabilnost PCB-em tretiranih stanica prikazan je kao postotak preživljenja stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 153, uz predtretman s resveratrolom u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 153 (Slika 18).



**Slika 18.** Učinak resveratrola (2,5 -20  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica 24 sata nakon tretmana sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 153 u odnosu na stanice tretirane sa PCB-em 153 bez prethodnog tretmana s resveratrolom (PCB 153) određen metodom *Neutral Red*. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška.

Kod stanica inkubiranih s resveratrolom, a potom tretiranih s PCB-em 153 u odnosu na one tretirane samo s PCB-em 153, došlo je do blagog poboljšanja vijabilnosti stanica pri koncentracijama 2,5, 5 i 10  $\mu\text{M}$  što ukazuje na to da je predtretman s resveratrolom pokazao blagi protektivni učinak. Kod stanica predtretiranih s resveratrolom u koncentraciji 20  $\mu\text{M}$ , a potom inkubiranih s PCB-em 153, resveratrol nije pokazao protektivni učinak na stanice (Slika 18).

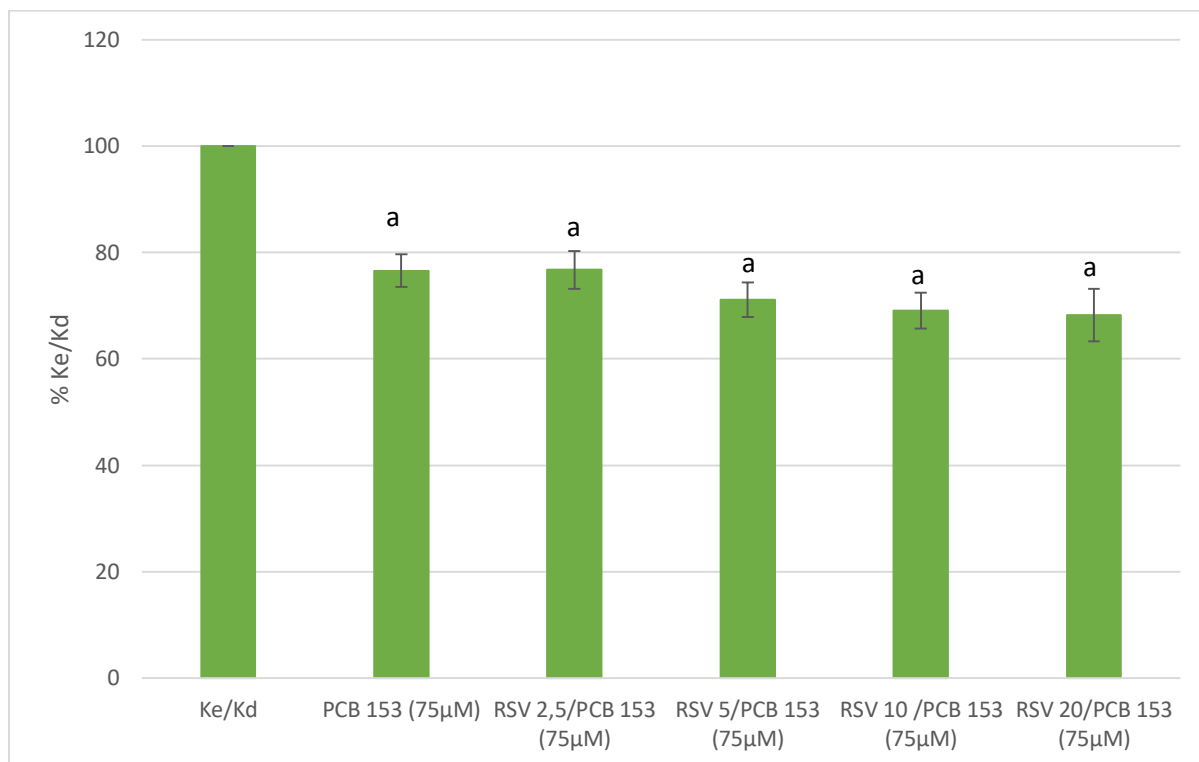
Moguće protektivno djelovanje resveratrola u različitim koncentracijama (2,5 – 20  $\mu\text{M}$ ) na smanjenu vijabilnost stanica 24 sata nakon tretmana s PCB-em 153 određeno je i metodom *Kenacid Blue*, nakon provedene *Neutral Red* metode.



**Slika 19.** Učinak resveratrola (2,5 – 20  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 153 određen metodom *Kenacid Blue* (Ki – intaktne stanice; Ke/Kd – stanice tretirane s etanolom u koncentraciji od 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  i DMSO u koncentraciji od 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; PCB 153 – stanice tretirane s PCB-em 153 i etanolom u koncentraciji od 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  ; RSV 2,5/PCB 153 – RSV 20/PCB 153 – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 20  $\mu\text{M}$  te zatim tretirane sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 153). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška.

Nakon tretmana CHO-K1 stanica sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 153 uz prethodnu inkubaciju s različitim koncentracijama resveratrola (2,5 – 20  $\mu\text{M}$ ), metodom *Kenacid Blue* je utvrđeno da je došlo do smanjenja vijabilnosti stanica zbog citotoksičnog djelovanja PCB-a 153 u odnosu na kontrolne uzorke (Ki i Ke/Kd) te da nijedna koncentracija resveratrola nije pokazala protektivni učinak na smanjenje vijabilnosti stanica nakon tretmana s PCB-em 153 (Slika 19).

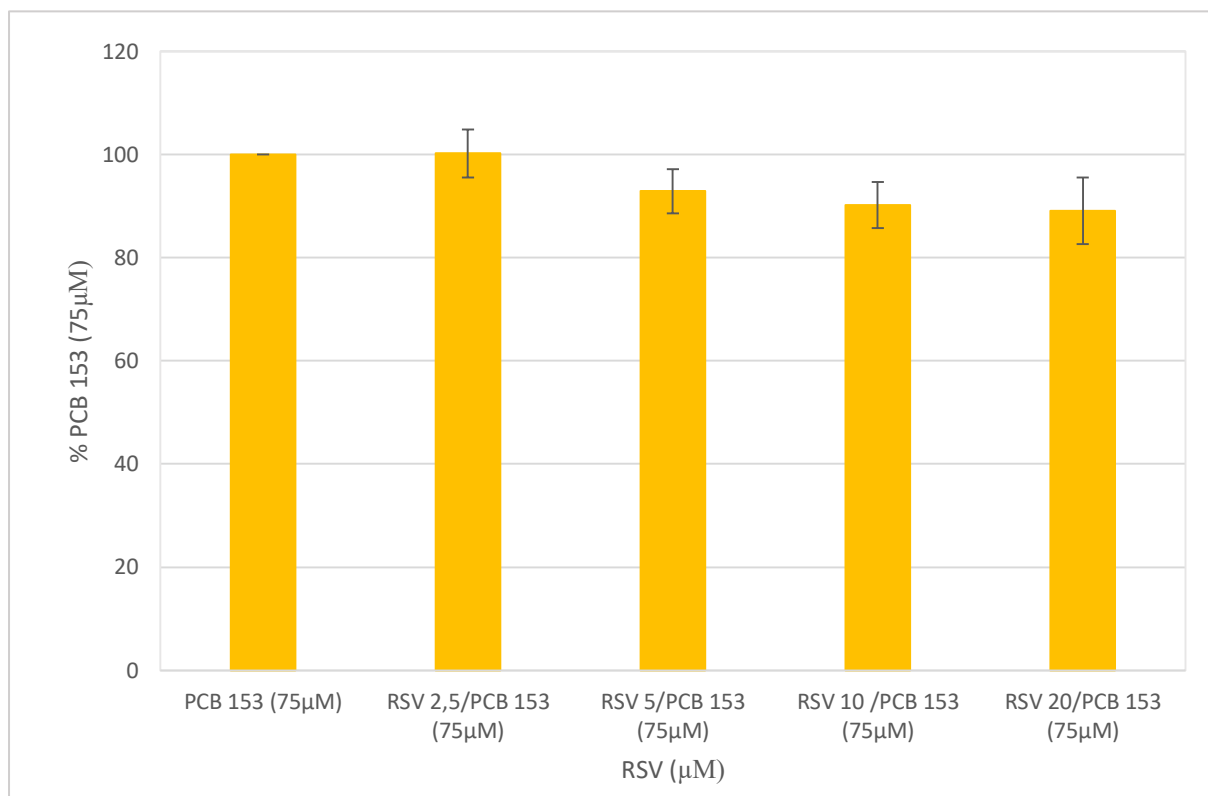
Učinak različitih koncentracija resveratrola (2,5 - 20  $\mu\text{M}$ ) na staničnu vijabilnost prikazan je kao postotak preživljenja stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 153, uz predtretman s resveratrolom u odnosu na kontrolni uzorak (Ke/Kd) (Slika 20).



**Slika 20.** Učinak resveratrola (2,5 -20  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 153 u odnosu na kontrolni uzorak (Ke/Kd – stanice tretirane s etanolom i DMSO) određen metodom *Kenacid Blue*. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup> $p < 0,001$ .

Metodom *Kenacid Blue* utvrđeno je da je 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 citotoksično djelovao na CHO-K1 stanice i uzrokovao statistički značajno smanjenje vijabilnosti stanica (PCB 153) ( $p < 0,001$ ) u odnosu na kontrolni uzorak stanica (Ke/Kd). Vijabilnost stanica predinkubiranih s resveratrolom u koncentraciji od 2,5  $\mu\text{M}$ , a zatim tretiranih s PCB-em 153 je slična vijabilnosti stanica tretiranih samo s PCB-em 153, dok je pri višim koncentracijama resveratrola određen daljnji pad stanične vijabilnosti (Slika 20).

Učinak resveratrola na vijabilnost stanica određen metodom *Kenacid Blue* prikazan je kao postotak preživljenja stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 153, uz predtretman s resveratrolom u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 153 (Slika 21).

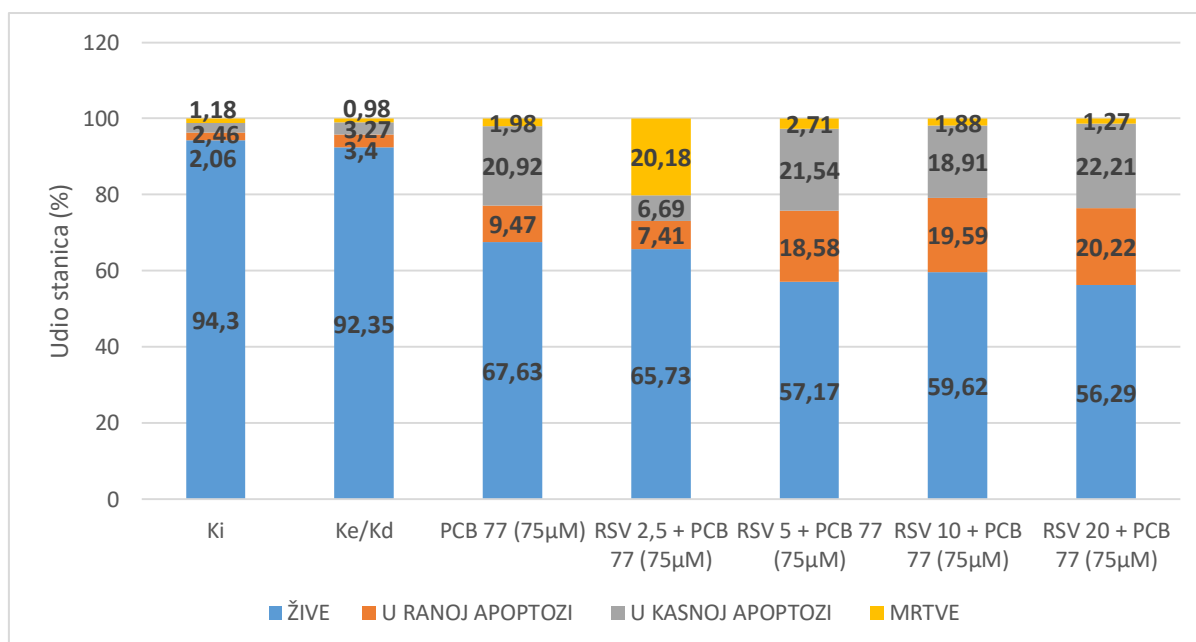


**Slika 21.** Učinak resveratrola (2,5 -20  $\mu\text{M}$ ) na vijabilnost CHO-K1 stanica tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB 153 u odnosu na stanice tretirane s PCB-em 153 bez prethodnog tretmana s resveratrolom određen metodom *Kenacid Blue*. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška.

Ispitivanjem učinka resveratrola primjenjenog u različitim koncentracijama (2,5 – 20  $\mu\text{M}$ ) u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 153 *Kenacid Blue* metodom, uočeno je da je kod stanica predinkubiranih s resveratrolom u koncentracijama od 5, 10 i 20  $\mu\text{M}$  došlo do blagog smanjenja vijabilnosti stanica. Vijabilnost stanica predinkubiranih s resveratrolom u koncentraciji 2,5  $\mu\text{M}$ , a zatim tretiranih s PCB-em 153 je slična vijabilnosti stanica tretiranih samo s PCB-em 153 (Slika 21).

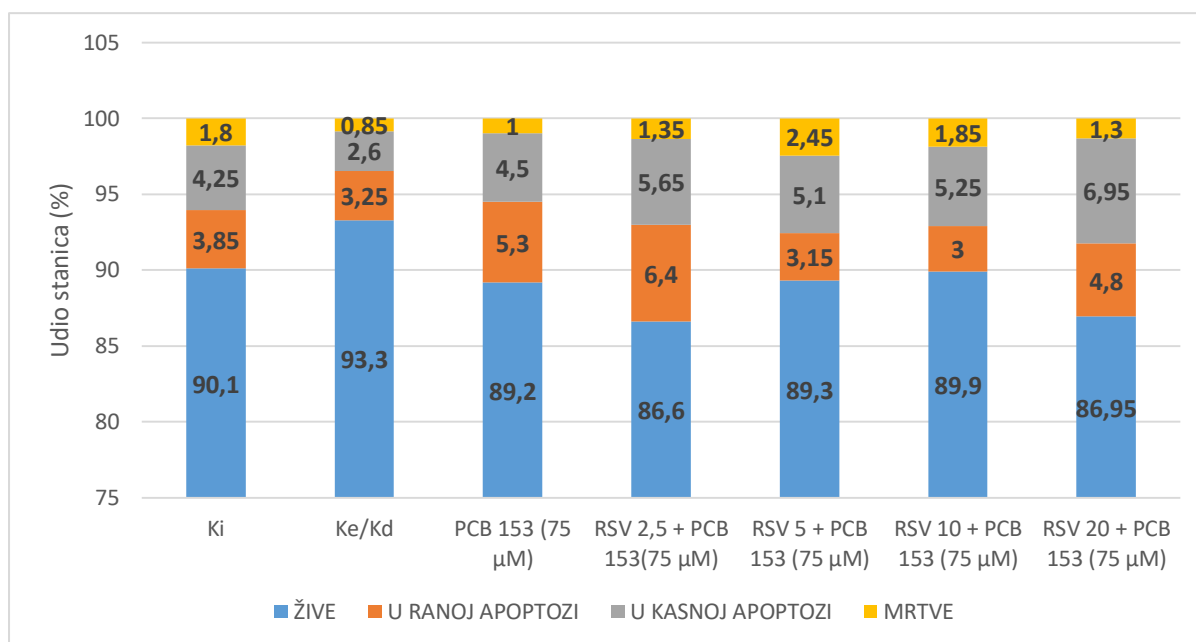
### **4.3. UČINAK RESVERATROLA PRI CITOTOKSIČNOM DJELOVANJU PCB-a 77 ILI PCB-a 153 ODREĐEN METODOM PROTOČNE CITOMETRIJE**

U ovom radu protočna citometrija je provedena Muse Cell Analyzer-om. Korišten je kit kat. br. MCH100105 (*Muse annexin V & dead cell assay kit*) koji omogućuje određivanje udjela vijabilnih, apoptotskih (rana i kasna apoptoza) i nekrotičnih stanica u ukupnoj staničnoj populaciji. Protein fosfatidil serin translocira na površinu membrane stanice pri samom početku apoptoze i zato je pogodan za detekciju apoptoze u ranoj fazi. Na fosfatidil serin se veže aneksin V koji je označen fluorescentnom bojom fikoeritrinom (PE). Druga fluorescentna boja koju sadrži kit kat. br. MCH100105 je 7-amino aktinomicin D (7-AAD), a zadržava se u mrtvim stanicama (Merck Millipore, 2019). Rezultati dobiveni iz paralelnih uzoraka kojima se ispitivao učinak resveratrola na PCB-em 77 odnosno PCB-em 153 inducirano toksično djelovanje metodom protočne citometrije prikazani su na Slikama 22 i 23 te su izraženi kao udjeli živih, odnosno mrtvih stanica te stanica u ranoj odnosno kasnoj apoptozi. Reprezentativni *dot-plot*-ovi dobiveni primjenom protočnog citometra Muse i *Muse annexin V & dead cell assay* kita s četiri različite populacije CHO-K1 stanica unutar analiziranog uzorka: žive i zdrave stanice, mrtve, u ranoj i kasnoj apoptozi 48 sati nakon inkubacije s resveratrolom, odnosno 24 h nakon tretmana s PCB-em 77 ili PCB-em 153 prikazani su na slikama 24 i 25. Donji lijevi kvadrant na svakom dijagramu prikazuje žive stanice koje su negativne na aneksin V i 7-AAD. Donji desni kvadrant prikazuje udio stanica u ranoj apoptozi, a pozitivne su na aneksin V (imaju vezani aneksin V-PE na membranski protein fosfatidil serin). U gornjem desnom kvadrantu su stanice pozitivne na aneksin V i 7-AAD, što znači da se stanice nalaze u kasnoj apoptozi ili su mrtve (kao posljedica apoptoze ili nekroze). U gornjem lijevom kvadrantu su mrtve stanice koje nisu umrle procesom apoptoze (pozitivne su na 7-AAD i negativne na aneksin V).



**Slika 22.** Postotak živih, stanica u ranoj apoptozi, kasno apoptotičnih te mrtvih stanica nakon predtretmana stanica s resveratrolom (2,5 – 20 µM) i tretmana sa 75 µM PCB-em 77 određen metodom protočne citometrije (Ki – intaktne stanice; Ke/Kd – stanice tretirane s etanolom u koncentraciji od 5 µL mL<sup>-1</sup> i DMSO u koncentraciji od 10 µL mL<sup>-1</sup>; PCB 77 – stanice tretirane s PCB-em 77 i etanolom u koncentraciji od 5 µL mL<sup>-1</sup>; RSV 2,5/PCB 77 – RSV 20/PCB 77 – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 20 µM te zatim tretirane sa 75 µM PCB-em 77).

Na Slici 22 vidljivo je da je nakon tretmana CHO-K1 stanica s PCB-em 77 došlo do smanjenja postotka živih stanica. Povećanje udjela stanica u fazi rane apoptoze uočeno je kod stanica prethodno inkubiranih s resveratrolom u koncentracijama 5, 10 i 20 µM, a zatim tretiranih s PCB-em 77 u odnosu na one bez predinkubacije s resveratrolom, a samo tretirane s PCB-em 77. Postotak kasno apoptotičnih i mrtvih stanica (zajedno) je bio podjednak bez obzira da li su stanice bile ili ne predinkubirane s resveratrolom, osim što je kod stanica predinkubiranih s resveratrolom u koncentraciji 2,5 µM, a potom tretiranih s PCB-em 77, uočen veći udio mrtvih stanica u odnosu na one u kasnoj apoptozi.



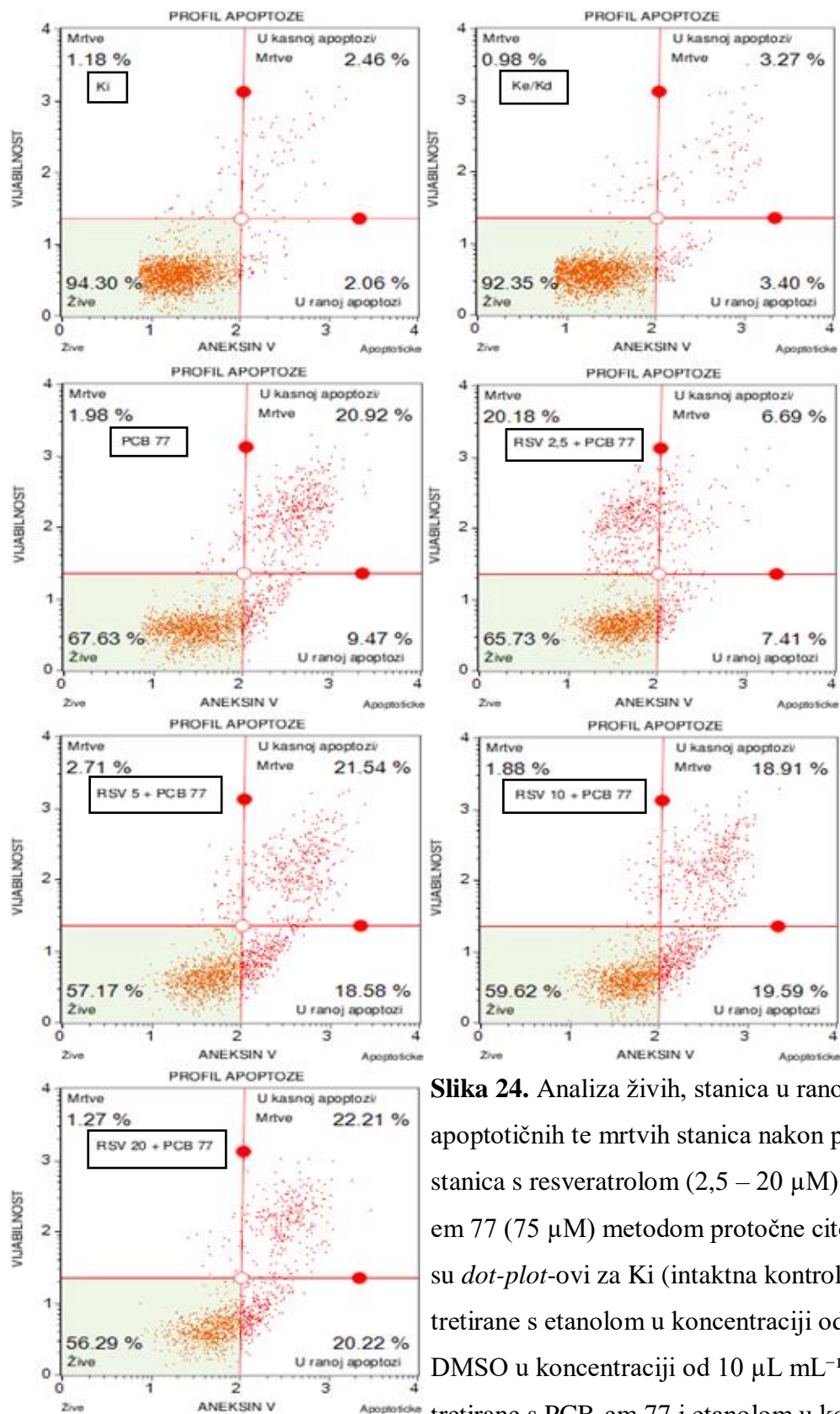
**Slika 23.** Postotak živih, stanica u ranoj apoptozi, kasno apoptotičnih te mrtvih stanica nakon predtretmana stanica s resveratrolom (2,5 – 20 μM) i tretmana sa 75 μM PCB-em 153 određen metodom protočne citometrije (Ki – intaktne stanice; Ke/Kd – stanice tretirane s etanolom u koncentraciji od 5 μL mL<sup>-1</sup> i DMSO u koncentraciji od 10 μL mL<sup>-1</sup>; PCB 153 – stanice tretirane s PCB 153 i etanolom u koncentraciji od 5 μL mL<sup>-1</sup>; RSV 2,5/PCB 153 – RSV 20/PCB 153 – stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 20 μM te zatim tretirane sa 75 μM PCB-em 153).

Iz prikaza na Slici 23 može se uočiti blagi pad udjela živih stanica u ukupnoj staničnoj populaciji nakon tretmana stanica s PCB-em 153 (75 μM) u odnosu na kontrolni uzorak (Ke/Kd). Nadalje, populacija stanica inkubiranih s resveratrolom, a zatim tretiranih s PCB-em 153 u odnosu na one tretirane samo s PCB-em 153, nije pokazala značajnije razlike u distribuciji stanica po pojedinim frakcijama – udjeli živih, mrtvih, rano i kasno apoptotičnih stanica nisu se značajnije promijenili s obzirom na dodani resveratrol.

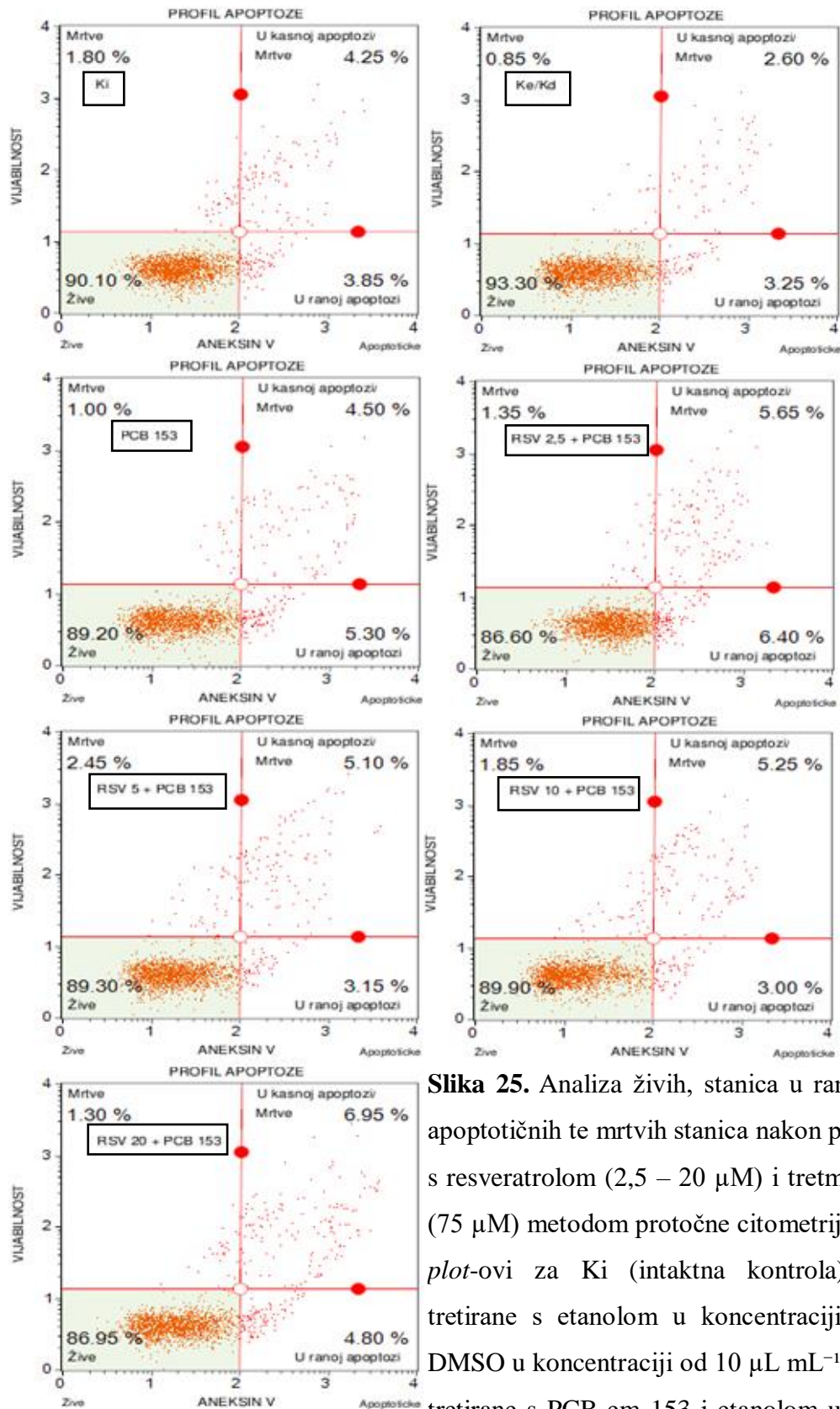
Nakon ispitivanja učinaka resveratrola metodama *Neutral Red*, *Kenacid Blue* te metodom protočne citometrije, uočeno je izraženije citotoksično djelovanje PCB-a 77 na CHO-K1 stanice te značajnije smanjenje stanične vijabilnosti u odnosu na stanice tretirane s PCB-em 153. Ranije provedena istraživanja na CHO-K1 stanicama su pokazala da izloženost različitim koncentracijama planarnih PCB kongenera (npr. PCB 77) može inducirati pad vijabilnosti

stanica ovarija te uzrokovati poremećaje reproduktivnog sustava toksičnim i apoptotičkim djelovanjem (Murati i sur., 2015). U ovom radu oba PCB kongenera su inducirala apoptozu pri čemu je PCB 77 pokazao značajniji apoptotički učinak (Slika 24) za razliku od PCB-a 153 jer je u većoj mjeri uzrokovao smanjenje udjela živih stanica te povećanje udjela stanica u fazi apoptoze (Slika 25). Ovakve rezultate pokazuju i studije provedene na drugim tipovima stanica poput neuralnih (Sánchez-Alonso i sur., 2003) i jetrenih stanica štakora (Tharappel i sur., 2002). Predtretman stanica s resveratrolom pri citotoksičnom učinku dioksinu sličnog kongenera PCB-a 77, nije pokazao željeni – protektivni učinak te se ispoljio dodatno negativan učinak na vijabilnost stanica što je potrebno dalje istražiti. Pri citotoksičnom učinku *ortho*-supstituiranog PCB-a 153, resveratrol je pokazao blagi pozitivni učinak na proliferaciju i vijabilnost CHO-K1 stanica.





**Slika 24.** Analiza živih, stanica u ranoj apoptozi, kasno apoptotičnih te mrtvih stanica nakon predtretmana stanica s resveratrolom (2,5 – 20  $\mu\text{M}$ ) i tretmana s PCB-em 77 (75  $\mu\text{M}$ ) metodom protočne citometrije. Prikazani su *dot-plot*-ovi za Ki (intaktna kontrola), Ke/Kd (stanice tretirane s etanolom u koncentraciji od 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  i DMSO u koncentraciji od 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ), PCB 77 (stanice tretirane s PCB-em 77 i etanolom u koncentraciji od 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ), RSV 2,5/PCB 77 – RSV 20/PCB 77 (stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 20  $\mu\text{M}$  te zatim tretirane sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77).



**Slika 25.** Analiza živih, stanica u ranoj apoptozi, kasno apoptotičnih te mrtvih stanica nakon predtretmana stanica s resveratrolom (2,5 – 20  $\mu\text{M}$ ) i tretmana s PCB-em 153 (75  $\mu\text{M}$ ) metodom protočne citometrije. Prikazani su *dot-plot*-ovi za Ki (intaktna kontrola), Ke/Kd (stanice tretirane s etanolom u koncentraciji od 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  i DMSO u koncentraciji od 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ), PCB 153 (stanice tretirane s PCB-em 153 i etanolom u koncentraciji od 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ), RSV 2,5/PCB 153 – RSV 20/PCB 153 (stanice predinkubirane s resveratrolom u koncentracijama od 2,5 – 20  $\mu\text{M}$  te zatim tretirane sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 153).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Stanična linija ovarija kineskog hrčka (CHO-K1) pokazala se kao zadovoljavajući alternativni test sustav za praćenje učinaka resveratrola pri toksičnom djelovanju PCB-a 77 ili PCB-a 153.
2. Statistički značajno smanjenje vijabilnosti stanica utvrđeno je metodom *Neutral Red* nakon tretmana stanica sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77 ( $p < 0,001$ ) u odnosu na kontrolni uzorak (Ke/Kd). I nakon predinkubacije stanica s resveratrolom (2,5 – 20  $\mu\text{M}$ ), a potom tretmana s PCB-em 77 (75 $\mu\text{M}$ ) i dalje je određen statistički značajan pad vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolni uzorak ( $p < 0,001$ ).
3. Iz usporedbe stanica predinkubiranih s resveratrolom, a zatim tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77 u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 77, nakon provedene metode *Neutral Red*, vidljiv je još više izražen, statistički značajan pad vijabilnosti stanica (pri dozama resveratrola 5, 10 i 20  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ ). Resveratrol pri tretmanu stanica s PCB-em 77 nije pokazao protektivno djelovanje, već je uzrokovao dodatno negativne učinke na staničnu vijabilnost i proliferaciju.
4. Metodom *Kenacid Blue* također je utvrđen statistički značajan pad vijabilnosti stanica nakon tretmana stanica sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77 ( $p < 0,025$ ) u odnosu na kontrolni uzorak (Ke/Kd). U odnosu na kontrolni uzorak i one stanice predinkubirane s resveratrolom, a zatim tretirane s PCB-em 77 i dalje su pokazale statistički značajno nižu vijabilnost ( $p < 0,005$ ;  $p < 0,001$ ), osim pri dozi resveratrola od 2,5  $\mu\text{M}$ .
5. Iz usporedbe stanica predinkubiranih s resveratrolom, a zatim tretiranih s PCB-em 77 u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 77, nakon provedene metode *Kenacid Blue*, vidljiv je statistički značajan pad vijabilnosti stanica pri koncentraciji resveratrola 20  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,025$ ). Resveratrol pri tretmanu stanica s PCB-em 77 određen *Kenacid Blue* metodom je pokazao blago protektivno djelovanje pri koncentraciji od 2,5  $\mu\text{M}$ , ali se taj protektivni učinak ne smatra statistički značajnim.
6. Metodom *Neutral Red* utvrđeno je statistički značajno smanjenje vijabilnosti stanica nakon tretmana stanica sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 153 ( $p < 0,001$ ) u odnosu na kontrolni uzorak (Ke/Kd).
7. Usporedbom stanica predinkubiranih s resveratrolom, a zatim tretiranih s PCB-em 153 u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 153, nakon provedene *Neutral Red* metode, uočen je blagi protektivni učinak resveratrola na vijabilnost stanica pri dozama resveratrola 2,5, 5 i 10  $\mu\text{M}$ . Kod stanica predinkubiranih s resveratrolom u

koncentraciji od 20  $\mu\text{M}$ , a potom tretiranih s PCB-em 153, resveratrol nije pokazao protektivno djelovanje.

8. Metodom *Kenacid Blue* utvrđen je statistički značajan pad vijabilnosti stanica nakon tretmana stanica sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 153 ( $p < 0,001$ ) u odnosu na kontrolni uzorak (Ke/Kd). Vijabilnost stanica predinkubiranih s resveratrolom u koncentraciji 2,5  $\mu\text{M}$ , a zatim tretiranih s PCB-em 153, je slična vijabilnosti stanica tretiranih samo s PCB-em 153, dok je pri višim koncentracijama resveratrola određen daljnji pad stanične vijabilnosti.
9. Iz usporedbe stanica predinkubiranih s resveratrolom, a zatim tretiranih sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 153, u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 153, nakon provedene *Kenacid Blue* metode, vidljivo je blago smanjenje vijabilnosti stanica pri dozama resveratrola 5, 10 i 20  $\mu\text{M}$ . Vijabilnost stanica predinkubiranih s resveratrolom u koncentraciji 2,5  $\mu\text{M}$ , a zatim tretiranih s PCB-em 153, slična je vijabilnosti stanica tretiranih samo s PCB-em 153.
10. Nakon tretmana CHO-K1 stanica sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 77, metodom protočne citometrije utvrđeno je smanjenje udjela živih stanica. Povećanje udjela stanica u fazi rane apoptoze uočeno je kod stanica prethodno inkubiranih s resveratrolom u koncentracijama 5, 10 i 20  $\mu\text{M}$ , a zatim tretiranih s PCB-em 77, u odnosu na one bez predinkubacije s resveratrolom. Postotak kasno apoptotičnih i mrtvih stanica (zajedno) je bio podjednak bez obzira da li su stanice bile predinkubirane s resveratrolom ili ne.
11. Metodom protočne citometrije utvrđen je blagi pad udjela živih stanica u ukupnoj staničnoj populaciji nakon tretmana stanica sa 75  $\mu\text{M}$  PCB-em 153 u odnosu na kontrolni uzorak. Kod stanica predinkubiranih s resveratrolom, a zatim tretiranih s PCB-em 153, u odnosu na stanice tretirane samo s PCB-em 153, nije bilo značajnije razlike u distribuciji stanica po pojedinim frakcijama. Udjeli živih, mrtvih, rano i kasno apoptotičnih stanica se nisu značajnije promijenili s obzirom na dodani resveratrol.
12. Nakon provedenih *in vitro* metoda, može se zaključiti da je dioksinu sličan kongener PCB 77, imao izraženije citotoksično djelovanje na CHO-K1 stanice te da je uzrokovao značajniji pad vijabilnosti stanica u odnosu na PCB 153. Oba PCB kongenera su inducirala apoptozu pri čemu je PCB 77 pokazao značajniji apoptotički učinak jer je u većoj mjeri uzrokovao smanjenje udjela živih te povećanje udjela stanica u fazi apoptoze.

13. Predtretman stanica s resveratrolom pri citotoksičnom učinku PCB-a 77 nije pokazao željeni – protektivni učinak, već se ispoljio dodatno negativni učinak. Pri citotoksičnom djelovanju PCB-a 153, resveratrol je pokazao blagi protektivni učinak na proliferaciju i vijabilnost CHO-K1 stanica.

## 6. LITERATURA

Abcam (2019) Introduction to flow cytometry, <<https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>>. Pristupljeno 18. lipnja 2019.

Ahn, J., Lee, H., Kim, S., Ha, T. (2007) Resveratrol inhibits TNF-alpha-induced changes of adipokines in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **364**, 972–977.

Al-Salman, F., Plant, N. (2012) Non-coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs) are direct agonists for the human pregnane-X-receptor and constitutive androstane receptor, and activate target gene expression in a tissue - specific manner. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **263**, 7-13.

Anekonda, T.S. (2006) Resveratrol - a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res. Rev.* **52**, 316-326.

Arnold, D. L., Feeley, M. (2003) Polychlorinated Biphenyls. U: *Food safety: contaminants and toxins* [online] (D' Mello, J. P. F., ured.), CABI Publishing, Edinburgh, str. 125-152, <[https://books.google.hr/books?hl=en&lr=&id=VZ2TAIi4q54C&oi=fnd&pg=PR9&dq=Food+safety:+contaminants+and+toxins+polychlorinated+biphenyls&ots=BXjH51GJ9M&sig=WOVOj1Nw2fu4-w5nD3mxcidBWqc&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Food%20safety%3A%20contaminants%20and%20toxins%20polychlorinated%20biphenyls&f=false](https://books.google.hr/books?hl=en&lr=&id=VZ2TAIi4q54C&oi=fnd&pg=PR9&dq=Food+safety:+contaminants+and+toxins+polychlorinated+biphenyls&ots=BXjH51GJ9M&sig=WOVOj1Nw2fu4-w5nD3mxcidBWqc&redir_esc=y#v=onepage&q=Food%20safety%3A%20contaminants%20and%20toxins%20polychlorinated%20biphenyls&f=false)>. Pristupljeno 28. ožujka 2019.

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.

ATCC (2019) CHO-K1 (CCL-61), <<https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-61.aspx#characteristics>>. Pristupljeno 04. travnja 2019.

Athar, M., Back, J. H., Tang, X., Kim, K. H., Kopelovich, L., Bickers, D. R., Kim, A. L. (2007) Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **224**, 274-283.

ATSDR (2000) Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs), ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia, <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp17.pdf>>. Pristupljeno 28. ožujka 2019.

- Bager, Y., Hemming, H., Flodström, S., Ahlberg, U. G., Wärngård, L. (1995) Interaction of 3,4,5,3',4' – pentachlorobiphenyl and 2,4,5,2',4',5' – hexachlorobiphenyl in promotion of altered hepatic foci in rats. *Pharmacol. Toxicol.* **77**, 149-154.
- Baker, N. A., Karounos, M., English, V., Fang, J., Wei, Y., Stromberg, A., Sunkara, M., Morris, A. J., Swanson, H. I., Cassis, L. A. (2013a) Coplanar polychlorinated biphenyls impair glucose homeostasis in lean C57BL/6 mice and mitigate beneficial effects of weight loss on glucose homeostasis in obese mice. *Environ. Health Persp.* **121**, 105-110.
- Baker, N. A., English, V., Sunkara, M., Morris, A. J., Pearson, K. J., Cassis, L. A. (2013b) Resveratrol protects against polychlorinated biphenyl-mediated impairment of glucose homeostasis in adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* **24**, 2168-2174.
- Barlow, P. M. (2000) Stedman's medical dictionary, MD: Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, str. 113.
- Bastin, J., Djouadi, F. (2016) Resveratrol and myopathy. *Nutrients* **8**, 254.
- Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P. J., Poosala, S., Becker, K. G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., Lakatta, E. G., Le Couteur, D., Shaw, R. J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D. K., de Cabo, R., Sinclair, D. A. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444**, 337–342.
- Beedanagari, S. R., Bebenek, I., Bui, P., Hankinson, O. (2009) Resveratrol inhibits dioxin-induced expression of human CYP1A1 and CYP1B1 by inhibiting recruitment of the aryl hydrocarbon receptor complex and RNA polymerase II to the regulatory regions of the corresponding genes. *Toxicol. Sci.* **110**, 61–67.
- Berberian, I., Chen, L.-C., Robinson, F. R., Glauert, H. P., Chow, C. K., Robertson, L. W. (1995) Effect of dietary retinyl palmitate on the promotion of altered hepatic foci by 3,3',4,4' – tetrachlorobiphenyl and 2,2',4,4',5,5' – hexachlorobiphenyl in rats initiated with diethylnitrosamin. *Carcinogenesis* **16**, 393-398.
- Bergmann, S., Steinert, M. (2015) From single cells to engineered and explanted tissues: new perspectives in bacterial infection biology. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **319**, 1-44.

- Bhatt, J. K., Thomas, S., Nanjan, M. J. (2012) Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Nutr. Res.* **32**, 537–541.
- Bonefeld-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.
- Borja, J., Taleon, D. M., Auresenia, J., Gallardo, S. (2005) Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process. Biochem.* **40**, 1999–2013.
- Buchmann, A., Kunz, W., Wolf, C. R., Oesch, F., Robertson, L. W. (1986) Polychlorinated biphenyls, classified as either phenobarbital-type or 3-methylchloranthrene-type inducers of cytochrome P-450, are both hepatic tumor promoters in diethylnitrosamine-initiated rats. *Cancer Lett.* **32**, 243-253.
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M. E. J., Crozier, A. (2002) Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3337-3340.
- 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**, 784–790.
- Chen, S., Li, J., Zhang, Z., Li, W., Sun, Y., Zhang, Q., Feng, X., Zhu, W. (2012) Effects of resveratrol on the amelioration of insulin resistance in KKAY mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **90**, 237–242.
- Chen, Z. H., Hurh, Y. J., Na, H. K., Kim, J. H., Chun, Y. J., Kim, D. H., Kang, K. S., Cho, M. H., Surh, Y. J. (2004) Resveratrol inhibits TCDD-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1 and catechol estrogen-mediated oxidative DNA damage in cultured human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis* **25**, 2005–2013.
- Chong, J., Poutaraud, A., Huguency, P. (2009) Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.* **177**, 143-155.
- Clothier, R. H. (1995) The FRAME cytotoxicity test (Kenacid Blue). U: *Methods in Molecular Biology – In Vitro Toxicity Testing Protocols* (O'Hare, S., Atterwill, C. K., ured.), Humana Press, Totowa, NJ, str. 109-118.



Correa, P. A., Lin, L., Just, C. L., Hu, D., Hornbuckle, K. C., Schnoor, J. L., Van Aken, B. (2010) The effects of individual PCB congeners on the soil bacterial community structure and the abundance of biphenyl dioxygenase genes. *Environ. Int.* **36**, 901–906.

Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N. (2006) Phenols, polyphenols and tannins: an overview. U: *Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, (Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H., ured.), Blackwell Publishing, Oxford/Ames/Victoria, str. 1-24.

Danial, N. N., Hockenbery, D. M. (2018) Cell Death. U: *Hematology: Basic Principles and Practice*, 7. izd., (Hoffman, R., Benz, E. J. Jr., Silberstein, L. E., Heslop, H. E., Weitz, J. I. Anastasi, J. Abutalib, S. A., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 186-196.

Dean, C. E. Jr., Benjamin, S. A., Chubb, L. S., Tessari, J. D., Keefe, T. J. (2002) Nonadditive hepatic tumor promoting effects by a mixture of two structurally different polychlorinated biphenyls in female rat livers. *Toxicol. Sci.* **66**, 54-61.

Donnez, D., Jeandet, P., Clément, C., Courot, E. (2009) Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends Biotechnol.* **27**, 706-713.

ECACC (2017) Cell line profile, ECACC – European Collection of Authenticated Cell Cultures, <<https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/128263/chok1-cell-line-profile.pdf>>. Pristupljeno 04. travnja 2019.

Echalier, G. (2017) Primary cell cultures of *Drosophila* embryonic cells. U: *Drosophila Cells in Culture*, 2. izd., (Echalier, G., Perrimon, N., Mohr, S. E., ured.), Academic Press, London/San Diego/Cambridge/Oxford, str. 47-59.

Edinger, A. L., Thompson, C. B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 663-669.

EFSA (2005) Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to presence of non dioxin – like polychlorinated biphenyls (PCB) in field and food. EFSA – European Food Safety Authority, Parma, <<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/284>>. Pristupljeno 04. travnja 2019.

Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495-516.

- FAO (1996) Manual on the production and use of live food for aquaculture, FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, <<http://aquacultura.org/upload/files/pdf/library/fao/Manual%20on%20the%20Production%20and%20Use%20of%20Live%20Food%20for%20Aquaculture.pdf>>. Pristupljeno 06. lipnja 2019.
- Ferrari, C. C., Aldana Marcos, H. J., Carmanchahi, P. D., Affanni, J. M. (1998) Olfactory mucosa of the south american armadillo *Chaetophractus villosus*: an ultrastructural study. *Anat. Rec.* **252**, 252–325.
- Fremont, L. (1999) Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* **66**, 663-673.
- Fröhlich, K. U., Madeo, F. (2000) Apoptosis in yeast - a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Lett.* **473**, 6–9.
- Gamper, N., Stockand, J. D., Shapiro, M. S. (2005) The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* **51**, 177-185.
- Gerschenson, L. E., Rotello, R. J. (1992) Apoptosis: a different type of cell death. *FA SEB J.* **6**, 2450-2455.
- Gillis, K., Clor, J., Khan, A., Tyagarajan, K. (2011) Precise and accurate counts and viability measurements across multiple cell lines using the Muse™ Cell Count & Viability Assay. *Merck Millipore Cellutions Newsletter* **4**, 3-7.
- Haag-Grönlund, M., Johansson, N., Fransson-Steen, R., Håkansson, H., Scheu, G., Wärngård, L. (1998) Interactive effects of three structurally different polychlorinated biphenyls in a rat liver tumor promotion bioassay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **152**, 153-165.
- Hengartner, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776.
- Holthoff, J. H., Woodling, K. A., Doerge, D. R., Burns, S. T., Hinson, J. A., Mayeux, P. R. (2010) Resveratrol, a dietary polyphenolic phytoalexin, is a functional scavenger of peroxynitrite. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 1260-1265.
- Huang, C., Ma, W.-Y., Goranson, A., Dong, Z. (1999) Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p-53-dependent pathway. *Carcinogenesis* **20**, 237-242.

IARC (2016) Polychlorinated Biphenyls and Polybrominated Biphenyls. IARC – International Agency for Research on Cancer, Lyon, <<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/08/mono107.pdf>>. Pristupljeno 28. ožujka 2019.

Ishida, T., Takeda, T., Koga, T., Yahata, M., Ike, A., Kuramoto, C., Taketoh, J., Hashiguchi, I., Akamine, A., Ishii, Y., Yamada, H. (2009) Attenuation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity by resveratrol: a comparative study with different routes of administration. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 876–881.

Jacob, F., Nixdorf, S., Hacker, N. F., Heinzelmann-Schwarz, V. A. (2014) Reliable *in vitro* studies require appropriate ovarian cancer cell lines. *J. Ovarian Res.* **7**, 1-10.

Jeon, B. T., Jeong, E. A., Shin, H. J., Lee, Y., Lee, D. H., Kim, H. J., Kang, S. S., Cho, G. J., Choi, W. S., Roh, G. S. (2012) Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes* **61**, 1444–1454.

Joe, A. K., Liu, H., Suzui, M., Vural, M. E., Xiao, D., Weinstein, I. B. (2002) Resveratrol induces growth inhibition, S – phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* **8**, 893-903.

Kandárová, H., Letašiová, S. (2011) Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. *Interdiscip. Toxicol.* **4**, 107-113.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M. (2001) *Principios de neurociencia*, McGraw-Hill Interamericana, Madrid, str. 1045-1047, 1058 –1059.

Kang, L., Heng, W., Yuan, A., Baolin, L., Fang, H. (2010) Resveratrol modulates adipokine expression and improves insulin sensitivity in adipocytes: relative to inhibition of inflammatory responses. *Biochimie.* **92**, 789–796.

Kang, S.-Y., Kim, Y.-G., Kang, S., Lee, H. W., Lee, E. G. (2016) A novel regulatory element (E77) isolated from CHO-K1 genomic DNA enhances stable gene expression in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. J.* **11**, 633-641.

Kang, W., Hong, H. J., Guan, J., Kim, D. G., Yang, E. J., Koh, G., Park, D., Han, C. H., Lee, Y. J., Lee, D. H. (2012) Resveratrol improves insulin signaling in a tissue-specific manner under insulin-resistant conditions only: *in vitro* and *in vivo* experiments in rodents. *Metabolism* **61**, 424–433.

- Kato, Y., Haraguchi, K., Shibahara, T., Shinmura, Y., Masuda, Y., Kimura, R. (2000) The introduction of hepatic microsomal UDP – gluconosyltransferase by the methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Chem-biol. Interact.* **125**, 107-115.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* **26**, 239-257.
- Kerr, J. F. (2002) History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* **181-182**, 471-474.
- Khan, A., Gillis, K., Clor, J., Tyagarajan, K. (2012) Simplified evaluation of apoptosis using the Muse cell analyzer. *Postepy. Biochem.* **58**, 492-496.
- Kimura, Y., Okuda, H., Arichi, S. (1985) Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **834**, 275-278.
- Kimura, Y., Sumiyoshi, M., Baba, K. (2008) Antitumor activities of synthetic and natural stilbenes through antiangiogenic action. *Cancer Sci.* **99**, 2083-2096.
- Kmetič, I., Murati, T., Kvakan, K., Ivanjko, M., Šimić, B. (2012) Poliklorirani bifenili – toksičnost i rizici. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **4**, 71-80.
- Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina-Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. Hig. Rada Toksiko.* **56**, 195-204.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on cell death 2009. *Cell Death Differ.* **16**, 3-11.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., Auwerx, J. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* **127**, 1109–1122.
- Lee, D. H., Steffes, M. W., Sjödin, A., Jones, R. S., Needham, L. L., Jacobs, D. R. Jr. (2010) Low dose of some persistent organic pollutants predicts type 2 diabetes: a nested case-control study. *Environ. Health Persp.* **118**, 1235-1242.

- Lee, D. H., Steffes, M. W., Sjödin, A., Jones, R. S., Needham, L. L., Jacobs, D. R. Jr. (2011) Low dose organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls predict obesity, dyslipidemia, and insulin resistance among people free of diabetes. *PLoS One*. **6**, e15977
- Lin, M., Li, N., Li, X.-M., Huang, K.-S. (2001) Structure and distribution of oligostilbenes. *Acta Pharm. Sin.* **36**, 944–950.
- Likhtenshtein, G. I. (2009) Stilbenes synthesis and applications. U: *Stilbenes Applications in Chemistry, Life Sciences and Material Science* [online], WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, <[https://application.wiley-vch.de/books/sample/3527323880\\_c01.pdf](https://application.wiley-vch.de/books/sample/3527323880_c01.pdf)>. Pristupljeno 28. ožujka 2019.
- Lu, C., Bambang, I. F., Armstrong, J. S., Whiteman, M. (2008) Resveratrol blocks high glucose-induced mitochondrial reactive oxygen species production in bovine aortic endothelial cells: role of phase 2 enzyme induction? *Diabetes Obes. Metab.* **10**, 347–349.
- LUBW (1995) Stoffbericht Polychlorierte Biphenyl (PCB). Landesanstalt für Umweltschutz Baden – Württemberg, Karlsruhe, <[http://www4.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/16796/stoffbericht\\_pcb.pdf?command=downloadContent&filename=stoffbericht\\_pcb.pdf](http://www4.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/16796/stoffbericht_pcb.pdf?command=downloadContent&filename=stoffbericht_pcb.pdf)>. Pristupljeno 28. ožujka 2019.
- Lynn, D. E. (2009) Cell culture. U: *Encyclopedia of Insects*, 2. izd. [online] (Resh, V.H., Cardé, R. T., ured.), Academic Press, Amsterdam/Boston/London/New York/Oxford/Paris/San Diego/San Francisco/Singapore/Sydney/Tokyo, str. 163-165, <<http://www.bio-nica.info/biblioteca/Resh2993EncyclopediaInsects.pdf>>. Pristupljeno 28. ožujka 2019.
- Mardetko, S. (2015) Učinak resveratrola na vijabilnost CHO (*Chinese Hamster Ovary*) – K1 stanica uz ili bez tretmana polikloriranim bifenilima. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Zagreb.
- Matthews, H. B., Dedrick, R. L. (1984) Pharmacokinetics of PCBs. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **24**, 85-103.
- Mattson, M. P. (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 120-129.
- Merck Millipore (2019) Muse Cell Analyzer, <<http://www.merckmillipore.com/muse>>. Pristupljeno 04. lipnja 2019.

Milne, J. C., Lambert, P. D., Schenk, S., Carney, D. P., Smith, J. J., Gagne, D. J., Jin, L., Boss, O., Perni, R. B., Vu, C. B., Bemis, J. E., Xie, R., Disch, J. S., Ng, P. Y., Nunes, J. J., Lynch, A. V., Yang, H., Galonek, H., Israelian, K., Choy, W., Iffland, A., Lavu, S., Medvedik, O., Sinclair, D. A., Olefsky, J. M., Jirousek, M. R., Elliott, P. J., Westphal, C. H. (2007) Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* **450**, 712–716.

Mlynarczuk, J., Wrobel, M. H., Kotwica, J. (2010) Effect of environmental pollutants on oxytocin synthesis and secretion from corpus luteum and on contractions of uterus from pregnant cows. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **247**, 243–249.

Murati, T., Šimić, B., Brozovic, 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.

Navarro-Beltran, E. (1999) *Diccionario terminologico de ciencias medicas*, Masson, Barcelona, str. 91.

Niemann, B., Rohrbach, S. (2016) Metabolically relevant cell biology – role of intracellular organelles for cardiac metabolism. U: *The Scientist's Guide to Cardiac Metabolism*, (Schwarzer, M., Doenst, T., ured.), Academic Press, Amsterdam/ Boston/ Heidelberg/ London/ New York/ Oxford/ Paris/ San Diego/ San Francisco/ Singapore/ Sydney/ Tokyo, str. 19-38.

Olholm, J., Paulsen, S. K., Cullberg, K. B., Richelsen, B., Pedersen, S. B. (2010) Anti-inflammatory effect of resveratrol on adipokine expression and secretion in human adipose tissue explants. *Int. J. Obes.* **34**, 1546–1553.

Oliver, B. G., Baxter, R. M., Lee, H.-B. (1989) Polychlorinated biphenyls. U: Analysis of trace organics in the aquatic environment [online] (Afghan, B. K., Chau, S. Y., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 31-68, <[https://books.google.hr/books?id=Zno-fcS3wFsC&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.hr/books?id=Zno-fcS3wFsC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)>. Pristupljeno 28. ožujka 2019.

Oppenheim, R. W., von Bartheld, C. S. (2008) Programmed cell death and neurotrophic factors. U: *Fundamental neuroscience*, 3. izd. [online] (Squire, L., Berg, D., Bloom, F., Du Lac, S., Ghosh, A., Spitzer, N., ured.), Academic Press, Amsterdam/ Boston/ Heidelberg/ London/ New York/ Oxford/ Paris/ San Diego/ San Francisco/ Singapore/ Sydney/ Tokyo, str.

437-467,

<[https://www.hse.ru/data/2013/10/09/1280379806/Fundamental%20Neuroscience%20\(3rd%20edition\)%202008.pdf](https://www.hse.ru/data/2013/10/09/1280379806/Fundamental%20Neuroscience%20(3rd%20edition)%202008.pdf)>. Pristupljeno 17. ožujka 2019.

Paweletz, N. (2001) Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat. Ev. Mol. Cell Biol.* **2**, 72-75.

Price, D. L., Sisodia, S. S., Borchelt, D. R. (1998) Genetic neurodegenerative diseases: the human illness and transgenic models. *Science* **282**, 1079-1083.

Puck, T. T., Cieciura, S. J., Robinson, A. (1958) Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* **108**, 945– 956.

R&D Systems (2019) Analysis of cell viability using 7-amino actinomycin D. <<https://www.rndsystems.com/resources/protocols/analysis-cell-viability-using-7-amino-actinomycin-d-7-aad>>. Pristupljeno 04.lipnja 2019.

Radojčić Redovniković, I., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2016) Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Croat. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.* **11**, 169-175.

Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J. L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **3**, 1125-1131.

Rivera, L., Morón, R., Zarzuelo, A., Galisteo, M. (2009) Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 1053–1063.

Rosenow, A., Noben, J.-P., Jocken, J., Kallendrusch, S., Fischer-Posovszky, P., Mariman, E. C. M., Renes, J. (2012) Resveratrol-induced changes of the human adipocyte secretion profile. *J. Proteome Res.* **11**, 4733–4743.

RSC (2019a) Chem Spider: 3,3',4,4' – PCB, RSC – Royal Society of Chemistry, Cambridge, <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.33281.html?rid=f9eb7b16-af12-4649-9f01-f6f41edca9da>>. Pristupljeno 05. travnja 2019.

RSC (2019b) Chem Spider: 2,2',4,4',5,5' – PCB, RSC – Royal Society of Chemistry, Cambridge, <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.33983.html?rid=e298bac0-706e-4a6f-b82f-7ff87a51c7a3>>. Pristupljeno 05. travnja 2019.

- Sánchez-Alonso, J. A., López-Aparicio, P., Recio, M. N., Pérez-Albarsanz, M. A. (2003) Apoptosis - mediated neurotoxic potential of a planar (PCB 77) and a nonplanar (PCB 153) polychlorinated biphenyl congeners in neuronal cell cultures. *Toxicol. Lett.* **144**, 337-349.
- Sanders, J. M., Burka, L. T., Smith, C. S., Black, W., James, R., Cunningham, M. L. (2005) Differential expression of CYP1A, 2B and 3A genes in the F344 rat following exposure to a polybrominated diphenyl ether mixture or individual components. *Toxicol. Sci.* **88**, 127-133.
- Schechter, A., Colacino, J., Haffner, D., Patel, K., Opel, M., Pöpke, O., Birnbaum, L. (2010) Perfluorinated compounds, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticide contamination in composite food samples from Dallas, Texas, USA. *Environ. Health Persp.* **118**, 796-802.
- Sharma, S., Chopra, K., Kulkarni, S. K. (2007) Effect of insulin and its combination with resveratrol or curcumin in attenuation of diabetic neuropathic pain: participation of nitric oxide and TNF-alpha. *Phytother. Res.* **21**, 278-283.
- Shen, T., Wang, X.-N., Lou, H.-X. (2009) Natural Stilbenes: an overview. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 916-935.
- Shin, K. J., Bae, S. S., Hwang, Y. A., Seo, J. K., Ryu, S. H., Suh, P. G. (2000) 2,2',4,6,6'-pentachlorobiphenyl induces apoptosis in human monocytic cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **169**, 1-7.
- Siemann, E. H., Creasy, L. L. (1992) Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**, 49-52.
- Singh, N. P., Singh, U. S., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P. S. (2011) Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) protects pregnant mother and fetus from the immunotoxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 209–219.
- Smoliga, J. M., Baur, J. A., Hausenblas, H. A. (2011) Resveratrol and health – a comprehensive review of human clinical trials. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 1129-1141.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., Goldberg, D. M. (1997) Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* **30**, 91-113.
- Sotheeswaran, S., Pasupathy, V. (1993) Distribution of resveratrol oligomers in plants. *Phytochemistry* **32**, 1083-1092.



Syntichaki, P., Tavernarakis, N. (2002) Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO reports* **3**, 604-609.

Szkudelska, K., Nogowski, L., Szkudelski, T. (2009) Resveratrol, a naturally occurring diphenolic compound, affects lipogenesis, lipolysis and the antilipolytic action of insulin in isolated rat adipocytes. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **113**, 17–24.

Tharappel, J. C., Lee, E. Y., Robertson, L. W., Spear, B. T., Glauert, H. P. (2002) Regulation of cell proliferation, apoptosis, and transcription factor activities during the promotion of liver carcinogenesis by polychlorinated biphenyls. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **179**, 172-184.

Thermo Fisher Scientific (2016) Gibco Cell Culture Basics, [Waltham, Massachusetts, <https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>](https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf). Pristupljeno 4. travnja 2019.

Tjio, J. H., Puck, T. T. (1958) [Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture.](#) *J. Exp. Med.* **108**, 259-268.

US EPA (1990) Drinking water criteria document for polychlorinated biphenyls (PCBs), US EPA – US Environmental Protection Agency, Cincinnati.

Van Birgelen, A. P. J. M., Van der Kolk, J., Fase, K. M., Bol, I., Poiger, H., Brouwer, A., Van den Berg, M. (1994a) Toxic potency of 3,3',4,4',5,5' – pentachlorobiphenyl relative to and in combination with 2,3,7,8 – tetrachlorodibenzo – p – dioxin in a subchronic feeding study in the rat. *Toxicol. Appl. Pharm.* **127**, 209-211.

Van Birgelen, A. P. J. M., Van der Kolk, J., Fase, K. M., Bol, I., Poiger, H., Van den Berg, M., Brouwer, A. (1994b) Toxic potency of 2,3,3',4,4',5 – hexachlorobiphenyl relative to and in combination with 2,3,7,8 – tetrachlorodibenzo – p – dioxin in a subchronic feeding study in the rat. *Toxicol. Appl. Pharm.* **126**. 202-213.

Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobé, G. C., Kerr, J. F. (1988) Patterns of cell death. *Methods Achiev. Exp. Pathol.* **13**, 18-54.

Waterhouse, A. L. (2002) Wine phenolics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **957**, 21–36.

Waxman, D. J. (1999) P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR and PPAR. *Arch. Biochem. Biophys.* **369**, 11-23.

Wenzel, E., Somoza, V. (2005) Metabolism and bioavailability of *trans* – resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 472-481.

WHO (2000) Polychlorinated biphenyls (PCBs), WHO – World Health Organization, Regional Office for Europe, Copenhagen, <[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 28. ožujka 2019.

WHO (2003) Polychlorinated biphenyls: human health aspects, WHO – World Health Organization, Geneva, <<https://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad55.pdf>>.

Pristupljeno 04. travnja 2019.

Wurm, F. M. (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1393–1398.

Xu, X., Nagarajan, H., Lewis, N. E., Pan, S., Cai, Z., Liu, X., Chen, W., Xie, M., Wang, W., Hammond, S., Andersen, M. R., Neff, N., Passarelli, B., Koh, W., Fan, H. C., Wang, J., Gui, Y., Lee, K. H., Betenbaugh, M. J., Quake, S. R., Famili, I., Palsson, B. O., Wang, J. (2011) The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat. Biotechnol.* **29**, 735-741.

Yen, G. C., Chen, Y. C., Chang, W. T., Hsu, C. L. (2011) Effects of polyphenolic compounds on tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced changes of adipokines and oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 546–551.

Yoshimura, H., Yoshihara, S., Koga, N., Nagata, K., Wada, I., Kuroki, J., Hokama, Y. (1985) Inductive effect on hepatic enzymes and toxicity of congeners of PCBs and PCDFs. *Environ. Health Persp.* **59**, 113-119.

Zhu, J., Yong, W., Wu, X., Yu, Y., Lv, J., Liu, C., Mao, X., Zhu, Y., Xu, K., Han, X., Liu, C. (2008) Anti-inflammatory effect of resveratrol on TNF- $\alpha$ -induced MCP-1 expression in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 471–477.