

# Protektivni i toksični učinci resveratrola - mehanizmi djelovanja na staničnoj razini

---

Krotin, Sofija

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:907588>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Nutricionizam**

**Sofija Krotin**  
0058220224

**PROTEKTIVNI I TOKSIČNI UČINCI  
RESVERATROLA – MEHANIZMI DJELOVANJA NA  
STANIČNOJ RAZINI**

**ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:** HRZZ projekt IP-2020-02-9162  
„Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija“

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

**Zagreb, 2023.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Nutricionizam

Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za toksikologiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

**Protektivni i toksični učinci resveratrola – mehanizmi djelovanja na staničnoj razini**

**Sofija Krotin, 0058220224**

**Sažetak:** U ovom radu dan je kratki pregled potencijalnih protektivnih i toksičnih učinaka resveratrola, s naglaskom na regulaciji stanične smrti i posljedičnom antikancerogenom djelovanju. U eksperimentalnom dijelu rada ispitana je mogućnost indukcije autofagije resveratrolom u CHO-K1 staničnoj liniji. Nakon 48 sati inkubacije s resveratrolom (5, 20, 50 i 100  $\mu\text{M}$ ) metodom protočne citometrije određen je udio stanica u autofagiji. Utvrđeno je da resveratrol ima statistički značajan učinak na indukciju autofagije pri koncentraciji 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ) u odnosu na kontrolni uzorak (stanice netretirane resveratrolom), dok pri koncentraciji 20  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  nije uzrokovao značajno odstupanje. Provedenim eksperimentalnim istraživanjem preliminarno je utvrđeno da resveratrol, ovisno o primijenjenoj dozi, inducira autofagiju u CHO-K1 staničnoj liniji, a pregled literature ukazao je da resveratrol posjeduje veliki potencijal uporabe kao farmakoterapeutik u prevenciji i liječenju određenih vrsta karcinoma, kardiovaskularnih bolesti, pretilosti i dijabetesa te neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove, Parkinsonove ili Huntingtonove bolesti.

**Ključne riječi:** resveratrol, biološka aktivnost, terapijski potencijal, autofagija, toksičnost

**Rad sadrži:** 35 stranica, 8 slika, 65 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

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

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Marina Miletić

**Datum obrane:** 14. srpnja 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Nutrition

Department of Chemistry and Biochemistry  
Laboratory for Toxicology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Nutrition

**Protective and toxic effects of resveratrol - mechanisms of action at the cellular level**

**Sofija Krotin, 0058220224**

**Abstract:** This study provides an overview of the potential protective and toxic effects of resveratrol, with an emphasis on the regulation of cell death and anticancer activity. In the experimental part of this research autophagy induction by resveratrol was analysed in CHO-K1 cell line. The proportion of cells in autophagy was determined by flow cytometry after 48 hours of incubation with resveratrol (5, 20, 50 and 100  $\mu\text{M}$ ). Compared to the control sample (cells not treated with resveratrol), statistically significant induction of autophagy was detected at concentration of 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ), while at concentrations of 20  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$  resveratrol did not cause a significant alteration. This study preliminarily determined that resveratrol induces autophagy-mediated ovarian (CHO-K1) cell death in dose-dependent manner and literature overview confirmed great potential for use of resveratrol as a pharmacotherapeutic in prevention and treatment of certain types of cancer, cardiovascular diseases, obesity, diabetes and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's or Huntington's disease.

**Keywords:** resveratrol, biological activity, therapeutic potential, autophagy, toxicity

**Thesis contains:** 35 pages, 8 figures, 65 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Ivana Kmetič, PhD, Full Professor

**Technical support and assistance:** Marina Miletic, PhD

**Thesis defended:** July 14<sup>th</sup> 2023

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. RESVERATROL.....	2
2.1.1. KEMIJSKA STRUKTURA I FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA RESVERATROLA.....	2
2.1.2. BIOSINTEZA I PRIRODNI IZVORI RESVERATROLA .....	3
2.1.3. FARMAKOKINETIKA RESVERATROLA .....	4
2.1.3.1. APSORPCIJA I BIODOSTUPNOST RESVERATROLA .....	4
2.1.3.2. DISTRIBUCIJA, METABOLIZAM I IZLUČIVANJE RESVERATROLA .....	5
2.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST RESVERATROLA .....	7
2.2.1. ANTIOKSIDACIJSKI UČINCI RESVERATROLA .....	7
2.2.2. PROTUUPALNI UČINCI RESVERATROLA.....	9
2.2.3. RESVERATROL I STANIČNA SMRT .....	9
2.2.3.1. Apoptoza .....	10
2.2.3.2. Autofagija.....	12
2.2.4. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST RESVERATROLA .....	14
2.3. TERAPEUTSKI UČINCI RESVERATROLA.....	15
2.4. TOKSIČNOST I POTENCIJALNI NEGATIVNI UČINCI RESVERATROLA .....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	18
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. BIOLOŠKI MATERIJAL .....	18
3.1.1.1. CHO-K1 stanična linija.....	18
3.1.2. KEMIJSKE.....	18
3.1.3. OTOPINE I PUFERI .....	18
3.1.4. OPREMA I UREĐAJI .....	21
3.2. METODE RADA .....	21
3.2.1. UZGOJ I ODRŽAVANJE CHO-K1 STANIČNE LINIJE.....	21
3.2.2. ODREĐIVANJE BROJA STANICA <i>TRYPAN BLUE</i> METODOM.....	21
3.2.3. ODREĐIVANJE UČINAKA RESVERATROLA NA VIJABILNOST STANICA I INDUKCIJU AUTOFAGIJE... 22	
3.2.3.1. Priprema stanica za analizu MUSE <sup>®</sup> protočnim citometrom .....	22
3.3. STATISTIČKA OBRADA .....	23

4. REZULTATI I RASPRAVA .....	24
4.1. INDUKCIJA AUTOFAGIJE POTAKNUTA RESVERATROLOM U CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI .....	24
5. ZAKLJUČCI .....	27
6. POPIS LITERATURE.....	28

## 1. UVOD

Polifenoli su najrasprostranjeniji biljni metaboliti značajni za formiranje boje i mirisa, regulaciju fizioloških procesa i poticanje obrambenog mehanizma biljke. U organizmu čovjeka svoje djelotvorne učinke, između ostalog, mogu ispoljiti antioksidacijskim djelovanjem, terapijskim učincima pri bakterijskim, virusnim i gljivičnim infekcijama, aktiviranjem enzima uključenih u detoksikacijske procese, inhibiranjem apsorpcije kolesterola te sprječavanjem rasta neželjenih gastrointestinalnih bakterija.

Polifenolni spojevi dijele se na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane. Uz pterostilben i kombretastatin, resveratrol je najznačajniji predstavnik skupine stilbena. Brojna znanstvena istraživanja usmjerena su na ispitivanje biološke aktivnosti i protektivnih učinaka resveratrola, od kojih se ističu antiglikacijsko, antioksidacijsko, protuupalno, antimikrobno te *anti-aging* djelovanje. Resveratrol privlači mnogo znanstvene pozornosti zbog otkrivenih terapijskih učinaka u prevenciji i liječenju pojedinih bolesti, ali i zbog potencijalnog toksičnog djelovanja koje je tek potrebno detaljnije ispitati (Sales i Resurreccion, 2013).

U ovom radu bit će opisana kemijska struktura, fizikalno-kemijska svojstva, osnovni prirodni izvori te biosinteza i farmakokinetika (apsorpcija, distribucija, metabolizam i ekskrecija) resveratrola. Nadalje, detaljno će biti analizirani mehanizmi biološke aktivnosti spoja, uključujući antioksidacijske, antimikrobne i protuupalne učinke. Naglasak će biti na sposobnosti regulacije stanične smrti te posljedičnoj prevenciji određenih bolesti i ispoljavanju antikancerogenog učinka. Također, pregled do sada otkrivenih terapijskih i toksičnih učinaka resveratrola bit će potkrijepljen rezultatima i zaključcima dobivenih sintezom recentnih znanstvenih istraživanja. Potencijal resveratrola da inducira autofagiju bit će ispitan u eksperimentalnom dijelu rada primjenom metode protočne citometrije na kulturi stanica ovarija kineskog hrčka (CHO-K1 stanična linija).

## 2. TEORIJSKI DIO

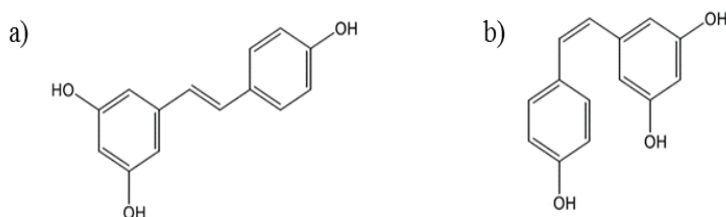
### 2.1. RESVERATROL

Bioaktivni spoj resveratrol, danas poznat kao jedna od glavnih fitokemikalija u crnim vinima, prvi puta je identificiran još 1940. godine u korijenu bijelog kukurijeka (*Veratrum grandiflorum*). Langcake i Pryce (1977) proveli su studiju u kojoj je istražena biosinteza resveratrola i viniferina u vinovoj lozi kao odgovor na UV zračenje i gljivične infekcije. Tek nakon detektiranja visokih koncentracija resveratrola u vinu (Siemann i Creasy, 1992) te otkrića kardioprotektivnog učinka i uloge konzumacije vina u „francuskom paradoksu“, resveratrol postaje predmetom brojnih *in vivo* i *in vitro* istraživanja.

#### 2.1.1. Kemijska struktura i fizikalno-kemijska svojstva resveratrola

Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben;  $C_{14}H_{12}O_3$ , Slika 1) je ne-flavonoidni polifenolni spoj iz skupine stilbena. Kemijska struktura resveratrola sastoji se od dva fenolna prstena, monofenola i difenola, međusobno povezana dvostrukom vezom. Dvostruka veza omogućava postojanje *trans* i *cis* izomernih oblika, pri čemu je *trans* izomer sterički stabilniji i biološki aktivniji (Galiniak i sur., 2019).

Zbog nestabilnih hidroksilnih skupina i C=C dvostruke veze (etilenska jedinica u strukturi) resveratrol je osjetljiv na svjetlost, pH i povišenu temperaturu (Tian i Liu, 2019). *Trans*-resveratrol je bijeli prah čija molarna masa iznosi 228,25 g/mol, a temperatura tališta mu je između 253–255 °C (Aggarwal i sur., 2004). Standardne otopine *trans*-resveratrola u 100 % etanolu i u spremnicima zaštićenima od svjetlosti mogu biti stabilne tri mjeseca. Do izomerizacije u *cis* oblik dolazi nakon izlaganja UV zračenju, fluorescentnom svjetlu i puferima visokog pH. *Cis*-stereoizomer je izuzetno osjetljiv na svjetlo i pri niskom pH izomerizira u *trans*-oblik (Sales i Resurreccion, 2013).



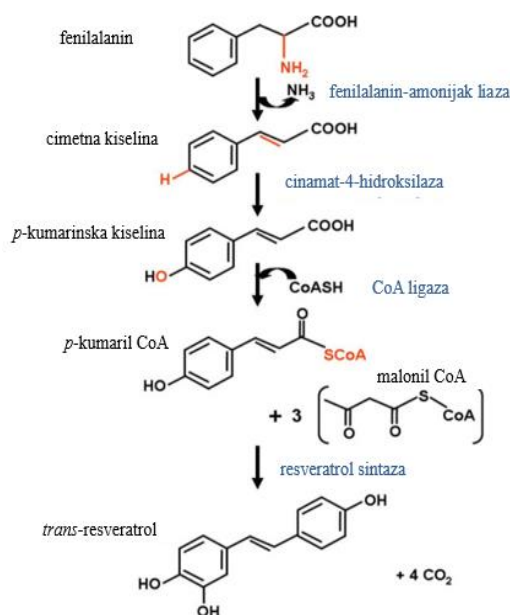
**Slika 1.** Kemijska struktura *cis*- (Z)-resveratrola, (a) i *trans*-(E)-resveratrola (b)  
(prema Tian i Liu, 2019)



### 2.1.2. Biosinteza i prirodni izvori resveratrola

Resveratrol pripada skupini prirodnih fitoaleksina odnosno sekundarnih biljnih metabolita koji nastaju kao odgovor na biotički ili abiotički stres. Biotički stres je rezultat prirodne infekcije ili inokulacije biljnog materijala plijesnima i kvascima. Abiotički stres uzrokovan je nepovoljnim okolišnim uvjetima poput suše, povišenog saliniteta, ekstremnih temperatura, intenzivnog UV zračenja, izlaganjem ultrazvuku te različitim fizikalnim metodama poput narušavanja strukture rezanjem, sjeckanjem ili mljevenjem.

Biljke sintetiziraju resveratrol reakcijom kondenzacije jedne molekule *p*-kumaril CoA i tri molekule malonil CoA (Slika 2). Biosintetski put započinje djelovanjem enzima fenilalanin-amonijak-liaze koja katalizira reakciju oksidacijske deaminacije pri čemu se fenilalanin prevodi u cimetnu kiselinu. Cimetna kiselina se zatim hidroksilira na *para* položaju fenolnog prstena i nastaje *p*-kumarinska kiselina pomoću enzima cinamat-4-hidroksilaze. U reakciji koju katalizira CoA ligaza, CoA se veže na karboksilnu skupinu *p*-kumarinske kiseline i nastaje *p*-kumaril-CoA. Posljednju reakciju kondenzacije molekule *p*-kumaril CoA i tri molekule malonil CoA katalizira stilben sintaza te nastaje *trans*-resveratrol. Pri svakoj sintetiziranoj molekuli *trans*-resveratrola oslobađaju se četiri molekule ugljikovog dioksida. Biosinteza navedenih enzima u biljci aktivira se tek izlaganjem biotičkom ili abiotičkom stresu (Sales i Resurreccion, 2013).



Slika 2. Biosinteza *trans*-resveratrola (prema Soleas i sur., 1997)

Uz grožđe i vino, ostali značajni prirodni izvori resveratrola (Slika 3) su kikiriki, pistacije, bobičasto voće, šipak, rabarbara, soja, kokos i kakao. Postoje i nejestive biljke koje proizvode resveratrol kao i neke vrste trave, ljiljana i kore bora. Široki su rasponi mogućih koncentracija resveratrola u navedenim namirnicama. Najveće koncentracije resveratrola, 50-100 µg/g, nalaze se u kožici i sjemenkama grožđa (Aggarwal i sur., 2004). U crnim vinima raspon koncentracija iznosi od 0,1 do 14,3 mg/L, dok je u bijelim sortama svega 0,1-2,1 mg/L (Kuršvietienė i sur., 2016).



**Slika 3.** Prirodni izvori resveratrola (prema Aggarwal i sur., 2004)

### 2.1.3. Farmakokinetika resveratrola

Potencijalne zdravstvene dobrobiti resveratrola, između ostalog, ovise o učinkovitosti apsorpcije, bioraspoloživosti i putevima biotransformacije. Razumijevanje farmakokinetike nužno je za odabir odgovarajućih doza u ispitivanjima učinkovitosti i biološke aktivnosti spojeva te za identificiranje nastalih metabolita koji mogu ispoljiti drugačije djelovanje u odnosu na ishodni spoj (izmijenjena biološka aktivnost).

#### 2.1.3.1. Apsorpcija i biodostupnost resveratrola

Apsorpcija resveratrola događa se na seroznoj membrani jejunuma mehanizmom pasivne difuzije ili transportom posredovanim nosačem SGLT 1 (engl. *sodium–glucose cotransporter 1*). Zatim, kroz crijevni epitel u krv prolazi transcelularnim putem odnosno kroz enterocite tankog crijeva

(Springer i Moco, 2019).

Istraživanje Goldberga i sur. (2003) uključivalo je ispitivanje koncentracije apsorbiranog resveratrola u serumu nakon konzumiranja uzoraka bijelog vina i soka od bijelog grožđa. U uzorcima krvi uzetima 30 minuta nakon ingestije zabilježena maksimalna koncentracija resveratrola u plazmi iznosila je 2,2  $\mu\text{M}$ . Koncentracija resveratrola se stabilizirala i postigla ravnotežno stanje nakon 90 minuta, a zatim brzo opadala dostižući početnu razinu unutar 4 sata. Sekundarni maksimum zabilježen je nakon 6 sati.

Istraživanje apsorpcije resveratrola uporabom  $^{14}\text{C}$  obilježenog resveratrola pri oralnom unosu od 25 mg ili intravenoznom primjenom (0,2 mg) pokazalo je stopu apsorpcije od najmanje 70 %. Najveća koncentracija u plazmi zabilježena je 1 sat nakon oralne primjene, a drugi maksimum nakon 6 sati kao rezultat enterohepatične cirkulacije konjugiranih metabolita. Kod intravenoznog unosa nije zabilježen drugi vrhunac koncentracije resveratrola. Nakon primjene većih doza od 5 g zabilježene vrijednosti slobodnog resveratrola iznosile su 530 ng/mL (Cottart i sur., 2010).

#### 2.1.3.2. Distribucija, metabolizam i izlučivanje resveratrola

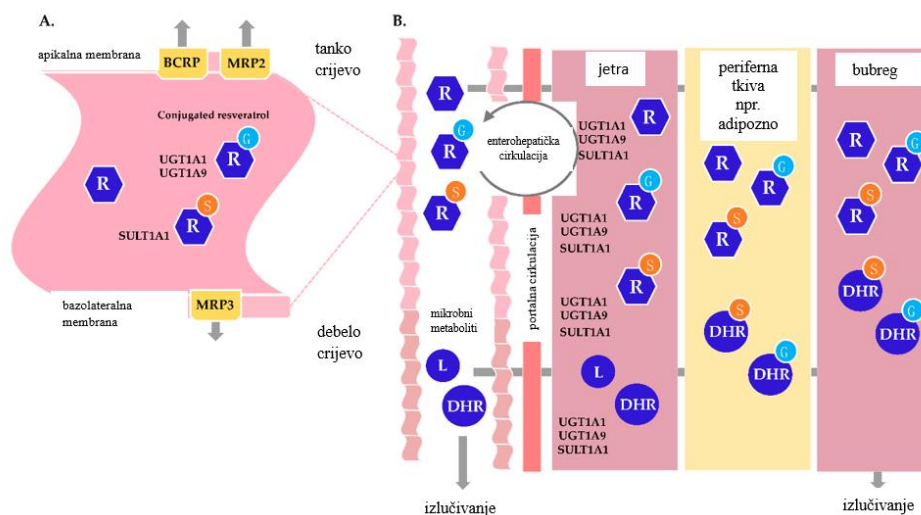
Resveratrol je slabo topljiv u vodi pa se u tijelu distribuira vezanjem na proteine plazme. Može se vezati na lipoproteine, hemoglobin i albumin (Jannin i sur., 2004).

Primijećeno je da se nakon intravenozne primjene resveratrol distribuira u dobro prokrvljena tkiva poput bubrega, jetre, pluća i slezene, a dio se uključi u enterohepatički ciklus (Cottart i sur., 2010). Odmah nakon ingestije resveratrol podliježe biotransformacijskim reakcijama faze I i faze II kojima se prevodi do polarnijih metabolita. Reakcije faze I podrazumijevaju oksidaciju, redukciju i hidrolizu, a faza II obuhvaća konjugaciju sa sulfatom uz enzime sulfotransferaze (SULT) i glukuronidaciju kataliziranu uridin-difosfo-glukuronil transferazama (UGT) (Maier-Salamon i sur., 2006).

Tkivo tankog crijeva sadrži najveću količinu SULT, ponajviše SULT1B1. Reakcijama sulfatiranja uz enzime SULT1A1, SULT1A2 i SULT1A3 nastaju glavni metaboliti *trans*-resveratrol-3-O-4'-O-disulfat, *trans*-resveratrol -4'-O-sulfat i *trans*-resveratrol-3-O-sulfat. Glukuronidaciju resveratrola kataliziraju UGT1A1 i UGT1A9 te nastaju *trans*-resveratrol-4'-O-glukuronid i *trans*-resveratrol-3'-O-glukuronid.

Prevođenje resveratrola glukuronskim i sulfatnim konjugacijama u glavne metabolite odvija se u crijevima, dok sekundarni metaboliti nastaju i u debelom crijevu. Primjerice, dihidro-resveratrol i piceatanol nastaju reakcijama redukcije pomoću bakterijskih enzima crijevne mikroflore pri čemu

dolazi do hidrogenacije alifatske dvostruke veze. 3,4'-dihidroksi-*trans*-stilben i lunularin također su identificirani crijevni metaboliti resveratrola. Bakterije crijevne mikroflore koje sudjeluju u metabolizmu flavonoida predstavljaju rodovi *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Eggertheilla*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (Lukić, 2017). Nakon što resveratrol uđe u gastrointestinalni trakt, brzo se metabolizira te distribuira u različite organe (Slika 4), što posljedično utječe na njegovu bioraspodjelu i aktivnost.



**Slika 4.** Apsorpcija i biotransformacija resveratrola u ljudskom gastrointestinalnom traktu i metabolizam u različitim organima (prema Springer i Moco, 2019)

R – resveratrol, DHR – dihidroresveratrol, G – glukuronidacija, S – sulfatacija, BCRP – engl. *breast cancer resistance protein*, MRP2 – engl. *multidrug resistance-associated protein 2*

U tankom crijevu resveratrol se apsorbira u enterocite gdje podliježe reakcijama sulfatacije i glukuronidacije. Nastali metaboliti - sulfati i glukuronidi resveratrola izlaze iz enterocita preko BCRP i MRP2 transportera na apikalnoj membrani odnosno MRP3 na bazolateralnoj membrani. Mali udio resveratrola ne podliježe reakcijama konjugacije već izlazi iz enterocita u nepromijenjenom obliku preko bazolateralne membrane.

Transporteri odgovorni za distribuciju metabolita resveratrola nalaze se u tankom crijevu, jetri i bubrežima. Iz crijeva metaboliti se mogu apsorbirati u sustavnu cirkulaciju i transportirati s crvenim krvnim stanicama i trombocitima, lipoproteinima niske gustoće ili vezani za proteine plazme. Transportiraju se do jetre ili drugih tkiva gdje se pregrađuju u nove spojeve ili izlučuju iz organizma (Springer i Moco, 2019). Jetra sadržava mnogobrojne enzime poput SULT1A1, UGT1A1 i UGT1A9, koji mogu dalje biotransformirati/konjugirati resveratrol. Iz jetre resveratrol i metaboliti ulaze u sustavnu cirkulaciju te ih apsorbiraju periferna tkiva, poput masnog tkiva.

Metaboliti iz jetre osim u krv, enterohepatičkom recirkulacijom mogu se izlučiti i izravno u žuč. Lučenjem žući u tanko crijevo konjugati postaju podložni hidrolitičkoj razgradnji te dolazi do ponovne resorpcije u jetru pri čemu se proces izlučivanja iz organizma značajno usporava.

Derivati resveratrola se izlučuju putem urina i stolice, no postotak izlučenih spojeva varira ovisno o eksperimentalnim uvjetima korištenim u pojedinim istraživanjima. U urinu ljudi su sulfati, prvenstveno *cis*-resveratrol-4'-sulfat, znatno dominantniji nad glukuronidima. S druge strane, u ljudskim hepatocitima prevladavaju *trans*-resveratrol-4'-O-glukuronid, *trans*-resveratrol-3-O-glukuronid i *cis*-resveratrol-3-O-glukuronid (Santos i sur., 2011). Apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje resveratrola proučavani su <sup>14</sup>C obilježavanjem. Nakon administracije radioaktivno obilježenog resveratrola većina radioaktivnosti pronađena je u urinu, 53,4-84,9 % nakon oralne te 42,3-83,2 % nakon intravenozne (IV) primjene. U fecesu je zabilježena vrlo varijabilna radioaktivnost, 0,3-38,1 % nakon oralno primijenjenih doza i 0,6-22,7 % nakon IV primjene (Cottart i sur., 2010).

## 2.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST RESVERATROLA

U današnje vrijeme brojna su istraživanja iz širokog spektra znanstvenih područja usmjerena na ispitivanje potencijalnih protektivnih učinaka resveratrola i njegovu ulogu u prevenciji i liječenju kroničnih bolesti kao i na izučavanje mogućih mehanizama djelovanja na staničnoj razini kojima je sveobuhvatan cilj uporaba resveratrola u terapijske svrhe. Među do sada otkrivenim povoljnim učincima ističu se antioksidacijsko, protuupalno, antimikrobno djelovanje te regulacija stanične smrti.

### 2.2.1. Antioksidacijski učinci resveratrola

Snažna antioksidacijska aktivnost resveratrola očituje se povećanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima, „hvatanjem“ slobodnih radikala ili inhibicijom prekomjernog stvaranja ROS (engl. *reactive oxygen species*). Na Slici 5 prikazani su neki od antioksidacijskih učinaka kojima resveratrol pridonosi smanjenju oksidacijskog stresa i prevenciji razvoja bolesti poput dijabetesa, karcinoma, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti (Liguori i sur., 2018).

Antioksidacijski potencijal resveratrola pripisuje se specifičnoj kemijskoj strukturi odnosno prisutnosti aromatskih prstenova, dvostruke veze i tri hidroksilne skupine. Od posebnog značaja je hidroksilna skupina na poziciji 4' prstena B kao puno reaktivnija u odnosu na 3 i 5 hidroksilne

skupine na prstenu A. Eksperimentalne studije potvrdile su da uklanjanje hidroksilnih skupina ili njihova supstitucija s -OCH<sub>3</sub> skupinama dovodi do gubitka antioksidacijskih svojstava spoja.

Resveratrol učinkovito „hvata“ hidroksilne te strukturom slične peroksilne radikale lipida i proteina. Također, može zaštititi stanice i tkiva od štetnog djelovanja dušikovog oksida i nitrozilacije proteinskih ostataka uklanjanjem reaktivnih dušikovih vrsta (engl. *reactive nitrogen species*, RNS). „Hvatanjem“ radikala i lipidnih peroksida resveratrol može prekinuti proces peroksidacije lipida i oksidaciju lipoproteina niske gustoće (engl. *low-density lipoprotein*, LDL). Posljedično, spriječeno je oštećenje DNA molekule, a povećana je razina glutationa kao inhibitora stvaranja novih slobodnih radikala.

U uvjetima homeostaze, Nrf2 (engl. *Nuclear erythroid 2 – related factor*) se nakuplja u citoplazmi i tvori kompleks s inhibitornim proteinom Keap1 (engl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*). Kao odgovor na oksidacijski stres, resveratrol potiče disociranje Nrf2 iz kompleksa s Keap1. Povećanje ekspresije Nrf2 aktivira antioksidacijske enzime uključujući superoksid dismutaze, katalaze, glutation sintetaze i glutation reduktaze. Enzimi eliminiraju ROS iz stanice i time smanjuju rizik od izazivanja upalnih procesa, disregulacije mitohondrija ili smrti stanice (Gerszon i sur., 2014).

Mokni i sur. (2007) utvrdili su da intraperitonealna primjena resveratrola u zdravih štakora rezultira povećanom ekspresijom endogenih antioksidacijskih enzima u mozgu. Sličan učinak resveratrola primijećen je u mišjim hipokampalnim stanicama (HT22) tretiranim visokim koncentracijama glutamata, što je uzrokovalo povećani oksidacijski stres pri čemu je dokazano je da resveratrol inducira ekspresiju mitohondrijske superoksid dismutaze aktivacijom PI3K (fosfatidilinozitol-3-kinaza) /AKT (proteinska kinaza B) i GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -katenin signalnog puta (engl. *glycogen synthase kinase-3 $\beta$*  - GSK-3 $\beta$  ).

Uz antioksidacijske, *in vitro* studije ukazuju i na potencijalne prooksidacijske učinke. Ovisno o koncentraciji i redoks stanju stanice resveratrol može potaknuti stvaranje ROS-a. Zbog posljedičnog oksidacijskog oštećenja DNA resveratrol bi se mogao koristiti za tretiranje zaostalih tumorskih stanica nakon kirurškog odstranjivanja određenih vrsta karcinoma (Lukić, 2017).

### 2.2.2. Protuupalni učinci resveratrola

Rezultati brojnih *in vivo* i *in vitro* znanstvenih istraživanja upućuju na povezanost protuupalnih svojstva resveratrola s regulacijom signalnih puteva u stanicama te smanjenjem razine različitih protuupalnih čimbenika (Slika 5).

Najznačajnijim učinkom smatra se inhibicija puta arahidonske kiseline, konkretnije djelovanje na aktivnost ciklooksigenaze 2 (COX2). COX2 je enzim koji katalizira sintezu prostaglandina i tromboksana A2 iz arahidonske kiseline (Chandrasekharan i sur., 2002), a regulirana je transkripcijskim faktorima NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor kappa B*) i AP-1 (engl. *activator protein-1*). Djelovanje resveratrola očituje se izravnom inhibicijom aktivnosti COX2 ili indirektno djelovanjem na ekspresiju NF- $\kappa$ B i potiskivanjem transkripcije COX-2 gena (Subbaramaiah i sur., 1998).

Istraživanjem Li i sur. (2018) otkriveno je da povoljne posljedice inhibicije ekspresije COX-2 mogu biti daleko opsežnije odnosno da primjena resveratrola u određenoj koncentraciji može suzbiti humani kolorektalni rak i proliferaciju epitelnih stanica karcinoma pluća. Protuupalno djelovanje resveratrola koje rezultira prevencijom ili zaustavljanjem napredovanja kroničnih bolesti povezanih s upalnim procesima očituje se regulacijom aktivnosti stanica koje sudjeluju u imunološkom odgovoru i sinteze proupalnih citokina. Primjerice, zabilježeno je da resveratrol suzbija aktivnost T- i B-stanica te da limfocite suprimira u sintezi IL-2 (interleukin-2) i IFN (interferon) kao i makrofage u sintezi TNF- $\alpha$  (eng. *tumor necrosis factor alpha*) ili IL-12 (Gao i sur., 2001).

U znanstvenoj studiji Zhu i sur. (2011) uočeno je da resveratrol učinkovito inhibira upalne procese u fibroblastima NIH/3T3. Mehanizam djelovanja resveratrola u ovom slučaju je ostvaren putem aktivacije SIRT1 koja značajno smanjuje TNF- $\alpha$  inducirano povećanje MMP-9 (metaloproteinaza-9), IL-6 (interleukin 6), iNOS (inducibilna dušik-oksidi sintetaza) i IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ). Primjenom određenih biološki aktivnih spojeva, negativni učinci toplinskog stresa poput poticanja proizvodnje ROS-a, poremećaja antioksidacijskog sustava i oštećenja imunoloških organa *in vivo* mogu se umanjiti. Resveratrol ublažava štetne učinke toplinskog stresa obnavljanjem funkcije oštećene crijevne barijere, mijenjanjem ekspresije imunoglobulina A, uspostavljanjem redoks statusa i inhibicijom apoptoze (Zhang i sur., 2018).

### 2.2.3. Resveratrol i stanična smrt

Stanično umiranje je temeljni biološki proces uključen u mehanizme koji kontroliraju razvoj,

homeostazu i imunološku regulaciju višestaničnih organizama (Miletić i sur., 2021). Stanica se smatra mrtvom ako je narušen integritet stanične membrane i/ili potpuno fragmentirana jezgra stanice i/ili je susjedna stanica fagocitirala stanične fragmente umiruće stanice. Treba razlikovati programiranu (reguliranu) staničnu smrt, koja obuhvaća procese apoptoze i autofagije, od slučajne stanične smrti - nekroze (Kroemer i sur., 2009).

Brojna istraživanja dokazala su da resveratrol kao spoj biljnog podrijetla ima dvojaku ulogu u terapiji karcinoma. Dokazano je da štiti različite vrste stanica i tkiva od toksičnosti izazvane zračenjem ili kemoterapijom, no također može izazvati oštećenja DNA i stimulirati signalne putove stanične smrti u malignim stanicama (Fu i sur., 2021). Postoji niz mehanizama kojima resveratrol može potaknuti autofagiju i apoptozu (Slika 5) te različiti uvjeti u stanici o kojima ovisi hoće li krajnji ishod djelovanja biti povoljan ili nepovoljan po zdravlje pojedinca.

#### 2.2.3.1. Apoptoza

Apoptozu ili programiranu staničnu smrt tipa I karakterizira skupljanje stanice, fragmentacija kromosomske DNA, kondenzacija kromatina, „pupanje“ membrane i stvaranje apoptotskih tjelešaca koja se razgrađuju uz pomoć lizosoma. Proteolitički enzimi kaspaze odgovorni su za cijepanje staničnih proteina te biokemijske i morfološke promjene u stanici tijekom procesa apoptoze. Postoje pokretačke ili inicijatorske, primjerice kaspaze-8, -9, -10, -11, te izvršne ili efektorske kaspaze poput kaspaza-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12, -13 (Fu i sur., 2021). Putevi izvršavanja apoptoze uključuju vanjski (put receptora smrti) ili ekstrinzični te unutrašnji (mitohondrijski) ili intrinzični put. Izvanstanični signal kojim započinje ekstrinzični put nastaje povezivanjem TNF i receptora smrti TNFR (engl. *tumor necrosis factor receptor*) na staničnoj membrani. Receptori smrti sadrže unutarstaničnu domenu smrti (DD - engl. *death domain*) koja je važna za prijenos signala koji inducira apoptozu. Adaptorski proteini (FADD (engl. *Fas associated death domain*) /TRADD (engl. *TNFR1-associated DD containing protein*)) regrutiraju inicijatorske prokaspaze -8 i/ili -10 na kompleksu receptora i DD kako bi se formirao signalni kompleks koji inducira smrt (DISC - engl. *death-inducible signalling complex*), nakon čega slijedi aktivacija kaspaza -8 i -3. Razina aktivacije kaspaze -8 upravlja daljnjim slijedom zbivanja. Ukoliko je razina dovoljno visoka, dolazi do izravne aktivacije kaspaze -3 i posljedične smrti stanice.

Intrinzični put apoptoze aktivira se kao odgovor na virusne infekcije, hipoksiju, vrlo visoke koncentracije citosolnog  $Ca^{2+}$  ili izloženost zračenju. Stanični stres remeti propusnost membrane



mitochondrija i dolazi do oslobađanja apoptogenih proteina iz međumembranskog prostora u citoplazmu. Citokrom c u interakciji s APAF1 (engl. *apoptotic protease activating factor 1*) tvori kompleks apoptosom koji aktivira kaspazu-9, a zatim i kaspazu-3 (Jang i sur., 2022a). Apoptoza je prvenstveno protektivni proces za uklanjanje mrtvih i nepovratno oštećenih stanica te obrambeni mehanizam pri imunološkim reakcijama. No, narušavanje ravnoteže između apoptoze (npr. nekontrolirana apoptoza) i stanične proliferacije u pojedinim tkivima može dovesti do razvoja bolesti poput karcinoma (Jang i sur., 2022b).

Indukcija apoptoze prvenstveno ovisi o ekspresiji pro/anti-apoptotskih gena poput *TP53*, *BAX* (engl. *Bcl-2-associated X protein*) i *BCL-2* (engl. *B-cell lymphoma 2*) (Khodamoradi i sur., 2020). Sukladno tome, resveratrol potiče apoptozu djelovanjem na ekspresiju gena ili može utjecati na aktivnost enzima poput protein kinaze B i sirtuina. Mehanizmi kojima p53 može djelovati na kancerogenezu su aktivacija transkripcije proapoptotičkih gena koji kodiraju za proteine Noxa (engl. *phorbol-12-myristate-13 acetate-induced protein 1*), Bax ili Puma (engl. *p53-upregulated modulator of apoptosis*), aktivacija kaspaza supresijom antiapoptotskih gena te indukcija ekspresije gena poput *FAS*, *BID*, *DR5* i *APAF-1* čiji proteini pokreću apoptozu (Ou i sur., 2022).

Rezultati istraživanja na stanicama kolorektalnog karcinoma potvrdili su da resveratrol pojačava ekspresiju *TP53* i proapoptotičkih gena *BAX* i *PUMA* (Liu i sur., 2019). Istraživanje provedeno na stanicama raka pluća A549 tretiranim s 25, 50, 100 ili 200  $\mu\text{M}$  resveratrola te inkubiranim na 37 °C 24, 48 ili 72 h rezultiralo je podacima o smanjenoj vijabilnosti stanica te povećanim brojem apoptotskih stanica. Također, provedena inkubacija stanica A549 s PFT- $\alpha$  (engl. *pifithrin- $\alpha$* ) kao inhibitorom *TP53* smanjila je ekspresiju proapoptotičkog gena *BAX* i povećala ekspresiju antiapoptotičkog gena *BCL-2*, čime je potvrđeno da je put p53 uključen u apoptozu induciranu resveratrolom (Fan i sur., 2020).

Nadalje, resveratrol može djelovati na aktivnost fosfoinozimid 3-kinaze (PI3K)/Akt signalnog puta. Akt ili protein kinaza B (PKB) je serin/treonin kinaza važna za regulaciju apoptoze, proliferacije stanica, metabolizam glikogena (Revathidevi i Munirajan, 2019) te održavanje funkcije signalnog puta PI3K/Akt. S obzirom da je u stanicama raka pluća, jajnika i gušterače zabilježena prekomjerna aktivacija Akt, regulacija aktivnosti tog proteina može biti potencijalan način prevencije ili liječenja karcinoma (Song i sur., 2019).

U istraživanju Wang i sur. (2016) stanice raka prostate PC-3 tretirane su koncentracijama resveratrola od 12,5; 25 ili 50  $\mu\text{M}$ . Zabilježeno je da resveratrol potiče apoptozu tako što inhibira fosforilaciju proteina kinaze B i smanjuje ekspresiju *PI3K*, pri čemu je najjača inhibicija uočena

kod uzoraka tretiranih najvišom koncentracijom resveratrola. Osim toga, posljedica inhibiranog PI3K/Akt signalnog puta je blokiranje epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) kao ključnog mehanizma rezistencije tumorskih stanica. U stanicama kolorektalnog raka DLD1 i HCT15 nakon tretmana resveratrolom (10, 20, 30 ili 40  $\mu$ M) zabilježena je inhibicija stanične proliferacije kao posljedica indukcije apoptoze i zaustavljanja staničnog ciklusa u G1 fazi. Aplikacija resveratrola rezultirala je smanjenjem ekspresije gena koji kodiraju za ciklin D1, ciklin E2 i Bcl-2, ali dovelo do povećanja ekspresije Bax i p53 (Li i sur., 2019).

Konačno, resveratrol može regulirati aktivnost enzima sirtuina-1 (Sirt-1) koji katalizira reakcije deacetilacije supstrata značajnih za brojne stanične procese, uključujući onkogenezu. Povećanje ekspresije Sirt-1 također može dovesti do supresije *EMT*, *PI3K/Akt* te aktivacije *TP53* (Fu i sur., 2021).

Istraživanje Chao i sur. (2017) je pokazalo da tretman stanica hondrosarkoma JJ012 resveratrolom (50  $\mu$ M) povećava aktivnost enzima Sirt1 odgovornog za deacetilaciju p65 podjedinice NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) kompleksa. Posljedično, potaknut je proces apoptoze te je zabilježena smanjena vijabilnost stanica. Rezultati su potvrđeni istraživanjem na stanicama hondrosarkoma SW1353 gdje je tretman resveratrolom pri koncentracijama 2, 5, 10, 25, 50 ili 100  $\mu$ mol/L rezultirao povećanjem aktivnosti *SIRT1* i *BAX*, indukcijom apoptoze, inhibicijom proliferacije i smanjenom vijabilnošću stanica (Jin i sur., 2016).

#### 2.2.3.2. Autofagija

Autofagija ili programirana stanična smrt tipa II je katabolički proces kojim se neželjen citoplazmatski materijal prenosi u lizosome i razgrađuje (Jang i sur., 2022c). „Recikliranjem“ oštećenih makromolekula i organela, eukariotske stanice osiguravaju hranjive tvari i energiju potrebnu za održavanje metaboličke ravnoteže i vitalnih funkcija.

S obzirom na način transporta staničnog sadržaja do lizosoma postoje tri oblika autofagije: makroautofagija, mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonom (engl. *chaperone-mediated autophagy*, CMA). Autofagija se često poistovjećuje s izrazom makroautofagija s obzirom da je upravo taj mehanizam najbolje istražen. Makroautofagija je proces kojim stanice stvaraju vezikule autofosome koji zatim stapanjem s lizosomima tvore autolizosome kao konačnu formu vezikula u kojima dolazi do razgradnje staničnog materijala (Zhao i sur., 2021). Mehanizam mikroautofagije je znatno slabije istražen u odnosu na ostale oblike autofagije. Proces razgradnje

ne podrazumijeva stvaranje novih unutarstaničnih vezikula, već oštećene organele ili makromolekule ulaze u lizosom invaginacijom ili deformacijom membrane lizosoma. Autofagija posredovana šaperonom je visoko selektivan proces autofagije kojim se ne razgrađuju organeli nego samo topivi citoplazmatski proteini. Transport supstrata za razgradnju se odvija preko protein-translokacijskog kompleksa na lizosomalnoj membrani i ne zahtijeva sintezu unutastaničnih vezikula. Selektivni odabir supstrata vrši se putem šaperon proteina koji na temelju slijeda određenih aminokiselina prepoznaju proteine pogodne za ovaj oblik autofagije (Jang i sur., 2022c).

Osim što je prirodno prisutan proces za održavanje homeostaze u stanici, autofagija može biti izazvana stresnim uvjetima poput hipoksije, gladovanja ili infekcije patogenima. Također, nedovoljna ili pretjerana autofagija može uzrokovati staničnu smrt ili stimulirati signalne putove za pokretanje apoptoze. Na taj način nepovoljno djeluje na zdravstveno stanje organizma i pridonosi patofiziologiji kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti (Mizushima i sur., 2008). Uloga autofagije kao tumor supresora ili tumor promotora prije svega ovisi o stadiju karcinoma. U ranoj kancerogenezi, autofagija inhibira inicijaciju i napredovanje tumora, dok u terminalnoj fazi potiče rast tumora i razvoj metastaza (Li i sur., 2020).

mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*, ciljna molekula rapamicina u sisavaca), serin/treoninska kinaza, je središnji inhibitor autofagije u stanicama sisavaca. S obzirom da je u mnogim vrstama kanceroznih stanica zabilježena abnormalna regulacija PI3K/AKT/mTOR signalnog puta (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway*), mTOR može biti meta za liječenje karcinoma.

Pretpostavlja se da resveratrol djeluje na metabolizam stanica raka tako što inducira stanje slično nedostatku hranjivih tvari i time potiče stanice na autofagiju (Fu i sur., 2021). AMPK (engl. *5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*) u fosforiliranom i aktiviranom obliku može potaknuti autofagiju. Primjena resveratrola (100  $\mu$ M) na stanicama multiplog mijeloma izazvala je pojačanu fosforilaciju AMPK $\alpha$ , smanjila fosforilaciju mTOR-a i potaknula autofagiju, a u konačnici i apoptozu (Ma i sur., 2021).

Kod stanica raka usne šupljine tretiranih resveratrolom u koncentracijama 25, 50, 75, 100 i 200  $\mu$ M zabilježena je indukcija autofagije poticanjem fosforilacije AMPK $\alpha$  odnosno inhibiranjem fosforilacije Akt i mTOR (Chang i sur., 2017).

Istraživanjem Zhang i sur. (2015) zabilježeno je da primjenom resveratrola u koncentraciji 50  $\mu$ M

tijekom 96 h na A549 stanicama adenokarcinoma pluća dolazi do indukcije autofagije i autofagijom posredovane degradacije proteina p62. Abnormalno nakupljanje p62 smatra se rizičnim faktorom za razvoj hepatocelularnih karcinoma i može dovesti do aktivacije čimbenika karcinogeneze poput Nrf2, mTOR i dr. Resveratrol induciranjem autofagije potiče razgradnju p62 što posljedično dovodi do aktivacije kaspaze-8 i započinjanja apoptoze.

#### 2.2.4. Antimikrobna aktivnost resveratrola

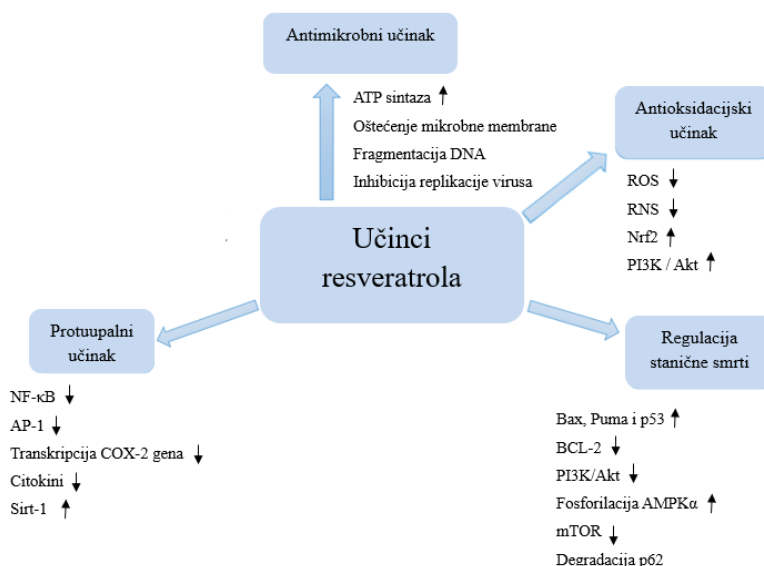
Resveratrol ima širok raspon antibakterijskog djelovanja što je dokazano i na gram-pozitivnim i gram-negativnim patogenim bakterijama. Može inhibirati rast određenih bakterijskih vrsta, *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae*, pri koncentracijama <100 µg/mL, dok su za inhibiciju *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* potrebne koncentracije do 200 µg/mL. Na Slici 5 navedeni su neki od mehanizama djelovanja resveratrola koji rezultiraju antibakterijskim učincima, uključujući inhibiciju oksidativne fosforilacije, indukciju fragmentacije DNA te oštećenje membrane bakterijske stanice. Unatoč brojnim otkrivenim učincima, mehanizme inhibicije bakterijskog rasta tek je potrebno u potpunosti razjasniti (Vestergaard i Ingmer, 2019).

Istraživanje aseptične učinkovitosti sterilne fiziološke otopine s 1 % resveratrola pri zacjeljivanju kožnih rana pokazalo je bolje rezultate u usporedbi s komercijalnim mastima koje sadrže antimikrobni - kloramfenikol i antifungalni - klotrimazol kao aktivne tvari (Shevelev i sur., 2020). Resveratrol ublažava upalni odgovor kože na infekciju. Ovaj učinak resveratrola je posebno važan s obzirom na činjenicu da je koža u više od 90 % bolesnika s atopijskim dermatitisom kolonizirana sa *Staphylococcus aureus* (Bolko Seljak i Gašperlin, 2023).

Resveratrol također pokazuje snažnu antifungalnu i antivirusnu aktivnost. Pri koncentraciji 25– 50 µg/mL učinkovito djeluje protiv *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* i *Microsporum gypseum* (Chan, 2002).

Otkriveno je da resveratrol djeluje protiv virusa hepatitisa C, HSV-a (engl. *herpes simplex virus*), virusa *varicella zoster*, virusa gripe, HIV-a (engl. *human immunodeficiency virus*), virusa afričke svinjske kuge te virusa pačje kuge. Antivirusni mehanizmi djelovanja podrazumijevaju inhibiciju replikacije virusa, inhibiciju sinteze nukleinskih kiselina i proteina, inhibiciju transkripcijskih

puteva te inhibiciju ekspresije gena (Bostanghadiri i sur., 2017).



**Slika 5.** Mogući protektivni učinci resveratrola (*prema* Bolko Seljak i Gašperlin, 2023)

### 2.3. TERAPEUTSKI UČINCI RESVERATROLA

Brojne eksperimentalne *in vivo* i *in vitro* studije istražuju ulogu resveratrola u prevenciji ili terapiji kardiovaskularnih, upalnih, metaboličkih, neuroloških, kožnih te raznih zaraznih bolesti. Pretpostavlja se da terapeutske učinke proizlaze iz različitih regulacijskih mehanizama i mogućnosti moduliranja staničnih i molekularnih medijatora upalnog odgovora. Iako su mnoga preklinička istraživanja dala obećavajuće rezultate, ishod pojedinih kliničkih ispitivanja liječenja resveratrolom kod ljudi bio je razočaravajuć. Mnoga pitanja o protektivnim učincima resveratrola još su neodgovorena, a poteškoće poput slabe bioraspoloživosti i nepreciznog doziranja još nerazriješene (Malaguarnera, 2019). Potencijalni terapeutske učinci resveratrola očituju se u liječenju kardiovaskularnih, neurodegenerativnih bolesti i dijabetesa.

Kardioprotektivni učinci resveratrola zabilježeni na laboratorijskim životinjskim modelima podrazumijevaju zaštitu krvnih žila od upale, oksidacije i stvaranja tromba, poboljšanje metaboličkog kapaciteta, povećanu sintezu dušikovog oksida, suzbijanje proliferacije VSMC (engl. *vascular smooth muscle cells*) te sprječavanje oksidacije trombocita. Kardioprotektivno djelovanje također može biti rezultat antioksidacijskih i protuupalnih učinaka. Primjerice, resveratrol sprječava oksidaciju LDL-a i inhibira aktivnost COX-1 te tako direktno regulira

povišene koncentracije LDL-a i proupalnih eikozanoida, prepoznatih rizičnih faktora za pojavu kardiovaskularnih bolesti (Breuss i sur., 2019).

Do sada provedene kliničke studije na ljudima značajno se razlikuju po vremenskom periodu trajanja i prema korištenim dozama resveratrola (5-5 000 mg/dan). Fogacci i sur. (2018) na temelju provedene *meta*-analize 17 randomiziranih kontroliranih ispitivanja zaključili su da je upotreba resveratrola s ciljem snižavanja krvnog tlaka i sveukupnog poboljšanja kardiovaskularnog zdravlja moguća ukoliko se primjenjuje u visokim dozama ( $\geq 300$  mg/dan) te kod pacijenata s dijabetesom. Primjena doza nižih od 300 mg/dan nije značajno utjecala vrijednost sistoličkog niti dijastoličkog tlaka.

Uloga resveratrola u kontroli neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove, Huntingtonove i Parkinsonove bolesti može se objasniti metaboličkim procesom stvaranja konjugata glukuronida i omogućenog prolaska kroz krvno-moždanu barijeru. Primijećeno je da resveratrol i pojedini derivati s većom biodostupnosti, na primjer scirpus A i  $\epsilon$ -viniferin glukozidi, djeluju neuroprotektivno u rasponu doza od 10 do 100  $\mu$ M, no precizna koncentracija potrebna za ispoljavanje tog učinka još nije definirana (Zhang i sur., 2021).

Terapeutski učinci resveratrola ispituju se i zbog velikog potencijala u liječenju ili terapiji kronične bolesti *diabetes mellitus* ili šećerne bolesti. Dokazano je da resveratrol povoljno djeluje na izlučivanje inzulina i kontrolu glikemije, štiti  $\beta$ -stanice gušterače i smanjuje inzulinsku rezistenciju. Antidijabetski učinci povezuju se s ulogom u regulaciji ekspresije odnosno aktivnosti AMPK i SIRT1 te sinergijskim djelovanjem antioksidacijskih i protuupalnih učinaka resveratrola. Konkretno, antidijabetsko djelovanje uočeno je na životinjskim modelima, a pojedine preliminarne studije na ljudima oboljelima od dijabetesa tipa 2 su potvrdile povoljan utjecaj na zdravlje, dok je za dijabetes tipa 1 do sada potvrđena samo učinkovita primjena resveratrola kao dodatka uobičajenoj terapiji lijekovima. Nije utvrđena točna i sigurna koncentracija resveratrola potrebna za ispoljavanje navedenih učinka, no doze više od 0,5 g/dan se ne preporučuju, dok se doze do 0,5 g/dan i pri dugotrajnom unosu smatraju prihvatljivima i mogu dovesti samo do blagih i reverzibilnih nuspojava (Szkudelski i Szkudelska, 2014).

#### **2.4. TOKSIČNOST I POTENCIJALNI NEGATIVNI UČINCI RESVERATROLA**

Resveratrol je predmet mnogobrojnih znanstvenih istraživanja zbog širokog raspona povoljnih učinaka na ljudsko zdravlje, no također ispituju se i njegovi potencijalni negativni i toksični učinci. Resveratrol primijenjen u dozi od 1000 mg/dan ili višoj indirektno djeluje na metabolizam

pojedinih lijekova tako što smanjuje ili pojačava ekspresiju transportera lijeka ili CYP450 enzima (inhibira CYP3A4, CYP2C9, CYP2D6, aktivira CYP1A2). Poticanjem apsorpcije metotreksata u crijevima i inhibiranjem prijenosnika kojima se eliminira iz organizma, resveratrol može značajno povećati rizik od hepatotoksičnosti. S druge strane, oslabljeni učinci lijekova primijećeni su za antihistaminike, lijekove za srčanu aritmiju, imunosupresive i dr. (Shaito i sur., 2020). Posadino i sur. (2015) na humanim endotelnim stanicama su ispitali učinke primjene različitih koncentracija resveratrola. Nasuprot antioksidacijskom djelovanju pri nižim dozama (0,5  $\mu$ M), određeno je da resveratrol u koncentraciji od 25  $\mu$ M djeluje na potpuno suprotan način. Povećanje oksidacijskog stresa rezultiralo je gubitkom mitohondrijskog membranskog potencijala, oštećenjem mitohondrija i induciralo staničnu smrt. Potencijalno toksično djelovanje može se pripisati i pojedinim metabolitima resveratrola. Primjerice, *o*-kinoni mogu inducirati oksidacijski stres i inhibirati enzime citokrom P450 (Bolton i Dunlap, 2017). Uz navedeno, važno je spomenuti izostanak kardioprotektivnih učinaka pri dozi od 1000 mg/dan i povišenje vrijednosti LDL-a kao biomarkera za razvoj kardiovaskularnih bolesti (Mankowski i sur., 2020) te induciranje stanične smrti i oksidacijskog stresa u zdravim stanicama. Također, resveratrol (300 mg/mL, 30 mg/kg) može uzrokovati smanjenje broja bijelih krvnih stanica, razine IL-6 ili TNF u plazmi, a pri dozi 2-5 g/dan dovesti do gastrointestinalnih smetnji poput blagog proljeva, mučnine ili analnog pruritusa (Wang i sur., 2018; Shaito i sur., 2020). Nedovoljno razjašnjeni mehanizmi toksičnog djelovanja i učestala konzumacija dodataka prehrani koji sadrže resveratrol u budućnosti bi mogli izazvati ozbiljan javnozdravstveni problem. Prema dosadašnjim istraživanjima moglo bi se zaključiti da je za izazivanje toksičnih učinaka nužna primjena ekstremno visokih doza resveratrola, no ipak postoji još niz prepreka koje prethode utvrđivanju te hipoteze. Prije svega, važno je naglasiti da doze resveratrola (iznad 25  $\mu$ M) koje se smatraju toksičnim u *in vitro* uvjetima možda neće djelovati jednako kada se primijene *in vivo* te se optimalna učinkovita doza za ljudsku suplementaciju tek treba odrediti. Osim o dozi, kontradiktorni rezultati mogu ovisiti o bioraspoloživosti, farmakokinetici i načinu primjene resveratrola te dobi, spolu, načinu života i različitostima u crijevnom mikrobiomu pojedinca. Uočeno je da zdrave osobe vrlo dobro podnose resveratrol, međutim učinci na pacijentima s određenim zdravstvenim stanjima još nisu dovoljno istraženi (Shaito i sur., 2020).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Biološki materijal

U radu je korištena monoslojna stanična linija ovarija kineskog hrčka (engl. *Chinese Hamster Ovary*, CHO-K1).

##### 3.1.1.1. CHO-K1 stanična linija

CHO-K1 stanična linija izvedena je kao subklon iz roditeljske CHO stanične linije, koja je izolirana biopsijom jajnika odrasle ženke kineskog hrčka 1957. godine. Ova stanična linija učestalo se koristi u biološkim, medicinskim i toksikološkim istraživanjima.

##### 3.1.2. Kemikalije

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12</i> (DMEM/F-12) (minimalni esencijalni medij s 15 mM HEPES-om, NaHCO <sub>3</sub> i piridoksinom), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
<i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS – fetalni goveđi serum), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
Resveratrol (RSV), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
<i>Muse</i> <sup>®</sup> <i>Autophagy LC3-antibody based kit</i> , kat. broj MCH 200109, Luminex, SAD
0.25 % tripsin – EDTA, GIBCO, SAD
boja tripan plavo (Trypan Blue), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
apsolutni etanol, Kemika, Zagreb
Guava ICF ( <i>Instrument cleaning fluid</i> ), Millipore, Merck, Darmstadt, Njemačka

##### 3.1.3. Otopine i puferi

<i>Dulbecco's MEM/F-12</i>	
SASTOJCI	KONCENTRACIJA (mg/L)
<b>aminokiseline</b>	
glicin	18,75
L-alanin	4,45
L-arginin hidroklorid	147,50
L-asparagin x H <sub>2</sub> O	7,50
L-asparaginska kiselina	6,65
L-cistein hidroklorid x H <sub>2</sub> O	17,56



L-cistein x 2 HCl	31,29
L-glutaminska kiselina	7,35
L-glutamin	365,00
L-histidin hidroklorid x H <sub>2</sub> O	31,48
L-izoleucin	54,47
L-leucin	59,05
L-lizin hidroklorid	91,25
L-metionin	17,24
L-fenilalanin	35,48
L-prolin	17,25
L-serin	26,25
L-treonin	53,45
L-triptofan	9,02
L-tirozin x 2 Na x 2 H <sub>2</sub> O	55,79
L-valin	25,85
<b>vitamini</b>	
biotin	0,0035
kolina klorid	8,98
D-Ca pantotenska kiselina	2,24
folna kiselina	2,65
nikotinamid	2,02
piridoksin hidroklorid	2,00
riboflavin	0,219
tiamin hidroklorid	2,17
vitamin B <sub>12</sub>	0,68
i-inozitol	12,60
<b>anorganske soli</b>	
CaCl <sub>2</sub>	116,60
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,0013
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> x 9 H <sub>2</sub> O	0,05
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,417

MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	61,00
MgSO <sub>4</sub> x 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> x 7 H <sub>2</sub> O	134,00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	62,50
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,432
<b>ostali sastojci</b>	
D-glukoza	3151,00
HEPES	3075,40
hipoksantin x Na	2,39
linolna kiselina	0,042
lipoična kiselina	0,105
fenol crveno	8,10
putrescin x 2 HCl	0,081
Na piruvat	55,00
timidin	0,365

<b>ISHODNA OTOPINA RESVERATROLA</b>	
resveratrol	13,6944 mg
DMSO	3 mL
pripremljena su otopine resveratrola tako da je u mediju za uzgoj postignuta koncentracija od 5, 20, 50, 100 μM	

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

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

pH pufera se podesi s 5 M HCl

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

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

#### 3.1.4. Oprema i uređaji

U radu je korištena sljedeća oprema i uređaji:

CO <sub>2</sub> inkubator s kontroliranom atmosferom Memmert GmbH + Co.KG, Njemačka
Komora za sterilan rad (laminar) Twin 30, Gelaire Flow Laboratories, UK
Inverzni mikroskop Motic AE2000 s kamerom Moticam S6, MOTIC Deutschland GmbH, Njemačka
Svjetlosni mikroskop LABOVAL 4, Carl Zeiss, Jena, Njemačka
Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica Assistant, Bright-Line, Njemačka
Guava <sup>®</sup> Muse <sup>®</sup> Cell Analyzer, Luminex, SAD
Vibracijska mješalica, Tehnica Železniki, Slovenija

### **3.2. METODE RADA**

#### 3.2.1. Uzgoj i održavanje CHO-K1 stanične linije

Uzgoj stanične linije započinje naglim odmrzavanjem ampula smrznutih stanica na 37 °C, nakon čega slijedi resuspenzija u mediju za uzgoj (90 % DMEM/F12) uz dodatak 10 % FBS-a. Suspenzija stanica uzgaja se u T-bocama u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (37 °C, 95 % zraka i 5 % CO<sub>2</sub>).

Korištena stanična linija je monoslojna i raste pričvršćena za podlogu te se pri precjepljivanju stanice moraju odvojiti od površine na kojoj rastu. Prvo je potrebno ispirati T-bocu od ostatka iskorištenog medija primjenom proteolitičkog enzima tripsina, potom se na stanice dodaje 1 mL tripsina i stavlja na kratku inkubaciju. Nakon što se stanice odvoje od površine T-boce, resuspendiraju se u novom mediju za uzgoj te se uzima uzorak stanične suspenzije za određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue* (TB). Dodatkom svježeg medija za uzgoj, stanice se razrjeđuju na koncentraciju  $1 \times 10^5$  stanica/mL medija za uzgoj i nastavlja se uzgoj.

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

Iz suspenzije prethodno tripsiniziranih stanica izdvoji se 20 µL uzroka, potom mu se doda 20 µL 0,4 %-tne boje *Trypan Blue* – resuspendira se i nanese (20 µL) na Fuchs-Rosenthalovu komoricu.

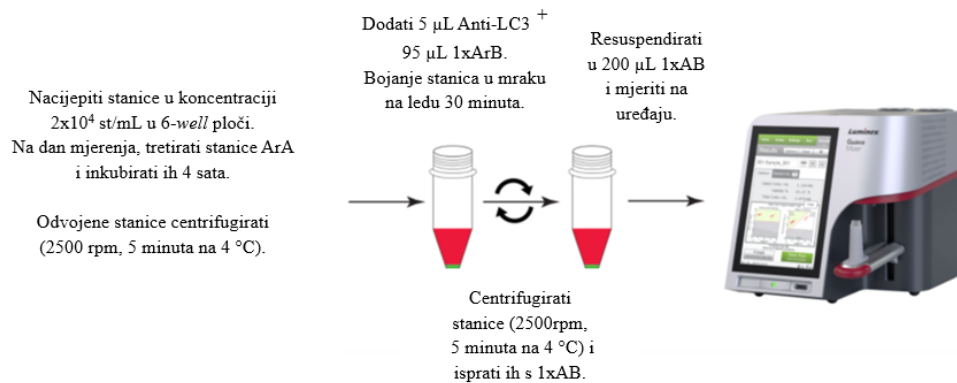
Brojanje stanica provodi se pod svjetlosnim mikroskopom. *Trypan Blue* boja lako prolazi kroz oštećenu membranu mrtvih stanica, dok žive stanice ostaju nebojane.

Fuchs-Rosenthalova komorica je dubine 0,2 mm i površine 0,0625 mm<sup>2</sup>, podijeljena je na 16 kvadrata, a stanice se broje u unutarnja četiri. Ukupan broj živih stanica po mililitru suspenzije jednak je srednjoj vrijednosti broja živih stanica izbrojenih u četiri kvadrata pomnoženoj s 10<sup>4</sup>.

### 3.2.3. Određivanje učinaka resveratrola na vijabilnost stanica i indukciju autofagije

#### 3.2.3.1. Priprema stanica za analizu MUSE<sup>®</sup> protočnim citometrom

Protokol određivanja autofagije uz *Muse<sup>®</sup> Autophagy LC3-antibody based Kit* prikazan je na Slici 6. *Multiwell* ploča sa 6 jažica nacijepi se s po 2 mL stanične suspenzije ( $2 \times 10^4$  stanica/mL medija za uzgoj, uz dodatak 10 % FBS-a). Nakon inkubacije od 24 sata, stanice se tretiraju s 20  $\mu$ L otopine resveratrola u EtOH, kako bi se u mediju za uzgoj postigle koncentracije od 5, 20, 50 i 100  $\mu$ M spoja. Kontrolni uzorak su stanice tretirane s 5  $\mu$ L EtOH/mL medija za uzgoj. Nakon 48 sati inkubacije s resveratrolom, metodom protočne citometrije određuje se udio stanica u autofagiji. Iz jažica *multiwell* ploče ukloni se medij za uzgoj te se stanice sterilno ispiru s po 500  $\mu$ L PBS-a. Na isprane stanice stavlja se 500  $\mu$ L PBS-a + 5  $\mu$ L reagensa A (engl. *autophagy reagent A*, ArA) i takve ploče vraćaju se u inkubator na inkubaciju od 4 sata. Nakon inkubacije, stanice se opet ispiru s po 500  $\mu$ L PBS-a te se u jažice stavlja po 500  $\mu$ L tripsina. Slijedi kratka inkubacija kako bi se stanice odvojile od podloge. Tripsinizirane stanice prebacuju se u Eppendorf epruvete (od 2 mL) te se u njih doda po 500  $\mu$ L PBS-a. Nakon centrifugiranja (2500 rpm, 5 minuta na 4 °C) uklanja se supernatant, a na stanice se dodaje 5  $\mu$ L Anti-LC3 + 95  $\mu$ L 1 x reagens B (engl. *1 x autophagy reagent B*, ArB). Slijedi bojanje stanica u mraku na ledu 30 minuta. Nakon bojanja stanice se ponovno centrifugiraju (2500 rpm, 5 minuta na 4 °C). Kada se ukloni supernatant, stanice se isperu puferom (engl. *1x Assay Buffer*, 1xAB) i ponovno centrifugiraju (2500 rpm, 5 minuta, 4 °C). Po uklanjanju supernatanta, stanice se resuspendiraju u 200  $\mu$ L 1xAB. Analiza uzorka provodi se metodom protočne citometrije na *Guava<sup>®</sup> Muse<sup>®</sup> Cell Analyzer* uređaju. Podaci generirani pomoću analizatora stanica zajedno s odgovarajućim softverom daju uvid u indukciju autofagije (na temelju intenziteta fluorescencije testnog uzorka u odnosu na kontrolu).



**Slika 6.** Protokol određivanja autofagije uz *Muse® Autophagy LC3-antibody based Kit* (prema Merck KGaA, 2013)

### 3.3. STATISTIČKA OBRADA

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ( $\bar{x}$ ) 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 = ukupan 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 najmanje  $p < 0,05$  (odstupanje je određivano u odnosu na vrijednosti kontrolnog uzorka- stanice tretirane s 5  $\mu$ L EtOH/mL medija za uzgoj).

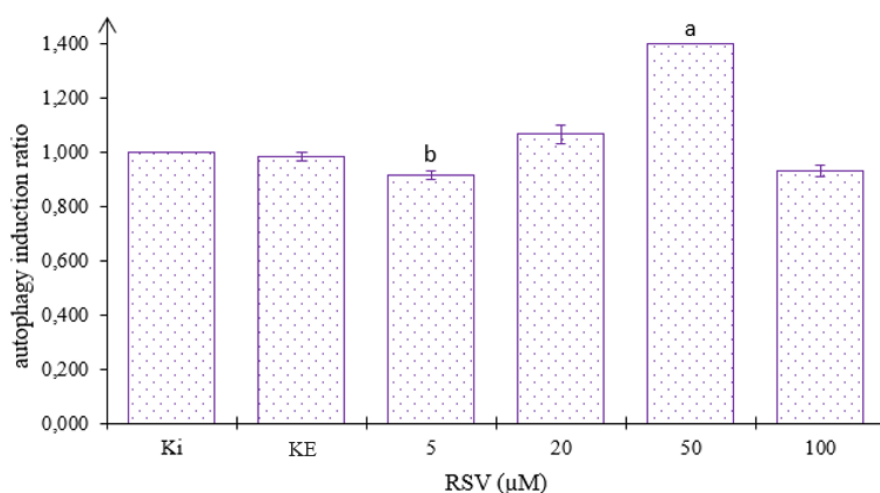
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

S ciljem ispitivanja indukcije autofagije resveratrolom, u ovom radu je korištena stanična linija CHO-K1 izolirana iz jajnika kineskog hrčka.

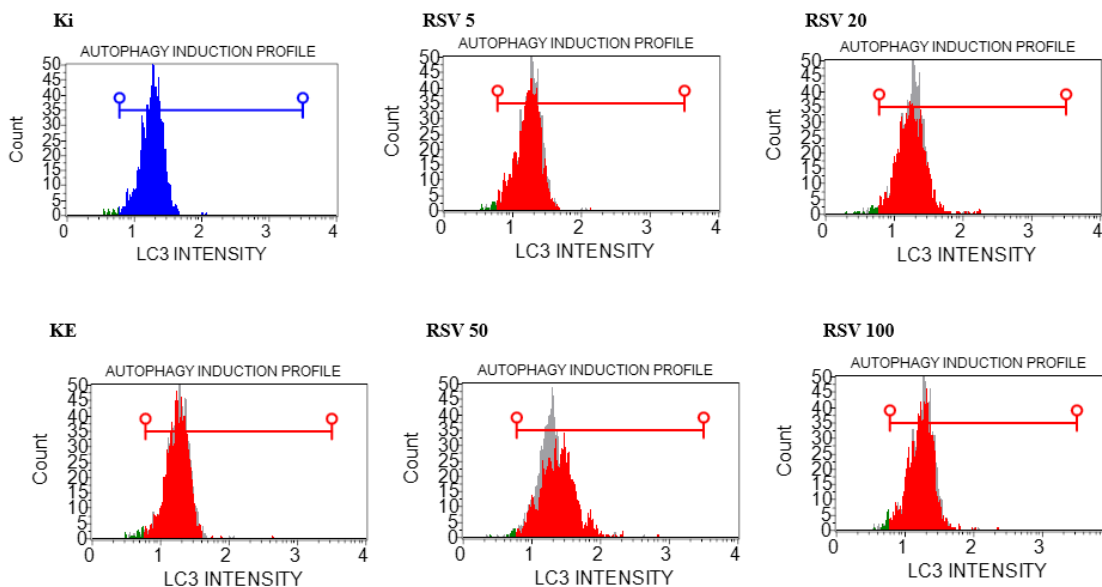
Stanično umiranje je prvenstveno obrambeni mehanizam stanice neophodan za regulaciju diobe i diferencijacije te održavanje homeostaze (Miletić i sur., 2021). Novijim istraživanjima nastoji se ispitati primjena biološki aktivnih spojeva koji mogu zaštititi stanice od prekomjerne i nekontrolirane stanične smrti ili pak pokrenuti programiranu staničnu smrt mutiranih i oštećenih stanica. Resveratrol se ističe takvim djelovanjem i predmet je istraživanja u širokom rasponu znanstvenih područja. Dokazani protektivni učinci obuhvaćaju antioksidacijske, protuupalne i antimikrobne učinke te regulaciju stanične smrti i posljedično antikancerogeno djelovanje resveratrola.

### 4.1. INDUKCIJA AUTOFAGIJE POTAKNUTA RESVERATROLOM U CHO-K1 STANIČNOJ LINIJI

Rezultati učinaka različitih koncentracija resveratrola na indukciju autofagije u CHO-K1 staničnoj liniji statistički su obrađeni i prikazani na Slici 7. Na Slici 8 prikazani su reprezentativni uzorci - histogrami (*Autophagy induction profile*) dobiveni primjenom protočne citometrije i *Muse autophagy LC3-antibody based kit-a* za kontrolni uzorak stanica i stanice tretirane različitim koncentracijama resveratrola (5, 20, 50 i 100  $\mu\text{M}$ ).



**Slika 7.** Evaluacija autofagije u CHO-K1 staničnoj liniji nakon tretmana resveratrolom u koncentraciji 5, 20, 50 ili 100  $\mu\text{M}$ . Ki – intaktna kontrola (netretirane stanice); KE – kontrola uz dodatak EtOH u koncentraciji 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  medija za uzgoj. Statistički značajna razlika (Student *t*-test): <sup>a</sup> $p < 0,001$ , <sup>b</sup> $p < 0,025$



**Slika 8.** Reprezentativni uzorci - histrogrami (*Autophagy induction profile*) dobiveni primjenom protočne citometrije i *Muse autophagy LC3-antibody based kit*-a za kontrolni uzorak stanica (Ki i KE) i stanice tretirane različitim koncentracijama resveratrola (5 –100  $\mu$ M RSV). Ki – intaktna kontrola (netretirane stanice); KE – kontrola uz dodatak EtOH u koncentraciji 5  $\mu$ L/mL medija za uzgoj

U odnosu na kontrolni uzorak (stanice bez tretmana resveratrolom, uz dodatak EtOH u koncentraciji 5  $\mu$ L/mL medija za uzgoj), resveratrol je pri koncentraciji 50  $\mu$ M statistički značajno ( $p < 0,001$ ) inducirao autofagiju (*autophagy induction ratio* iznosi 1,4). Nakon tretmana CHO-K1 stanica resveratrolom pri dozi 20  $\mu$ M i 100  $\mu$ M nije određeno statistički značajno odstupanje u udjelu stanica koje odumiru autofagijom u odnosu na kontrolni uzorak.

Predmet istraživanja studije Zhang i sur. (2014) bila je indukcija autofagije resveratrolom u GH3 staničnoj liniji. Nakon tretmana stanica resveratrolom (10, 25 i 50  $\mu$ M) i inkubacije tijekom 48 h utvrđene su više razine proteina LC3-II i Beclin-1 (engl. *Bcl-2 interacting myosin/moesin-like coiled-coil protein 1*), što je u pozitivnoj korelaciji s formiranjem vezikula autofagosoma. Najviše koncentracije navedenih proteina uočene su nakon primjene resveratrola u koncentraciji 50  $\mu$ M što je u korelaciji s rezultatima dobivenim ovim istraživanjem. Kao mehanizam kojim resveratrol inducira autofagiju navedena je supresija aktivnosti PI3K/Akt signalnog puta te fosforilacija mTOR-a.

Slični rezultati uočeni su nakon tretmana B16-F10 i A375 staničnih linija melanoma resveratrolom pri koncentracijama 25, 50 i 100  $\mu$ M. Kao indikator uspješne indukcije autofagije

također je uočena povećana razina ekspresije proteina Beclin-1 i LC3-II te inhibicija PI3K/AKT/mTOR signalnog puta (Gong i Xia, 2020).

Novijim istraživanjima nastoji se ispitati utjecaj resveratrola na reproduksijski sustav u žena. Rezultati istraživanja Zaychenko i sur. (2022) provedenog na ovarijektomiranim štakorima tretiranim 28 dana s resveratrol - hijaluronska kiselina (R-HA) vaginalnim gelom sugeriraju mogućnost ublažavanja tipičnih simptoma menopauze. Uočeni protektivni učinci gela uključuju nižu stopu povećanja tjelesne mase u životinja, snižavanje vaginalnog pH i sprječavanje atrofičnih promjena u vaginalnom epitelu, a pri tome nije zabilježeno značajno povećanje razine spolnih hormona. Potrebne su daljnje pretkliničke i kliničke studije kako bi se potvrdili pozitivni rezultati primjene R-HA gela.

Rezultati eksperimentalnog dijela rada potvrđuju da resveratrol u staničnoj liniji CHO-K1 inducira autofagiju, no vrijednost *autophagy induction ratio* prvenstveno ovisi o primijenjenoj dozi (Slike 7 i 8).



## 5. ZAKLJUČCI

1. Resveratrol je polifenol i fitoaleksin čija se biološka aktivnost manifestira kroz antioksidacijske, antimikrobne i protuupalne učinke te mogućnost regulacije stanične smrti.

2. Otkriveni su brojni mehanizmi na staničnoj razini kojima resveratrol može inducirati autofagiju i druge oblike programirane stanične smrti, zbog čega se intenzivno istražuje kao potencijalni farmakoterapeutik s ciljem prevencije ili liječenja različitih vrsta karcinoma.

3. Potencijalni terapijski učinci resveratrola očituju se pri terapiji i/ili liječenju kardiovaskularnih, neurodegenerativnih bolesti i dijabetesa. Potrebna su dodatna pretklinička i klinička istraživanja kako bi se uočeno protektivno djelovanje potvrdilo.

4. Toksičnost i negativne učinke resveratrola na zdravlje tek je potrebno detaljnije istražiti. Do sada dobiveni kontradiktorni rezultati prije svega ovise o korištenoj dozi, bioraspoloživosti, farmakokinetici i načinu primjene resveratrola te dobi, spolu, načinu života i različitostima u crijevnom mikrobiomu pojedinca.

5. Tretman CHO-K1 stanične linije resveratrolom rezultirao je indukcijom autofagije.

6. Resveratrol je pri koncentraciji 50  $\mu\text{M}$  statistički značajno ( $p < 0,001$ ) inducirao autofagiju u odnosu na kontrolni uzorak (stanice bez tretmana resveratrolom, uz dodatak EtOH u koncentraciji 5  $\mu\text{L/mL}$  medija za uzgoj). Nakon tretmana CHO-K1 stanica resveratrolom pri dozi 20  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  nije određeno statistički značajno odstupanje u udjelu stanica koje odumiru autofagijom u odnosu na kontrolni uzorak. Iz navedenog se može zaključiti da resveratrol u staničnoj liniji CHO-K1 inducira autofagiju, no ključna je koncentracija u kojoj se primjenjuje.

## 6. POPIS LITERATURE

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

Bolko Seljak K, Gašperlin M (2023) Resveratrol v kozmetiki in dermatologiji. *Farmacevtski vestnik: strokovno glasilo slovenske farmacije* **74**, 39-45. [https://www.sfd.si/wp-content/uploads/2023/02/fv-1-2023\\_5.pdf](https://www.sfd.si/wp-content/uploads/2023/02/fv-1-2023_5.pdf)

Bolton JL, Dunlap T (2017) Formation and Biological Targets of Quinones: Cytotoxic versus Cytoprotective Effects. *Chem Res Toxicol* **30**, 13–37. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00256>

Bostanghadiri N, Pormohammad A, Chirani AS, Pouriran R, Erfanimanesh S, Hashemi A (2017) Comprehensive review on the antimicrobial potency of the plant polyphenol resveratrol. *Biomed Pharmacother* **95**, 1588-1595. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.084>

Breuss JM, Atanasov AG, Uhrin P (2019) Resveratrol and Its Effects on the Vascular System. *Int J Mol Sci* **27**, 1523. <https://doi.org/10.3390/ijms20071523>

Chan MM-Y (2002) Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem Pharmacol* **63**, 99-104. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00886-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00886-3)

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS i sur. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 13926–13931. <https://doi.org/10.1073/pnas.162468699>

Chang C, Lee C, Lu C, Tsai F, Hsu Y, Tsao J i sur. (2017) Resveratrol-induced autophagy and apoptosis in cisplatin-resistant human oral cancer CAR cells: A key role of AMPK and Akt/mTOR signaling. *Intern J Oncol* **50**, 873-882. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3866>

Chao SC, Chen YJ, Huang KH, Kuo KL, Yang TH, Huang KY i sur. (2017) Induction of sirtuin-1 signaling by resveratrol induces human chondrosarcoma cell apoptosis and exhibits antitumor activity. *Sci Rep* **9**, 3180. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03635-7>

Cottart CH, Antoine VN, Laguillier-Morizot C, Beaudeau JL (2010) Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol Nutr Food Res* **54**, 7-16. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900437>

Fan Y, Li J, Yang Y, Zhao X, Liu Y, Jiang Y i sur. (2020) Resveratrol modulates the apoptosis and autophagic death of human lung adenocarcinoma A549 cells via a p53-dependent pathway: Integrated bioinformatics analysis and experimental validation. *Int J Oncol* **57**, 925–938. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5107>

Fogacci F, Tocci G, Presta V, Fratter A, Borghi C, Cicero AFG (2018) Effect of resveratrol on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled, clinical trials. *Crit Rev Food Sci Nutr* **59**, 1605-1618. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1422480>

Fu X, Li M, Tang C, Huang Z, Najaf M (2021) Targeting of cancer cell death mechanisms by resveratrol: a review. *Apoptosis* **26**, 561–573. <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01689-7>

Galiniak S, Aebischer D, Bartusik-Aebischer D (2019) Health benefits of resveratrol administration. *Acta biochim Pol* **66**, 13-21. [https://doi.org/10.18388/abp.2018\\_2749](https://doi.org/10.18388/abp.2018_2749)

Gao X, Xu YX, Janakiraman N, Chapman RA, Gautam SC (2001) Immunomodulatory activity of resveratrol: Suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem Pharmacol* **62**, 1299–1308. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00775-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00775-4)

Gerszon J, Rodacka A, Puchala M (2014) Antioxidant Properties of Resveratrol and its Protective Effects in Neurodegenerative Diseases. *Medical Journal of Cell Biology* **4**, 97-117. <https://doi.org/10.2478/acb-2014-0006>

Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ (2003) Absorption of three wine-related polyphenols in three

different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem* **36**, 79-87. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(02\)00397-1](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(02)00397-1)

Gong C, Xia H (2020) Resveratrol suppresses melanoma growth by promoting autophagy through inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Exp Ther Med* **19**, 1878-1886. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8359>

Jang JY, Im E, Kim ND (2022a) Mechanism of Resveratrol-Induced Programmed Cell Death and New Drug Discovery against Cancer: A Review. *Int J Mol Sci* **23**, 13689. <https://doi.org/10.3390/ijms232213689>

Jang JY, Sung B, Kim ND (2022b) Role of induced programmed cell death in the chemopreventive potential of apigenin. *Int J Mol Sci* **23**, 3757. <https://doi.org/10.3390/ijms23073757>

Jang JY, Im E, Choi YH, Kim ND (2022c) Mechanism of bile acid-induced programmed cell death and drug discovery against cancer: A review. *Int J Mol Sci* **23**, 7184 <https://doi.org/10.3390/ijms23137184>

Jannin B, Menzel M, Berlot JP, Delmas D, Lançon A, Latruffe N (2004) Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem Pharmacol* **68**, 1113-1118. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.04.028>

Jin H, Chen H, Yu K, Zhang J, Li B, Cai N i sur. (2016) Resveratrol inhibits phosphorylation within the signal transduction and activator of transcription 3 signaling pathway by activating sirtuin 1 in SW1353 chondrosarcoma cells. *Mol Med Rep* **14**, 2685–2690. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5554>

Khodamoradi E, Hoseini-Ghahfarokhi M, Amini P, Motevaseli E, Shabeeb D, Musa AE (2020) Targets for protection and mitigation of radiation injury. *Cell Mol Life Sci* **77**, 3129–3159. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03479-x>

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES , Baehrecke EH i sur. (2009)

Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**, 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>

Kuršvietienė L, Stanevičienė I, Mongirdienė A, Bernatoniene J (2016) Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina* **52**, 148-155. <https://doi.org/10.1016/j.medici.2016.03.003>

Langcake P, Pryce RJ (1977) The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry* **16**, 1193-1196. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94358-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94358-9)

Li X, Li F, Wang F, Li J, Lin C, Du, J (2018) Resveratrol inhibits the proliferation of A549 cells by inhibiting the expression of COX-2. *Oncotargets Ther* **11**, 2981–2989. [https://doi.org/10.2147\(OTT.S157613](https://doi.org/10.2147(OTT.S157613)

Li D, Wang G, Jin G, Yao K, Zhao Z, Bie L i sur. (2019) Resveratrol suppresses colon cancer growth by targeting the AKT/STAT3 signaling pathway. *Int J Mol Med* **43**, 630-640. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3969>

Li X, He S, Ma B (2020) Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol Cancer* **19**, 12. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-1138-4>

Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D i sur. (2018) Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* **13**, 757–772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>

Liu Z, Wu X, Lv J, Sun H, Zhou F (2019) Resveratrol induces p53 in colorectal cancer through SET7/9. *Oncol. Lett.* **17**, 3783–3789. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10034>

Lukić A (2017) Mogućnosti topikalne primjene resveratrola (specijalistički rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Ma R, Yu D, Peng, Y, Yi H, Wang Y, Cheng T i sur. (2021) Resveratrol induces AMPK and mTOR signaling inhibition-mediated autophagy and apoptosis in multiple myeloma cells. *Acta Biochim Biophys Sin* **53**, 775–783. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmab042>

Maier-Salamon A, Hagenauer B, Wirth M, Gabor F, Szekeres T, Jager W(2006) Increased transport of resveratrol across monolayers of the human intestinal Caco-2 cells is mediated by inhibition and saturation of metabolites. *Pharm Res* **23**, 2107-2115. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9060-z>

Malaguarnera L (2019) Influence of resveratrol on the immune response. *Nutrients* **11**, 1–24. <https://doi.org/10.3390/nu11050946>

Mankowski RT, You L, Buford TW, Leeuwenburgh C, Manini TM, Schneider S i sur. (2020) Higher dose of resveratrol elevated cardiovascular disease risk biomarker levels in overweight older adults - A pilot study. *Exp Gerontol* **131**, 110821. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110821>

Merck KGaA (2013) Muse™ Autophagy LC3-antibody based Kit User's Guide, Catalog No. MCH200109.

<http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH200109.pdf>

Pristupljeno 7. srpnja 2023.

Miletić M, Murati T, Slavica A , Kmetič I (2021) Opstati ili umrijeti – regulacija stanične smrti. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **16**, 11-19. <https://doi.org/10.31895/hcptbn.16.1-2.2>

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**, 1069–1075. <https://doi.org/10.1038/nature06639>

Mokni M, Elkahoui S, Limam F, Amri M, Aouani E (2007) Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. *Neurochem Res* **32**, 981-987. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9255-z>

Ou A, Zhao, X, Lu Z (2022) The potential roles of p53 signaling reactivation in pancreatic cancer therapy. *Biochim Biophys Acta Rev* **1877**, 188662 <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188662>

Posadino AM, Cossu A, Giordo R, Zinellu A, Sotgia S, Vardeu A i sur. (2015) Resveratrol alters

human endothelial cells redox state and causes mitochondrial-dependent cell death. *Food Chem Toxicol* **78**, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.01.017>

Revathidevi S, Munirajan AK (2019) Akt in cancer: Mediator and more. *Semin Cancer Biol* **59**, 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.06.002>

Sales JM, Resurreccion A (2013) Resveratrol in Peanuts. *CRC Cr Rev Food Sci and Nutrition* **54**, 734-770. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.606928>

Santos AC, Veiga F, AJ Ribeiro (2011) New delivery systems to improve the bioavailability of resveratrol. *Expert Opin Drug Deliv* **8**, 973-990. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.581655>

Shaito A, Posadino AM, Younes N, Hasan H, Halabi S, Alhababi D i sur. (2020) Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review. *Int J Mol Sci* **8**, 2084. <https://doi.org/10.3390/ijms21062084>

Shevelev AB, La Porta N, Isakova EP, Martens S, Biryukova YK, Belous AS i sur. (2020) *In Vivo* Antimicrobial and Wound-Healing Activity of Resveratrol, Dihydroquercetin, and Dihydromyricetin against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*. *Pathogens* **17**, 296. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040296>

Siemann EH, Creasy LL (1992) Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. *Am J Enol Vitic* **43**, 49-52 <https://doi.org/10.5344/ajev.1992.43.1.49>

Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM (1997) Resveratrol: A Molecule Whose Time Has Come? And Gone? *Clin Biochem* **30**, 91-113. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(96\)00155-5](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(96)00155-5)

Song M, Bode AM, Dong Z, Lee MH (2019) AKT as a therapeutic target for cancer. *Cancer Res* **79**, 1019–1031. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>

Springer M, Moco S (2019) Resveratrol and Its Human Metabolites—Effects on Metabolic Health and Obesity. *Nutrients* **11**,143 <https://doi.org/10.3390/nu11010143>

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

Szkudelski T, Szkudelska K (2014) Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. *Biochim Biophys Acta* **1852**, 1145-1154. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.013>

Tian B, Liu J (2019) Resveratrol: a review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. *J Sci Food Agric* **100**, 1392–1404. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10152>

Vestergaard M, Ingmer H (2019) Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. *Int J Antimicrob Agents* **53**, 716–723. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.02.015>

Wang Z, Wu L, Tong S, Hu X, Zu X, Li Y i sur. (2016) Resveratrol suppresses the epithelial-to-mesenchymal transition in PC-3 cells by down-regulating the PI3K/AKT signaling pathway. *Anim Cells Syst* **20**, 77 -85. <https://doi.org/10.1080/19768354.2016.1150344>

Wang Y, Cui H, Niu F, Liu S-L, Li Y, Zhang L-M i sur. (2018) Effect of Resveratrol on Blood Rheological Properties in LPS-Challenged Rats. *Front Physiol* **9**, 1202. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01202>

Zaychenko G, Stryga O, Sinitsyna O, Doroshenko A, Sulaieva O, Falalyeyeva T i sur. (2022) Resveratrol Effects on the Reproductive System in Ovariectomized Rats: Deciphering Possible Mechanisms. *Molecules* **27**, 4916. <https://doi.org/10.3390/molecules27154916>

Zhang X, Xu W, Su J, Chu M, Jin H, Li G i sur. (2014) The prosurvival role of autophagy in resveratrol-induced cytotoxicity in GH3 cells. *Int J Mol Med* **33**, 987-993. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1660>

Zhang J, Ma K, Qi T, Wei X, Zhang Q, Li G i sur. (2015) P62 Regulates resveratrol-mediated Fas/Cav-1 complex formation and transition from autophagy to apoptosis. *Oncotarget* **6**, 789–801. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2733>



Zhang C, Chen K, Zhao X, Geng Z (2018) Protective effects of resveratrol against high ambient temperature-induced spleen dysplasia in broilers through modulating splenic redox status and apoptosis. *J Sci Food Agric* **98**, 5409–5417 <https://doi.org/10.1002/jsfa.9084>

Zhang LX, Li CX, Kakar MU, Khan MS, Wu PF, Amir RM (2021) Resveratrol (RV): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother* **143**, 112164. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112164>

Zhao YG, Codogno P, Zhang H (2021) Machinery, regulation and pathophysiological implications of autophagosome maturation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **22**, 733–750. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00392-4>

Zhu X, Liu Q, Wang M, Liang M, Yang X, Xu X i sur. (2011) Activation of Sirt1 by resveratrol inhibits TNF- $\alpha$  induced inflammation in fibroblasts. *PLoS One* **6**, e27081. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027081>

## Izjava o izvornosti

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

*Sofija Krotin*

\_\_\_\_\_  
Vlastoručni potpis