

# Učinak resveratrola na serumske markere oksidacijskog stresa u pacijenata podvrgnutih operaciji zamjene srčanog zaliska

---

Mutabdžić, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:020680>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Kristina Mutabdžić

**Učinak resveratrola na serumske markere  
oksidacijskog stresa u pacijenata podvrgnutih  
operaciji zamjene srčanog zaliska**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Kristina Mutabdžić

**The effects of resveratrol on markers of oxidative  
stress in serum of patients who underwent the  
heart valve replacement surgery**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Jedinici za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod voditeljstvom dr. sc. Dubravke Rašić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar/magistra edukacije biologije i kemije.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Dubravki Rašić na razumijevanju i poštivanju mojih interesa prilikom izbora teme istraživanja, prijateljskom pristupu i strpljenju tijekom izrade ovog rada, na darovanom vremenu kada god mi je bilo potrebno i na svojoj pomoći, uputama i smjernicama kojima je proširila moje znanje u praksi, omogućila mi što jednostavniju izradu diplomskog rada te prije svega učinila ovo zanimljivim znanstvenim iskustvom.*

*Zahvaljujem Jedinici za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada što su mi ustupili svoje prostore i laboratorijsku opremu, za provedbu istraživanja, bez čega izrada ovog rada ne bi bila moguća te svim djelatnicima jedinice na ljubaznosti i ugodnoj atmosferi tijekom mog boravka.*

*Zahvaljujem i prof. dr. sc. Domagoju Đikiću na pomoći i suradnji u izradi ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem svojim roditeljima na financijskoj podršci te svim bliskim i stručnim osobama koje su mi pomogle tijekom studiranja.*

*Zahvaljujem Bogu za sve.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Učinak resveratrola na serumske markere oksidacijskog stresa u pacijenata podvrgnutih operaciji zamjene srčanog zaliska

Kristina Mutabdžić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Bolesti srca i krvnih žila glavni su uzrok smrti i bolničkog liječenja u Hrvatskoj. Srce može postati ranjivo od štetnih životnih navika kao što su pušenje, nezdrava prehrana ili prevelika razina stresa. Potencijalna uloga antioksidansa u prevenciji i liječenju kardiovaskularnih bolesti intenzivno se istražuje u posljednja četiri desetljeća. Resveratrol (RSV) se nalazi u kikirikiju i njegovim derivatima, pistacijama, šumskom voću, tamnoj čokoladi i grožđu te njegovim derivatima. Štiti kardiovaskularni sustav na više načina. Oksidacijski stres je definiran kao poremećaj u ravnoteži između antioksidansa i prooksidansa koji se očituje u povećanoj koncentraciji prooksidansa što potencijalno vodi oštećenju stanica. Kao biološki markeri oksidacijskog stresa u ovom istraživanju mjereni su malondialdehid (MDA) kao pokazatelj oksidacijskog oštećenja lipida i glutathion (GSH) koji ima ulogu antioksidansa. Koncentracije MDA i GSH mjerene su u plazmi pacijenata uzorkovane u pet vremenskih točaka prije, tijekom i nakon operacije. Pacijenti su podijeljeni u dvije skupine koje su dobivale placebo (laktulozu) i RSV. Koncentracije MDA i GSH nisu se međusobno statistički značajno razlikovale u ove dvije skupine. Koncentracija GSH bila je statistički značajno veća u plazmi pacijenata uzorkovanoj po dolasku u jedinicu intenzivnog liječenja u odnosu na ostale točke uzorkovanja. Rezultati mjerenja oksidacijskog stresa ukazuju na malene promjene oksidacijskog stresa tijekom operacije zamjerne aortnog zaliska te protektivno djelovanje RSV-a, ali i laktuloze koja je korištena kao placebo. Potrebno je mjeriti veći broj čimbenika kako bismo dobili potpuniji uvid u utjecaj resveratrola na oksidacijski stres tijekom operacija.

(38 stranica, 7 slika, 1 tablica, 89 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: glutathion, malondialdehid, antioksidansi, kardiovaskularne bolesti.

Voditelj 1: dr. sc. Dubravka Rašić, zn. sur.

Voditelj 2: prof. dr. sc. Domagoj Đikić, red. prof.

Ocjenitelji:

1. dr. sc. Domagoj Đikić, redoviti profesor
2. dr. sc. Ines Radanović, redoviti profesor
3. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek, izvanredni profesor

Rad prihvaćen: 24. lipnja 2021.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

## The effects of resveratrol on markers of oxidative stress in serum of patients who underwent the heart valve replacement surgery

Kristina Mutabdzic

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cardiovascular diseases are the main cause of death and hospital treatment in Croatia. The heart can become vulnerable to harmful life habits such as smoking, unhealthy diet or excessive levels of stress. The potential role of antioxidants in the prevention and treatment of cardiovascular disease has been intensively investigated in the last four decades. Resveratrol is found in peanuts and its derivatives, pistachios, forest fruits, dark chocolate and grapes and its derivatives. Resveratrol protects the cardiovascular system in several ways. Oxidative stress is a disturbance in the balance between antioxidants and prooxidants that manifests as an increased concentration of prooxidants which can lead to cell damage. As biological markers of oxidative stress in this study, malondialdehyde, as an indicator of lipid oxidative damage, and glutathione that plays the role of antioxidants, were measured. Blood samples were sampled for plasma five times before, during and after surgery. Patients were divided into two groups receiving placebo (lactulose) and resveratrol. There were no differences in plasma MDA and GSH concentrations between groups. GSH concentration was significantly increased in plasma taken after receiving patients in the intensive care unit. The results of oxidative stress indicate small changes in oxidative stress during aortic valve surgery and an antioxidative effect of RSV and lactulose. It is necessary to measure a number of factors to gain a complete insight into the effect of resveratrol on oxidative stress during operations.

(38 pages, 7 figures, 1 table, 89 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: glutathione, malondialdehyde, antioxidant, cardiovascular disease.

Supervisor 1: Scientific Associate Dubravka Rašić, PhD

Supervisor 2: Full Professor Domagoj Đikić, PhD

Reviewers:

1. Full Professor Domagoj Đikić, PhD
2. Full Professor Ines Radanović, PhD
3. Associate Professor Draginja Mrvoš-Sermek, PhD

Thesis accepted: 24<sup>th</sup> June 2021.

# SADRŽAJ

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
1.1 Kardiovaskularne bolesti .....	1
1.2 Povezanost kardiovaskularnih bolesti i prehrane .....	1
1.3 Utjecaj tjelesne aktivnosti na kardiovaskularne bolesti.....	3
1.4 Antioksidansi u prehrani.....	3
1.5 „Francuski paradoks“ .....	4
1.6 Resveratrol.....	5
1.7 Biosinteza i metabolizam resveratrola.....	6
1.8 Dobrobiti resveratrola.....	8
1.9 Oksidacijski stres .....	9
1.10 Slobodni radikali.....	9
1.10.1 Čimbenici oksidacijskog stresa u organizmu .....	10
1.10.2 Glutation.....	10
1.10.3 Malondialdehid.....	11
<b>2. Cilj istraživanja .....</b>	<b>12</b>
<b>3. Materijali i metode .....</b>	<b>13</b>
3.1 Kemikalije .....	13
3.2 Instrumenti.....	13
3.3 Priprema pufera i otopina .....	14
3.4 Plan pokusa i uzimanja krvi.....	14
3.5 Metode .....	15
3.5.1 Mjerenje koncentracije glutaciona.....	15
3.5.2 Mjerenje koncentracije malondialdehida .....	15
3.5.2.1 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) .....	16



3.6	Statistička obrada podataka .....	16
<b>4.</b>	<b>Rezultati .....</b>	<b>17</b>
4.1	Uvod .....	17
4.2	Glutation .....	17
4.2.1	Usporedba rezultata GSH u obje skupine .....	19
4.3	Malondialdehid.....	20
4.3.1	Usporedba rezultata MDA u obje skupine .....	21
<b>5.</b>	<b>Rasprava .....</b>	<b>23</b>
<b>6.</b>	<b>Zaključak .....</b>	<b>26</b>
<b>7.</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>27</b>
<b>8.</b>	<b>Životopis.....</b>	<b>32</b>

## **KRATICE:**

LDL – Lipoprotein niske gustoće (eng. *Low density lipoprotein*)

RSV – Resveratrol

ROS – Kisikove čestice velike reaktivnosti (eng. *Reactive oxygen species*)

UV – Ultraljubičasto (engl. *ultraviolet*)

GSH – Glutation

GSSG – Glutation disulfid

MDA – Malondialdehid

HPLC – Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High-performance liquid chromatography*)

# 1. Uvod

## 1.1 Kardiovaskularne bolesti

Kardiovaskularne bolesti su bolesti srca i krvnih žila, u većini uzrokovane aterosklerozom odnosno promjenama, oštećenjima i naslagama na stijenci arterija (Ćurin, 2001). U kardiovaskularne bolesti spadaju bolesti srca, vaskularne bolesti mozga i bolesti krvnih žila mozga. Najčešće kardiovaskularne bolesti uključuju koronarnu srčanu bolest (npr. srčani udar) i cerebrovaskularnu bolest (npr. moždani udar).

Kontrola čimbenika rizika kao što su prehrana, tjelesna aktivnost, upotreba duhanskih proizvoda i kontrola krvnog tlaka mogu smanjiti rizik od kardiovaskularnih bolesti (Bays *i ostali*, 2021). Bolesti iz ove skupine vodeći su uzrok smrti i invaliditeta u svijetu. Više od 17,5 milijuna ljudi svake godine umre od kardiovaskularnih bolesti. Srčani je udar odgovoran za 7,3 milijuna od ukupnog broja kardiovaskularnih smrti, a moždani udar za 6,2 milijuna smrti.

Bolesti srca i krvnih žila glavni su uzrok smrti i bolničkog liječenja u Hrvatskoj (Macesic i Spehar, 2013). Od njih umire skoro svaki drugi stanovnik naše zemlje. One su uzrok smrti u 54,5% umrlih žena i 42,1% umrlih muškaraca, a udio u ukupnoj smrtnosti iznosi 48,3%. Smrtnost od kardiovaskularnih bolesti u muškaraca i žena raste s dobi i viša je u muškaraca nego u žena u svim dobnim skupinama. Intenzivniji porast smrtnosti počinje u dobi iznad 50 godina. Posljednjih deset godina prisutan je pozitivan trend smanjenja smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti i u Hrvatskoj.

Srce može postati ranjivo od štetnih životnih navika kao što su pušenje, nezdrava prehrana ili prevelika razina stresa (Ćurin, 2001; Bays *i ostali*, 2021). Kardiovaskularni sustav može biti oslabljen i od već postojeće srčane bolesti ili stanja. Mnogo je čimbenika rizika povezanih s koronarnom bolesti srca i moždanim udarom. Neki od tih čimbenika kao što je obiteljska anamneza, ne mogu se promijeniti, dok se na ostale, kao što je povišen krvni tlak, može utjecati liječničkom intervencijom.

## 1.2 Povezanost kardiovaskularnih bolesti i prehrane

Prehrana na različite načine može utjecati na razvoj kardiovaskularnih bolesti (Gabrić, 2016). Redovita, umjerena i pravilna prehrana jedan je od najvažnijih čimbenika na koji možemo utjecati

kako bismo znatno smanjili rizik od nastanka bolesti srca i krvnih žila. Hrana bogata nezasićenim i poluzasićenim masnim kiselinama, voće, povrće, grahorice, integralne žitarice, orašasti plodovi, sjemenke i riba pogoduju sprječavanju kardiovaskularnih bolesti (Bays *i ostali*, 2021).

Nepravilan odabir namirnica, odnosno prevelik unos soli, prerađenih ugljikohidrata, hrane bogate kolesterolom, industrijski prerađene hrane bogate zasićenim masnim kiselinama, zaslađena i alkoholna pića te prevelika količina hrane pridonose povećanju tjelesne mase te razvoju i pogoršanju kardiovaskularnih bolesti. Nebriga o unosu dovoljne količine vitamina, minerala i elemenata u tragovima potrebnim za održavanje stanične ravnoteže pridonosi nastanku ovih bolesti.

Takav način prehrane preporučuje više dokazano korisnih dijeta od kojih je našem podneblju i mentalitetu vjerojatno najbliža mediteranska dijeta. Ova se vrsta prehrane temelji na čestoj konzumaciji maslinova ulja, mahunarki, integralnih žitarica, voća i povrća, umjerenom konzumaciji ribe, mliječnih proizvoda i vina te povremenoj konzumaciji mesa (Magriplis *i ostali*, 2019). Mediteranska dijeta nije vegetarijanska jer se najviše konzumiraju riba i morski plodovi (Widmer *i ostali*, 2015). Budući da se mediteranska prehrana temelji na namirnicama iz zemalja gdje se uzgajaju masline i proizvodi maslinovo ulje, temelj mediteranske prehrane je korištenje maslinovog ulja. Mlijeko se ne konzumira u velikim količinama, a više se konzumiraju sir i jogurt. Alkohol se konzumira umjereno i najčešće uz jelo, a najviše se pije vino. Bitno je spomenuti da se mediteranskom dijetom jede jako malo rafiniranih ugljikohidrata te prerađenih i polugotovih proizvoda. Bioaktivne komponente posebno su značajne u voću i povrću koje je izrazito zastupljeno u mediteranskoj prehrani. Većina njih ima antioksidacijsko djelovanje (Ignarro *i ostali*, 2007). Bogatom i raznovrsnom mediteranskom dijetom zadovoljene su sve potrebe organizma za energijom i nutrijentima. Mesom i ribom je osigurana potrebna količina vitamina B12 i željeza, a voćem i povrćem sva potrebna količina antioksidansa, vitamina i minerala. Mediteranska dijeta smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti, a pretpostavlja se da se redovitom konzumacijom maslinovog ulja smanjuje rizik od nastanka raka, oboljenja od kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti (Rees *i ostali*, 2013).

### 1.3 Utjecaj tjelesne aktivnosti na kardiovaskularne bolesti

Uz dijetnu prehranu svakodnevna umjerena tjelesna aktivnost povoljno djeluje na održavanje tjelesne težine, kao i na poboljšanje lipidnog profila. Pretjeranim dnevnim unosom kalorija te nedovoljnom tjelesnom aktivnošću dolazi se do stanja pretjerane uhranjenosti, a smanjenjem tjelesne težine kardiovaskularnih bolesnika smanjuje se rizik od smrti 1,5 – 2 puta (Gabrić, 2016).

Zadnjih desetljeća nedovoljna tjelesna aktivnost nedvojbeno se, na osnovi niza znanstvenih studija, pokazala jednim od neovisnih značajnih čimbenika rizika te se redovita tjelesna aktivnost i tjelovježba smatra jednom od nužnih mjera prevencije razvoja kroničnih srčano-žilnih i metaboličkih bolesti (Vuori, 2010). Razina funkcionalne sposobnosti i tjelesne spremnosti značajno je negativno povezana s rizicima za razvoj kroničnih srčano-žilnih kao što su npr. debljina, rizična distribucija tjelesne masti, arterijska hipertenzija, povišene masnoće u krvi (Carnethon *i ostali*, 2003; Hamer i Steptoe, 2009; Talbot *i ostali*, 2009).

Koristi povezane sa zdravljem treninga jakosti i mišićne izdržljivosti brojne su i razlikuju se ovisno o modalitetu treninga (Pollock *i ostali*, 2000). Zadnjih petnaestak godina ti oblici vježbanja dio su uobičajenih preporuka za redovito tjelesno vježbanje povezano sa zdravljem. U usporedbi s treningom aerobne izdržljivosti, dobro je poznato da trening jakosti i mišićne izdržljivosti dovodi do znatno manjeg poboljšanja aerobnog kapaciteta i rizičnih čimbenika za razvoj kardiovaskularnih bolesti te do većeg povećanja mišićne jakosti, mišićne izdržljivosti i mišićne mase, održavanje ili povećanje koštane mase. Trening jakosti i snage utječe na redukciju tjelesne masti, posebno visceralne masti. Održanje mišićne mase i mišićnog fitnesa, posebno donjih udova vezano je za održanje mobilnosti i samostalnosti u starijoj životnoj dobi (Reid *i ostali*, 2008). Manji je broj studija koje su o povezanosti mišićne jakosti s kardiovaskularnim rizicima, ali čini se da mišićna jakost čini zaštitu od debljine i posebno nakupljanja abdominalne tjelesne masti i s njom povezanih kroničnih metaboličkih i kardiovaskularnih bolesti te stoga ne treba ustrajati samo na treninzima aerobne izdržljivosti (npr. trčanje, intervalni trening i sl.) (Jackson *i ostali*, 2010).

### 1.4 Antioksidansi u prehrani

Potencijalna uloga nutritivnih antioksidansa u prevenciji i liječenju kardiovaskularnih bolesti, posebno ateroskleroze i raka, intenzivno se istražuje u posljednja četiri desetljeća (Gutteridge i

Halliwell, 1993; Halliwell, 1999). Epidemiološki podaci ukazuju na to da su uzimanje hrane bogate antioksidansima (pretežito betakaroten, vitamin C i vitamin E) te visoka koncentracija antioksidansa u krvi povezani sa smanjenim rizikom oboljenja od kardiovaskularnih bolesti i raka. Prema dostupnim podacima, zaštita od oksidacijskih oštećenja najbolje se stvara uzimanjem hrane bogate raznolikim antioksidansima dostupnim u voću i povrću.

Karotenoidi su fitokemikalije koje djeluju kao snažni antioksidansi i imaju antikancerogena svojstva (Russell i Paiva, 1999). To su pigmenti topljivi u masti koje nalazimo u narančastom, žutom, crvenom i zelenom voću i povrću koji ih štite od stalne izloženosti sunčevom UV zračenju.

Osnovno svojstvo vitamina E u tijelu je da djeluje kao antioksidans (Rizvi *i ostali*, 2014). Topljiv je u mastima te stoga djeluje kao zaštitnik masnih struktura u tijelu. Prema dosadašnjim istraživanjima, čini se da vitamin E djeluje preventivno na pojavu karcinoma, bolesti srca i komplikacija dijabetesa.

Budući da je vitamin C topljiv u vodi, ovaj nutrijent svoju ulogu obavlja u vodenom okružju u tijelu (Chambial *i ostali*, 2013). Također, štiti LDL kolesterol od oksidacije, pomaže u zaštiti od raka, kardiovaskularnih bolesti i nekih učinaka starenja. Dvostruki nobelovac, dr. Linus Pauling prvi je spoznao izrazitu važnost vitamina C u održanju snažnog imunološkog sustava. Iako je konvencionalna medicinska zajednica osudila ovakav Paulingov stav, ovaj veliki znanstvenik imao je velik broj sljedbenika koji su isprobavali utjecaj visokih doza vitamina C na sebi i svojim bližnjima (Bendich i Langseth, 1995).

## 1.5 „Francuski paradoks“

„Francuski paradoks“ odnosi se na pojavu da se kod Francuza bilježi manja stopa smrtnosti i obolijevanja od kardiovaskularnih bolesti, iako njihova prehrana u prosjeku sadrži veću količinu zasićenih masnih kiselina nego prosječna prehrana stanovništva ostalih razvijenih zemalja, posebice Amerikanaca (Renaud i de Lorgeril, 1992; Clauss i Breusch, 2019). Prvotne studije tog fenomena pokazale su da konzumiranje umjerene količine vina može smanjiti rizik od bolesti srca i do 30%. Smatralo se da je za to zaslužan alkohol ili neka druga komponenta prisutna u crnom vinu (Davies *i ostali*, 2017).

Posebnu pažnju na ‘francuski paradoks’ u kontekstu konzumacije crnog vina skrenula je vrlo popularna televizijska emisija u Americi 1991. godine pod nazivom „60 minutes“, ističući rad francuskog znanstvenika Sergea Renauda sa Sveučilišta Bordeaux, čije su studije pokazale kako umjerenom konzumacijom crnog vina možemo smanjiti rizik od koronarnih oboljenja. Nakon toga potrošnja vina u Americi porasla je za 44%.

Kasnije studije, koje su proučavale antioksidativna svojstva crnog vina pokazale su da polifenol imena resveratrol, izoliran iz crnog vina, inhibira oksidaciju LDL-kolesterola, prekidajući prvi korak stvaranja masnih naslaga uz stijenku arterija.

Također, novija istraživanja potvrđuju kako čuvanje vina u hrastovim bačvama kroz vremenski period od najmanje godinu dana, pridonosi razvoju ovog, ali i drugih u vinu prisutnih polifenola. Ono što se u posljednje vrijeme često navodi kao objašnjenje „francuskog paradoksa“ jest i niz prehrambenih, kulturoloških i socioloških čimbenika, koji razlikuju Francuze, ali i većinu stanovništva mediteranskih zemalja, od stanovništva ostalih razvijenih zemalja (Renaud i Gueguen, 1998).

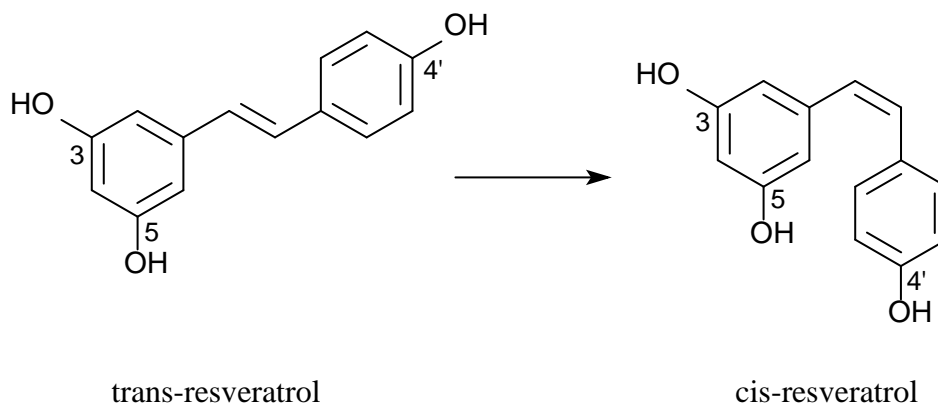
## 1.6 Resveratrol

Resveratrol ( $C_{14}H_{12}O_3$ ) je stilbenoid, vrsta prirodnog fenola (Siemann i Creasy, 1992) (Slika 1.). Pronađen je u vinovoj lozi (*Vitis vinifera*). Resveratrol proizvodi tkivo lišća biljaka kao odgovor na gljivičnu infekciju ili izloženost UV zračenju. 1992. godine spoj je pronađen i u vinu.

Resveratrol i stilbenoidi su uobičajeno pronađeni u mnogim biljkama iako su njihovi prehrambeni izvori prilično ograničeni (Guerrero *i ostali*, 2009). Nalazi se u kikirikiju i njegovim derivatima, pistacijama, šumskom voću, tamnoj čokoladi i grožđu te njegovim derivatima. Od svih navedenih u grožđu se može pronaći najveća količina, a crveno vino je najznačajniji prehrambeni izvor resveratrola.

Resveratrol se nalazi u sjemenkama i pokožici grožđa pa stoga i u soku od grožđa i vinu (Carando *i ostali*, 1999; Landrault *i ostali*, 2002). Njegova koncentracija u crvenom vinu je veća nego u bijelom jer su u procesu proizvodnje crvenog vina koža grožđa i sjemenke često u kontaktu tijekom fermentacije. Također, količina resveratrola pronađena u ružičastim vinima (Rosé) spada između razina resveratrola u crvenom (1,90 mg/L) i bijelom vinu (0,13 mg/L). Količina resveratrola u vinu

široko varira ovisno o puno čimbenika: vrsti grožđa, geografskoj regiji, agronomskim čimbenicima, klimatskim uvjetima, stanju biljke te enološkoj praksi (Pace-Asciak *i ostali*, 1995; Vrhovsek *i ostali*, 1997). Teško je predvidjeti količinu resveratrola koju će vino sadržavati jer puno čimbenika utječe na biosintezu resveratrola. Opisani su slučajevi kada resveratrol nije pronađen u vinu do onih kada je koncentracija bila 14,3 mg/L (Frémont, 2000).



**Slika 1.** Prikaz kemijske strukture resveratrola.<sup>1</sup>

## 1.7 Biosinteza i metabolizam resveratrola

Resveratrol, većinski građen od fenola, sintetiziran je od fenilalanina u metaboličkom putu koji se naziva šikimatski (Fritzemeier i Kindl, 1981). Šikimatski put je put u sedam metaboličkih koraka koji koriste bakterije, arheje, gljive, alge, neke praživotinje i biljke za biosintezu folata i aromatičnih aminokiselina. Tri ključna enzima uključena su u ovaj metabolički put: fenilalanin amonij liaza, koenzim A i pinosilvin sintaza. Biosinteza navedenih enzima može biti inducirana stresom. Resveratrol se u prirodi pojavljuje kao trans- i kao cis-stereoizomer, ali se kao trans-stereoizomer pojavljuje češće te se smatra sterički stabilnijim i biološki aktivnijim (Morris *i ostali*, 2015).

Prisutnost resveratrola u grožđu ovisi o stupnju izloženosti stresu. Napad patogena, kemijski tretmani prije berbe (npr. 2,1,3-benzotiadiazol i hitozan) i UV zračenje su potencijalni faktori koji

<sup>1</sup> Izvor: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/af/Trans-cis-resveratrol.svg>  
Pancrat, CC BY-SA 3.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>>, via Wikimedia Commons



moгу povećati količinu resveratrola u grožđu, a posljedično i u vinu (Roldán *i ostali*, 2003; Iriti *i ostali*, 2004; Guerrero *i ostali*, 2010). Drugi način predložen kao odgovaran za povećanje resveratrola u vinu je uporaba genetički modificiranog kvasca (Becker *i ostali*, 2003).

Dva tipa kemijskih reakcija vode do stvaranja derivata stilbenoida iz trans-resveratrola (početnog spoja) u osjetljivim vinovim lozama i otpornim sortama (Pezet *i ostali*, 2004). U osjetljivoj vinovoj lozi resveratrol je sintetiziran u velikim količinama odmah nakon infekcije, ali se brzo pretvara u neotrovni glukozid: piceid. U otpornim sortama resveratrol se također sintetizira u velikim količinama, ali u ovom kemijskom okruženju se brzo oksidira u toksični viniferin.

Brojna istraživanja na životinjama i ljudima pokazala su da je bioraspoloživost nekonjugiranog resveratrola niska (Walle *i ostali*, 2004). Najmanje 70% progutanog resveratrola bude apsorbirano te se lako metabolizira uglavnom u derivate glukuronida i sulfata. Metaboliti resveratrola dostižu svoju maksimalnu koncentraciju u plazmi otprilike 30 minuta nakon unosa. Vrijeme poluraspada ukupnih metabolita je oko 9,2 sata. Pet različitih metabolita prisutno je u urinu nakon umjerene konzumacije crvenog vina: resveratrol monosulfat, dva izomera resveratrol monoglukuronida, dihidroresveratrol monosulfat i dihidroresveratrol (Wang *i ostali*, 2005).

U istraživanjima *in vitro* dokazano je antikancerogeno djelovanje resveratrola u dozama između 5 i 100 mM, a doza potrebna za prevenciju kardiovaskularnih bolesti je između 100 nM i 1 mM što znači da je u malim dozama resveratrol farmakološki aktivan *in vitro* i *in vivo* (Bertelli, 2007). Autori ovih istraživanja predložili su da bi prosječna osoba koja pije vino mogla, osobito dugoročno gledano, prikupiti dovoljnu količinu resveratrola koja bi objasnila povoljan učinak crnog vina na zdravlje ljudi. To bi također moglo pomoći u objašnjenju kako relativno niska doza resveratrola dobivenog iz crnog vina ili drugih prehrambenih izvora može imati terapijsko djelovanje u nekim slučajevima.

Resveratrol se veže na albumin. Postoji mogućnost da je albumin spremište prirodnih polifenola koje može odigrati ključnu ulogu u distribuciji i bioraspoloživosti resveratrola (Jannin *i ostali*, 2004). Akumulacija resveratrola u drugim organima, npr. srcu, jetri i plućima, nakon kronične primjene opisana je prvi puta 1996. godine, a kasnije dokazana te proširena i na neke druge organe: žuč, želudac i bubrege (Bertelli *i ostali*, 1996; De Santi *i ostali*, 2000).

Bitno je uzeti u obzir moguće interakcije resveratrola s ostalim sastavnicama prehrane. Dokazano je da resveratrol sinergizira s kvercetinom i elaginskom kiselinom u indukciji apoptoze

leukemijskih stanica u ljudi (Mertens-Talcott i Percival, 2005), s etanolom u inhibiciji ekspresije gena za inducibilnu sintazu dušikovog oksida (Man-Ying Chan *i ostali*, 2000), s vitaminom E u prevenciji peroksidacije lipida (Fang *i ostali*, 2002), s katehinom u zaštiti PC12 stanica od toksičnosti  $\beta$ -amiloida (Conte *i ostali*, 2003), s nukleozidnim analogima u inhibiciji replikacije HIV1 u kultiviranim T limfocitima (Heredia *i ostali*, 2000) te s tirosolom i  $\beta$ -sitosterolom u modulaciji LDL oksidacijskog stresa i PGE2 sinteze (Vivancos i Moreno, 2008).

## 1.8 Dobrobiti resveratrola

Resveratrol ima unutarnji antioksidativni kapacitet koji se može povezati s njegovim kemopreventivnim efektima (Wenzel *i ostali*, 2005). *In vitro*, dokazana je indukcija detoksifikacije enzima nakon niskih doza resveratrola. *In vivo*, pokazalo se da resveratrol povećava antioksidativni kapacitet plazme te smanjuje peroksidaciju lipida što je snažno povezano s rizikom od koronarnih bolesti srca te srčanim udarom. Istraživanja na štakorima, svinjama i ljudima ukazuju na to da resveratrol može spriječiti patološka povećanja u peroksidaciji lipida i ostalih makromolekula *in vivo* iako nije sasvim jasno je li mehanizam direktan, indirektan ili oboje (Baur *i ostali*, 2006).

Resveratrol štiti kardiovaskularni sustav na više načina. Najvažnije od svega je da pri niskim koncentracijama inhibira apoptozu pa time osigurava zaštitu od raznih bolesti uključujući ishemijsku bolest srca, aterosklerozu i ventrikularnu aritmiju. U većim dozama olakšava apoptozu stanice i ponaša se kao kemo-preventivna alternativa (Hao i He, 2004; Das i Das, 2007).

Resveratrol također modulira metabolizam lipida i lipoproteina (Arichi *i ostali*, 1982). Dokazano je da resveratrol inhibira taloženje kolesterola i triglicerida u jetri štakora i smanjuje stopu sinteze triglicerida jetre.

Agregacija trombocita najviše doprinosi procesu ateroskleroze (Bertelli *i ostali*, 1995). Resveratrol sprječava sljepljivanje trombocita i smanjuje formiranje plaka nastalog aterosklerozom te vraća dilataciju posredovanu protokom kod kunića hranjenih hranom s visokim kolesterolom (Wang *i ostali*, 2005). Također, promiče vazodilataciju kroz više mehanizama, ali uglavnom stimulacijom kalijevih kanala aktiviranih ionima  $\text{Ca}^{2+}$  (Li *i ostali*, 2000).

Resveratrol može usporiti razvoj tumora kroz nekoliko komplementarnih mehanizama.

## 1.9 Oksidacijski stres

Oksidacijski stres je definiran kao poremećaj u ravnoteži između antioksidansa i prooksidansa (slobodni radikali i ostale reaktivne vrste) koji se očituje u povećanoj koncentraciji prooksidansa što potencijalno vodi oštećenju stanica (Halliwell *i ostali*, 1997; Sies, 1997; Betteridge, 2000). Ovaj poremećaj u ravnoteži može nastati kao posljedica iscrpljivanja endogenih antioksidansa ili kao rezultat loše prehrane, odnosno unošenjem premale količine antioksidansa, ali također i povećanim stvaranjem slobodnih radikala i ostalih reaktivnih vrsta (Södergren, 2000).

Oksidacijska oštećenja na DNA, proteinima i lipidima mogu dovesti do neorganiziranosti, neučinkovitosti i destrukcije membrana, enzima i proteina (Slater, 1984; Halliwell, 1994; Halliwell *i ostali*, 1997). Konkretno, peroksidacija membranskih lipida može uzrokovati pogoršanje funkcija membrane, smanjenu fluidnost, inaktivaciju receptora i enzima na membrani, povećanu propusnost za ione i moguće puknuće membrane (Halliwell i Gutteridge, 1990; Gutteridge, 1995).

Veliko oksidacijsko oštećenje može uzrokovati i smrt stanice. Smrt se može dogoditi u obliku nekroze, ali u nekim stanicama, npr. živčanim stanicama, blagi oksidacijski stres može biti okidač za apoptozu aktivirajući intrinzične puteve za samoubojstvo stanice (Dyrbukt *i ostali*, 1994; Stoian *i ostali*, 1996; Halliwell *i ostali*, 1997; Hampton i Orrenius, 1997).

## 1.10 Slobodni radikali

Slobodni radikali mogu nastati u tijelu djelovanjem vanjskih i unutarnjih čimbenika.

Vanjski uzroci nastanka slobodnih radikala su: ionizacijsko zračenje, UV zračenje, onečišćeni okoliš, teški metali i metaloidi, pesticidi, policiklički aromatski ugljikovodici, pušenje duhanskih proizvoda, ali i djelovanje nekih lijekova (Halliwell *i ostali*, 1993, 1995; Rice-Evans i Burdon, 1993; Halliwell, 1994; Sies, 1999; Betteridge, 2000; Södergren, 2000; Limón-Pacheco i Gonsebatt, 2009).

Najčešći unutarnji uzroci nastanka slobodnih radikala su: reakcije oksidacije, aktivnost enzima, transportni lanac elektrona u procesu staničnog disanja i stanice imunološkog sustava koje imaju sposobnost fagocitoze pa stvaraju reaktivne čestice kisika kako bi uništile mikroorganizme (Slater, 1984; Halliwell, 1994).

Oštećenja slobodnim radikalima mogu se nakupljati tijekom vremena te u konačnici time doprinijeti ozljedi stanice i razvitku bolesti organizma (Southorn i Powis, 1988; Halliwell i Gutteridge, 1990; Gutteridge i Halliwell, 1993; Delanty i Dichter, 1998; Sastre *i ostali*, 2000). Slobodni radikali mogu biti upleteni u razvoj bolesti kao što su ateroskleroza, dijabetes, rak, kronične upalne bolesti i neurodegenerativne bolesti, a također i u proces starenja. U najviše slučajeva, slobodni radikali se smatraju komponentom patologije bolesti i proizlaze u manjoj ili većoj mjeri kao posljedica pritajene bolesti.

Najčešći slobodni radikali su kisikove čestice velike reaktivnosti (eng. reactive oxygen species, ROS). U te čestice ubrajaju se: hidroksil radikal ( $\text{OH}\cdot$ ), superoksid radikal anion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) i vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Manje česti slobodni radikali su dušikov monoksid radikal ( $\text{NO}\cdot$ ), dušikov dioksid radikal ( $\text{NO}_2\cdot$ ), peroksinitrit ( $\text{ONOO}^{\cdot-}$ ), alkoksi radikal ( $\text{RO}\cdot$ ), peroksil radikal ( $\text{ROO}\cdot$ ) i triklorometil radikal ( $\text{CCl}_3\cdot$ ) (Södergren, 2000).

### 1.10.1 Čimbenici oksidacijskog stresa u organizmu

Budući da je slobodne radikale u organizmu komplicirano izravno mjeriti, mjerimo čimbenike oksidacijskog oštećenja stanica ili enzime koji u organizmu imaju ulogu hvatanja slobodnih radikala (Cherubini *i ostali*, 2005).

Kao biološki markeri oksidacijskog stresa u ovom istraživanju mjereni su malondialdehid kao pokazatelj oksidacijskog oštećenja lipida i glutation koji ima ulogu antioksidansa.

### 1.10.2 Glutation

Glutation (GSH) je tripeptid, topljiv u vodi, prisutan i u prokariotima i u eukariotima, koji se sastoji od aminokiselina glutamina, cisteina i glicina. Tiolna skupina je jako redukcijsko sredstvo, a GSH je najobilniji nositelj tiolne skupine u stanicama te u nekim tkivima dostiže koncentracije u milimolima. Kao važan antioksidans, GSH ima ulogu u detoksifikaciji u organizmu. Uz to, uloga GSH postoji i u drugim staničnim reakcijama: ciklus glioksalaze, redukcija ribonukleotida u deoksiribonukleotide i regulacija proteina i ekspresije gena putem tiolne skupine (Townsend *i ostali*, 2003; Perricone *i ostali*, 2009). Glutation disulfid (GSSG) postoji u takvom obliku nakon

oksidacije. Ponekad se ova molekula naziva „oksidirani glutation“ iako, osim toga, postoje i drugi produkti oksidacije koji također nastaju iz GSH (Sies, 1999).

U reduciranom obliku glutaciona cisteinska skupina može donirati elektron. Doniranjem elektrona smanjuje se reaktivnost drugih molekula, ali GSH postaje reaktivan te se povezivanjem s drugim reaktivnim GSH stvara oksidirani oblik GSSG. U navedenim reakcijama sudjeluje enzim glutation-peroksidaza koji u stanicama (citosolu i mitohondrijima) može metabolizirati vodikov peroksid i organske perokside (Limón-Pacheco i Gonsebatt, 2009; Lu, 2009).

U reakciji GSH i cisteina u oksidiranom obliku nastaju mješoviti disulfidi koji se kasnije mogu reducirati. Oni štite osjetljive proteinske tirole od oksidacijskih oštećenja te sprječavaju gubitak GSH u oksidacijskim uvjetima. Ovakvim načinom se također sprječava nakupljanje GSSG u stanicama. Održavanjem stalne ravnoteže između GSH i GSSG održava se redukcijski potencijal u stanici (Fernández-Checa *i ostali*, 1997; Lu, 2009).

### 1.10.3 Malondialdehid

Od svih bioloških meta oksidacijskog stresa, lipidi su najpogođenija skupina biomolekula. Oksidacija lipida povećava broj sekundarnih produkata koji su uglavnom aldehidi. Malondialdehid (MDA) je osnovni i najviše istražen produkt peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina. To je aldehyd koji je vrlo toksičan jer je njegova interakcija s DNA i proteinima često povezana s potencijalno mutagenom (Del Rio *i ostali*, 2005). Slobodni radikali primaju vodik iz masnih kiselina. Kako bi molekula ostala stabilna, veze se preuređuju i dolazi do daljnjih reakcija sa slobodnim radikalima. Tako nastaje lančana reakcija koja se širi na ostale masne kiseline i nastaju lipidni hidroperoksidi, čijim raspadom nastaje, među ostalim produktima, i MDA (Halliwell *i ostali*, 1993; Gutteridge, 1995; Södergren, 2000; Del Rio *i ostali*, 2005).

## 2. Cilj istraživanja

U ovom će se istraživanju u krvnoj plazmi mjeriti biološki markeri oksidacijskog stresa malondialdehid (MDA) kao pokazatelj oksidacijskog oštećenja lipida i reducirani glutation (GSH) koji ima ulogu antioksidansa u stanicama. Čimbenici oksidacijskog stresa mjeriti će se u dvije skupine: jedna je skupina primala resveratrol, a kontrolna je skupina primala placebo (laktulozu).

Ciljevi istraživanja su usporedba koncentracija MDA i GSH izmjerenih u plazmi pacijenata podvrgnutim operaciji zamjene srčanog zaliska uzorkovanih tijekom pet vremenskih točaka (T1 – T5), usporedba dobivenih koncentracija MDA i GSH između kontrolne skupine i skupine koja je primala RSV te određivanje utjecaja RSV-a na mjerene čimbenike.

## 3. Materijali i metode

### 3.1 Kemikalije

- 1, 1, 3, 3 – tetrametoksi propan, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzoat (DTNB), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Butilirani hidroksitoluen (BHT), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Fosforna kiselina,  $H_3PO_4$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Glutation (GSH), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Kalijev dihidrogenfosfat,  $KH_2PO_4$ , Merck, Darmstadt, Njemačka
- Kalijev hidroksid, KOH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Klorovodična kiselina, HCl, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Metanol HPLC čistoće,  $CH_3OH$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev dihidrogenfosfat dodekahidrat,  $Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidrogenkarbonat,  $NaHCO_3$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidroksid, NaOH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Resveratrol,  $C_{14}H_{12}O_3$ , Solgar, Leonia, New Jersey, SAD
- Tiobarbituratna kiselina (TBA), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Trikloroctena kiselina,  $CCl_3COOH$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Triton X-100, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, SAD
- Ultračista voda za HPLC (18 $\Omega$ ) proizvedena je u Milli-Q Gradient sustavu za vodu (Thermo Scientific Smart2pure 3 UV/UF)

### 3.2 Instrumenti

- Analitička vaga, Mettler Toledo, XN105DR
- Analitička vaga, Mettler Toledo, AE 200

- Spektrofotometar Cecil 9000
- HPLC sistem, Shimadzu, Kyoto, Japan
  - Degaser (uređaj za uklanjanje otopljenih plinova) DGU 20A3
  - Gradijentna pumpa LC 20AD SP
  - UV-VIS detektor SPD 20AV
  - Fluorescentni detektor RF 20A
  - Termostat za kolonu CTO 20A
  - Autosampler – automatski uzorkivač SII 20 AC HT
  - Komunikator s računalom CBM 20A
- pH metar, SevenEasy, Mettler Toledo

### 3.3 Priprema pufera i otopina

- Natrij fosfatni pufer, pH = 7,4 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )
- **5%-tna trikloroctena kiselina**
- **DTNB** ( $c = 1 \text{ mmoldm}^{-3}$ )
- **0,2%-tni BHT**
- **6%-tna TBA**
- **1%-tna  $\text{H}_3\text{PO}_4$**
- **$\text{KH}_2\text{PO}_4$**  ( $c = 50 \text{ mmoldm}^{-3}$ )

### 3.4 Plan pokusa i uzimanja krvi

Pacijenti (N=34) su nakon primanja u bolnicu radi operacije zamjene aortnog zaliska bili podijeljeni u dvije skupine: jedna skupina je primala resveratrol (Resveratrol Solgar kapsule 2x400 mg/dan) dok je kontrolna skupina primala placebo istovjetnog izgleda kao i testni tretman (laktulozu). Tretman je započeo 48 sati prije i završio 78 sata nakon operacije.

Krv je uzimana u pet vremenskih točaka:

- T1 - tijekom prijema u bolnicu
- T2 - nakon indukcije u anesteziju
- T3 - po dolasku u jedinicu intenzivnog liječenja



- T4 - 24 sata nakon operacije
- T5 - 78 sati nakon operacije

Krv je centrifugirana te su izdvojeni uzorci plazme koji su smrznuti na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize. U krvnoj plazmi mjereni su čimbenici oksidacijskog stresa u pet vremenskih točaka. Navedeno je istraživanje odobrilo Etičko povjerenstvo Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, a bolesnici su prije uključivanja u istraživanje potpisali odobreni informirani pristanak.

## 3.5 Metode

### 3.5.1 Mjerenje koncentracije glutationa

Glutation je analiziran prema metodi po Ellmanu (Ellman, 1958). Pripremljene su otopine slijepa proba, standarda i uzoraka kao što je prikazano u Tablici 1.

**Tablica 1.** Protokol za mjerenje GSH u slijepoj probi, otopini standarda i uzorcima.

Otopina slijepa probe	Otopina standarda	Otopina uzorka
100 $\mu\text{L}$ H <sub>2</sub> O	100 $\mu\text{L}$ standarda	100 $\mu\text{L}$ krvne plazme
850 $\mu\text{L}$ Na-fosfatnog pufera	850 $\mu\text{L}$ Na-fosfatnog pufera	850 $\mu\text{L}$ Na-fosfatnog pufera
50 $\mu\text{L}$ DTNB	50 $\mu\text{L}$ DTNB	50 $\mu\text{L}$ DTNB

Apsorbancija slijepa probe, standarda i uzoraka mjerena je spektrofotometrom (Cecil 9000, Cambridge, UK) na 412 nm. Apsorbancija GSH mjerena je u duplikatu. DTNB je dodan neposredno prije mjerenja apsorbancije svakog uzorka jer je razmjerno nestabilan pri sobnoj temperaturi. Svaki uzorak promiješan je na vortex mješalici. Mjerenje je provedeno tako da se paralelno mjerila apsorbancija slijepa probe i standarda ili pojedinih uzoraka. Koncentracija GSH izračunata je iz kalibracijske krivulje standarda i izražena kao nanomol po mililitru plazme.

### 3.5.2 Mjerenje koncentracije malondialdehida

Malondialdehid je analiziran u plazmi prema metodi Drury i suradnika (Drury *i ostali*, 1997). U 50  $\mu\text{L}$  uzorka (plazma) ili standarda (2.5  $\mu\text{M}$  1,1,3,3-tetraetoksipropan) dodano je 5  $\mu\text{L}$  BHT (0.2%, w/v), 750  $\mu\text{L}$  fosforne kiseline (1%, v/v), 250  $\mu\text{L}$  TBA (0.6%, w/v) i 445  $\mu\text{L}$  vode. Uzorci su promiješani i držani u kipućoj vodenoj kupelji 30 minuta. Reakcija je zaustavljena hlađenjem u

vodi i 20  $\mu\text{L}$  uzorka injektirano je u HPLC. Iz mobilne faze koja se sastojala od 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i metanola (60:40, v/v, pH 6,8) uklonjen je otopljeni zrak u ultrazvučnoj kupelji (15 minuta). Protok mobilne faze bio je  $1 \text{ mLmin}^{-1}$ . MDA je mjereno UV detektorom pri valnoj duljini od 532 nm. Temperatura kolone bila je  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pri tim uvjetima vrijeme zadržavanja MDA na koloni bilo je 2,5 minute. Koncentracija MDA je izračunata iz kalibracijske krivulje i izražena kao nanomol po mililitru plazme.

### 3.5.2.1 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti sastoji se od uređaja koji uklanja otopljene plinove, izokratne i gradijentne pumpe, termostiranog prostora za kolonu, UV i fluorescentnog detektora (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Za mjerenje koncentracije MDA korištena je kromatografska kolona obrnute faze C-18 s česticama veličine  $5 \mu\text{m}$  (Zorbax Eclipse Plus, Agilent,  $4.6 \times 250 \text{ mm}$ ) te kromatografska pretkolona s česticama veličine  $5 \mu\text{m}$  (Zorbax Eclipse Plus, Agilent,  $4.6 \times 12.5 \text{ mm}$ ).

## 3.6 Statistička obrada podataka

Analiza podataka i grafovi napravljeni su u programu GraphPad Prism za Windows, verzija 5. Svi izmjereni čimbenici prikazani su kao srednje vrijednosti i standardne devijacije, a analizirani su koristeći Tukey's multiple comparison test u ANOVI. P - vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima.

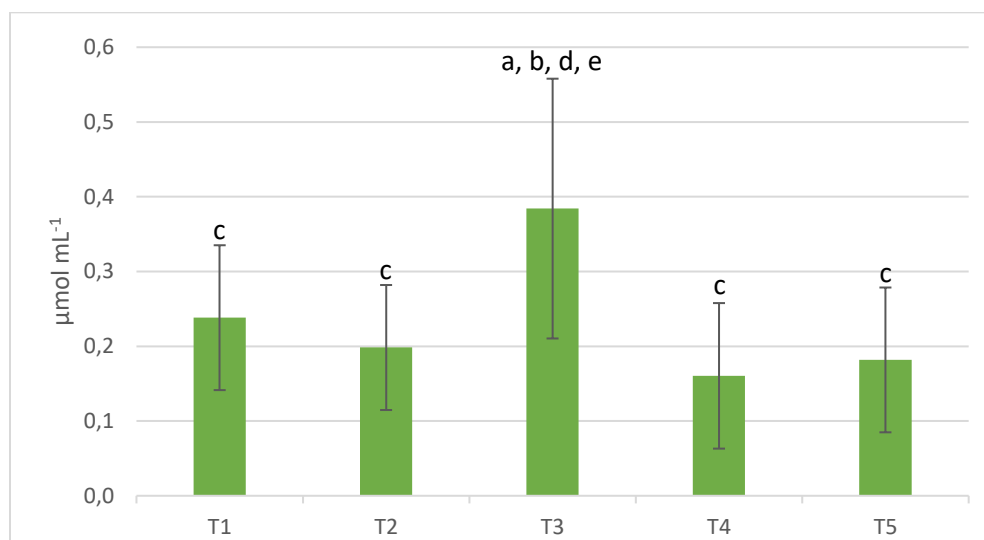
## 4. Rezultati

### 4.1 Uvod

Rezultati prikazani u ovom radu dobiveni su u istraživanju provedenom na 34 pacijenta koji su bili podvrgnuti operaciji zamjene srčanog zaliska. Prije operacije bili su podijeljeni u dvije skupine. Jedna skupina primala je resveratrol, a druga placebo kapsule istovjetnog izgleda (laktulozu). Tretman je započeo 2 dana prije operacije, a završio 3. dan nakon operacije. Primali su 2x400 mg resveratrola ili laktuloze dnevno. Krv pacijenata je uzimana u pet vremenskih točaka (prije, tijekom i poslije operacije) te centrifugirana. Uzorci krvne plazme su bili zaleđeni na -20 °C do analize. U krvnoj plazmi mjereni su parametri oksidacijskog stresa u svih pet vremenskih točaka kako bi se prema koncentraciji parametara odredilo ima li resveratrol, primjenjivan u ovoj dozi i vremenskom intervalu, utjecaja na smanjenje oksidacijskog stresa kod srčanih bolesnika podvrgnutih operaciji srčanog zaliska.

### 4.2 Glutation

Koncentracija GSH u plazmi uzorkovanoj u pet vremenskih točaka u pacijenata koji su dobili placebo prikazana je na Slici 2., a u pacijenata koji su dobili resveratrol na Slici 3.

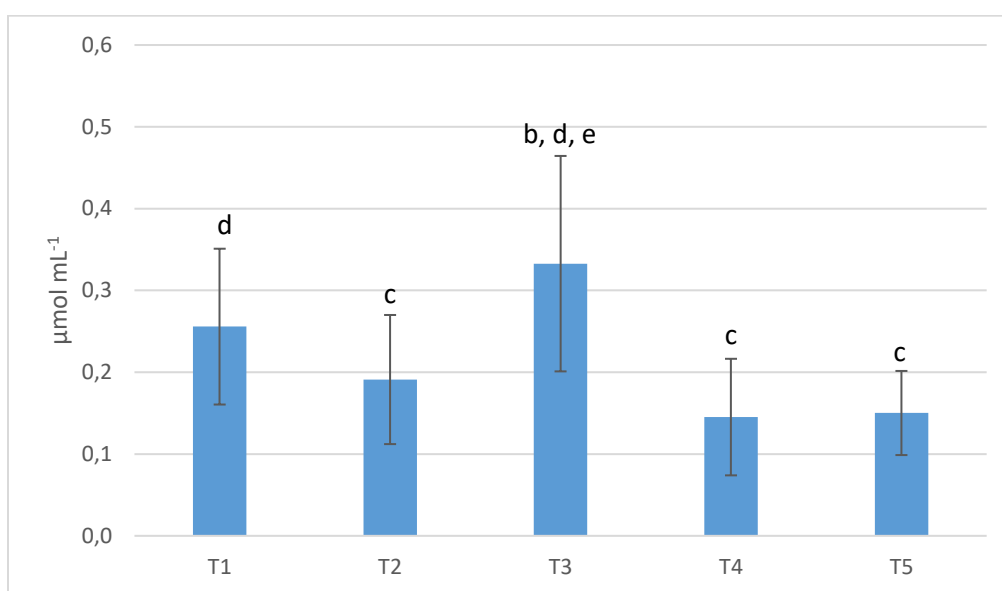


**Slika 2.** Koncentracija reduciranoga glutationa u plazmi pacijenata koji su primali placebo izmjerena u pet vremenskih točaka: T1 - nakon prijema pacijenta u bolnicu, T2 - nakon indukcije pacijenta u anesteziju, T3 - po dolasku pacijenta u jedinicu intenzivnog liječenja, T4 - 24 sata nakon operacije i T5 - 78 sati nakon operacije.

(a - različito od T1, b - različito od T2, c - različito od T3, d - različito od T4, e - različito od T5)

Najviša koncentracija GSH u pacijenata koji su primali placebo izmjerena je nakon operacije, po dolasku u jedinicu intenzivnog liječenja (vremenska točka T3). Malo niža koncentracija GSH izmjerena je prije operacije, tijekom prijema u bolnicu (točka T1). U točkama T2 (nakon indukcije u anesteziju) i T5 (78 sati nakon operacije) izmjerena je približna koncentracija GSH, dok je najniža koncentracija izmjerena u točki T4 (24 sata nakon operacije).

Koncentracija GSH izmjerena u plazmi uzorkovanoj po dolasku pacijenta u jedinicu intenzivnog liječenja bila je statistički značajno viša od koncentracije GSH u svim ostalim točkama. Koncentracija GSH u ostalim točkama nije se međusobno statistički značajno razlikovala.



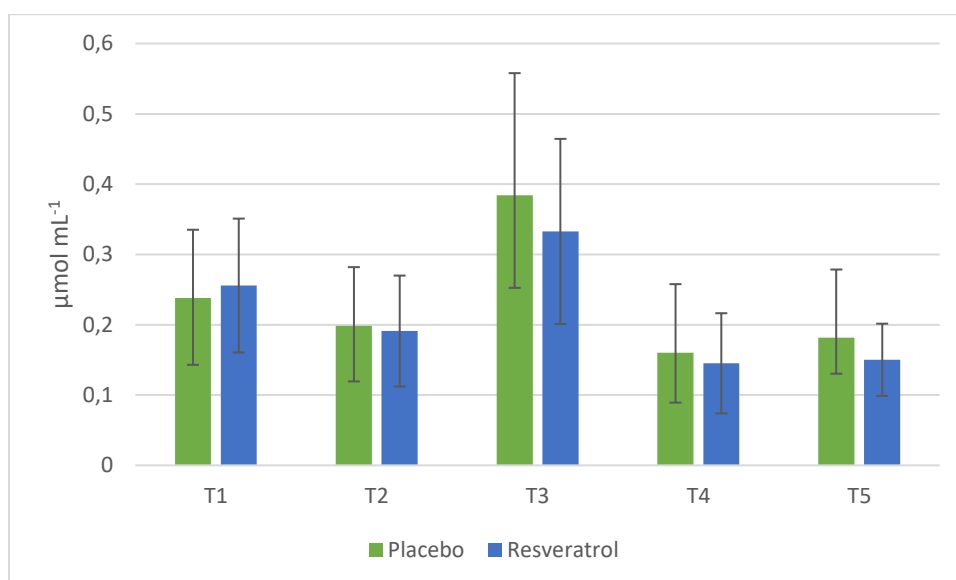
**Slika 3.** Koncentracija reduciranoga glutationa u plazmi pacijenata koji su primali resveratrol (2x400 mg/dan) izmjerena u pet vremenskih točaka: T1 - nakon prijema pacijenta u bolnicu, T2 - nakon indukcije pacijenta u anesteziju, T3 - po dolasku pacijenta u jedinicu intenzivnog liječenja, T4 - 24 sata nakon operacije i T5 - 78 sati nakon operacije. (a - različito od T1, b - različito od T2, c - različito od T3, d - različito od T4, e - različito od T5)

Najviša koncentracija GSH u plazmi pacijenata koji su primali resveratrol izmjerena je nakon operacije, po dolasku u jedinicu intenzivnog liječenja (vremenska točka T3). Slijede ju koncentracije GSH izmjerene tijekom prijema u bolnicu (točka T1) pa točka T2 (nakon indukcije u anesteziju) i T5 (78 sati nakon početka operacije) u kojim je izmjerena približna koncentracija GSH. Najniža koncentracija izmjerena je u točki T4 (24 sata nakon operacije).

Koncentracija GSH izmjerena u plazmi uzorkovanoj po dolasku pacijenta u jedinicu intenzivnog liječenja bila je statistički značajno viša od koncentracije GSH u točkama T2, T4 i T5. Statistički se međusobno razlikuju i izmjerene koncentracije u točkama T1 i T4 (tijekom prijema u bolnicu i 24 sata nakon operacije) gdje je koncentracija GSH niža u točki T4.

#### 4.2.1 Usporedba rezultata GSH u obje skupine

Uspoređene vrijednosti koncentracija GSH u plazmi pacijenata koji su dobivali placebo te u skupine koja je dobivala resveratrol prikazane su na Slici 4.

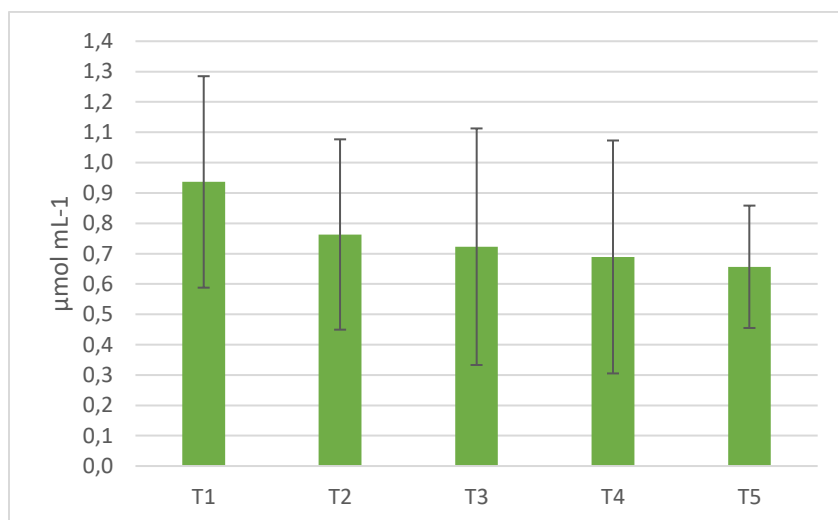


**Slika 4.** Usporedba koncentracija GSH u plazmi pacijenata, koji su primali placebo i resveratrol (2x400 mg/dan), izmjerenih u pet vremenskih točaka: T1 - nakon prijema pacijenta u bolnicu, T2 - nakon indukcije pacijenta u anesteziju, T3 - po dolasku pacijenta u jedinicu intenzivnog liječenja, T4 - 24 sata nakon operacije i T5 - 78 sati nakon operacije.

Vrijednosti koncentracija GSH u obje skupine slične su u svim mjerenim točkama te nema statistički značajne razlike.

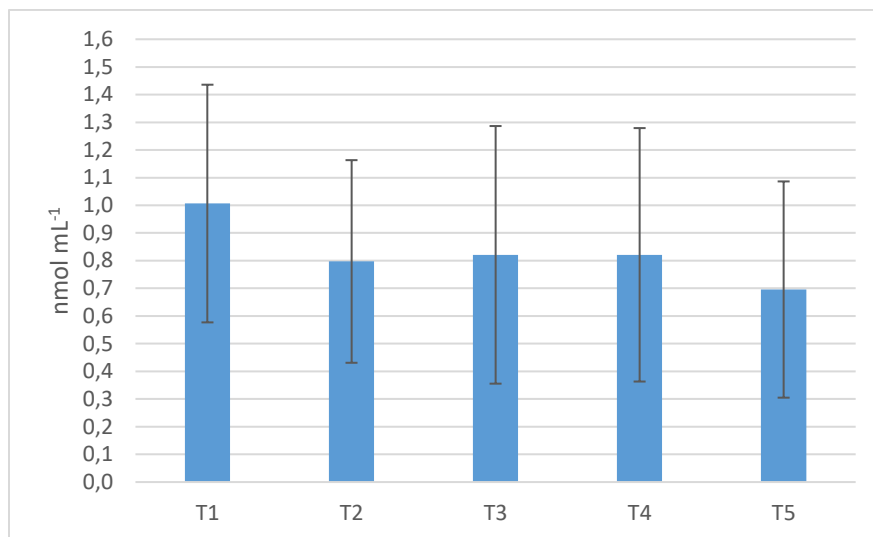
### 4.3 Malondialdehid

Koncentracija MDA u plazmi pacijenata uzorkovanoj u pet vremenskih točaka u pacijenata koji su dobili placebo prikazana je na Slici 5., a u pacijenata koji su dobili resveratrol na Slici 6.



**Slika 5.** Koncentracija malondialdehida u plazmi pacijenata koji su primali placebo izmjerena u pet vremenskih točaka: T1 - nakon prijema pacijenta u bolnicu, T2 - nakon indukcije pacijenta u anesteziju, T3 - po dolasku pacijenta u jedinicu intenzivnog liječenja, T4 - 24 sata nakon operacije i T5 - 78 sati nakon operacije.

Koncentracija MDA izmjerena u plazmi pacijenata koji su primali placebo najveća je tijekom prijema u bolnicu (točka T1) te se lagano smanjuje prema točki T5. Koncentracije MDA u izmjerenim točkama nisu međusobno statistički značajne.

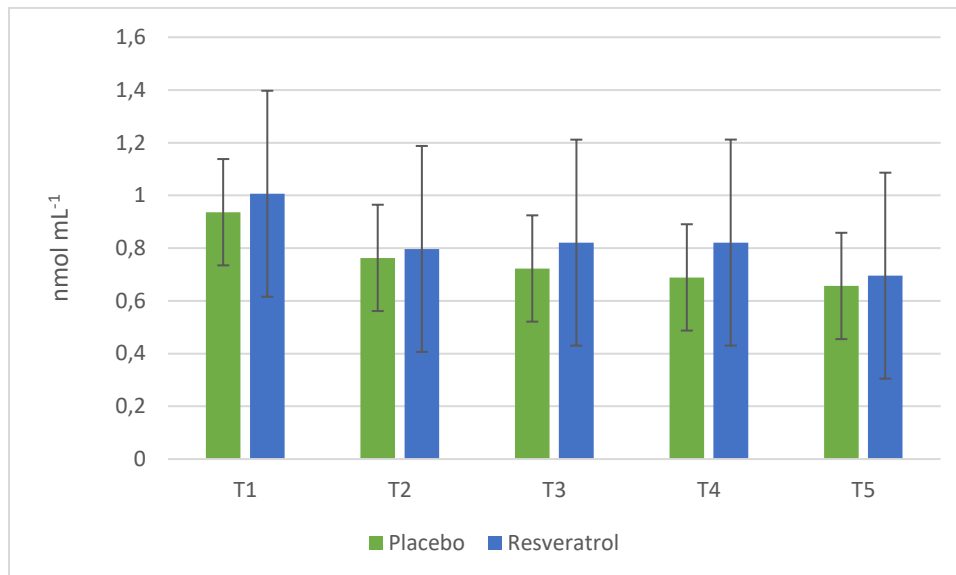


**Slika 6.** Koncentracija malondialdehida u plazmi pacijenata koji su primali resveratrol (2x400 mg/dan) izmjerena u pet vremenskih točaka: T1 - nakon prijema pacijenta u bolnicu, T2 - nakon indukcije pacijenta u anesteziju, T3 - po dolasku pacijenta u jedinicu intenzivnog liječenja, T4 - 24 sata nakon operacije i T5 - 78 sati nakon operacije.

Koncentracija MDA izmjerena u plazmi pacijenata koji su primali resveratrol najveća je tijekom prijema u bolnicu (točka T1), a najmanja 78 sati nakon početka operacije (točka T5). U točkama T2 do T4 koncentracija MDA je približno ista. Koncentracije MDA u izmjerenim točkama nisu međusobno statistički značajne.

#### 4.3.1 Usporedba rezultata MDA u obje skupine

Uspoređene vrijednosti koncentracija MDA u plazmi pacijenata koji su dobivali placebo te u skupine koja je dobivala resveratrol prikazane su na Slici 7.



**Slika 7.** Usporedba koncentracija MDA u plazmi pacijenata, koji su primali placebo i resveratrol (2x400 mg/dan), izmjerenih u pet vremenskih točaka: T1 - nakon prijema pacijenta u bolnicu, T2 - nakon indukcije pacijenta u anesteziju, T3 - po dolasku pacijenta u jedinicu intenzivnog liječenja, T4 - 24 sata nakon operacije i T5 - 78 sati nakon operacije.

Vrijednosti koncentracija MDA u skupine koja je dobivala resveratrol su malo više u odnosu na koncentracije MDA izmjeren u plazmi pacijenata koji su dobili placebo, no u svim mjerenim točkama nema statistički značajne razlike između skupina.



## 5. Rasprava

Resveratrol je antioksidans koji se većinom može pronaći u tamnijem bobičastom voću, ali i u nekim drugim prehrambenim izvorima. Mnoga istraživanja su pokazala kemoprotektivni, antikancerogeni i kardioprotektivni učinak RSV-a *in vitro* i *in vivo*. Njegova bioraspoloživost u prirodi je niska pa se može unositi i u obliku kapsula. U istraživanju u ovom diplomskom radu pacijenti podvrgnuti operaciji srčanog zaliska primali su RSV kako bi se istražio njegov učinak na oksidacijski stres tijekom operacije. Jedna je skupina uzimala RSV u obliku kapsula u dozi od 800 mg po danu, dok je kontrolna skupina primala placebo, odnosno laktulozu, u obliku kapsula istovjetnog izgleda kapsulama RSV-a. Mjerena su dva čimbenika oksidacijskog stresa tijekom pet vremenskih točaka te je uspoređena koncentracija MDA i GSH u svim točkama u kontrolnoj skupini i skupini koja je primala RSV.

U istraživanju provedenom tijekom 12 tjedana na 60 pacijenata koji su bolovali od nealkoholne masne jetre, pacijenti su primali dnevnu dozu od 600 mg RSV ili placebo (Asghari *i ostali*, 2018). U pacijenata su nakon pokusa mjereni čimbenici oksidacijskog stresa u krvnom serumu: MDA, ox-LDL (lipoprotein), TAC (ukupni antioksidacijski kapacitet), SOD (enzim) i GSH-Px. Koncentracija MDA u skupine koja je primala RSV u odnosu na kontrolnu skupinu nije se razlikovala. U ovom su istraživanju pokazali da konzumacija RSV u dozi primjenjivanoj u istraživanju nije značajno utjecala ni na jedan od navedenih čimbenika oksidacijskog stresa te zaključuju da bi se u daljnjim istraživanjima trebala ispitati potencijalna optimalna terapijska doza RSV-a kod kojih je učinak značajniji.

U istraživanju prikazanom u ovom diplomskom radu nije se statistički značajno razlikovala koncentracija GSH i MDA u pacijenata koji su primali RSV u odnosu na pacijente koji su primali placebo.

Budući da laktuloza, koja je u ovom istraživanju korištena kao placebo, ima antioksidacijska svojstva, moguće je da je ona smanjila oksidacijski stres u kontrolnoj skupini (Chen *i ostali*, 2011). Također je u literaturi poznato da RSV ima nisku biodostupnost pa postoji mogućnost da je to također potencijalan razlog manjeg utjecaja RSV-a na GSH i MDA u pacijenata koji su primali RSV u odnosu na kontrolnu skupinu (Briskey i Rao, 2020).

Utjecaj RSV-a na oksidacijski stres istraživani je i u pacijenata koji su bolovali od ulceroznog kolitisa (bolest crijeva). Pacijenti su dobivali RSV (500 mg dnevno) ili placebo (mješavina srednjelančanih triglicerida), u razdoblju od 6 tjedana. Mjerena je koncentracija MDA u uzorcima krvi koja se značajno smanjila kod pacijenata koji su uzimali RSV (Samsamikor *i ostali*, 2016).

U navedenom je istraživanju doza RSV-a slična onoj koju su primali pacijenti u istraživanju prikazanom u ovom diplomskom radu, no duljina tretmana se razlikuje. Moguće je da je duljina tretmana u ovom istraživanju doprinijela smanjenju koncentracije MDA što se nije dogodilo u istraživanju prikazanom u ovom diplomskom radu budući da su pacijenti primali RSV samo nekoliko dana od primitka u bolnicu.

Koncentracija GSH i MDA mjerena je u uzorcima krvi zdravih ljudi koji su tijekom 30 dana uzimali prehrambene dodatke među kojima je bio i RSV (Di Pierro *i ostali*, 2020). 15 volontera, podijeljenih u 3 grupe, uzimali su prehrambene dodatke (ekstrakt zelenog čaja, ubikvinol, vitamin C i vitamin E) te među njima i RSV u dozi od 325 mg dnevno. U istraživanju je dobiveno da se koncentracija GSH značajno povećala kod skupine koja je uzimala ubikvinol u odnosu na skupine koje su uzimale ostale prehrambene dodatke. Koncentracija MDA se također smanjila kod pacijenata koji su uzimali ubikvinol u odnosu na ostale skupine. Zaključeno je da učinak samog RSV-a nije bio značajan u usporedbi s ostalim prehrambenim dodacima jer je bioraspoloživost resveratrola niska te to može objasniti oprečne dokaze u vezi s blagotvornim učincima ovog spoja *in vivo* i *in vitro*.

Utjecaj RSV-a na oksidacijski stres istraživani je i na eksperimentalnim životinjama (Zhu *i ostali*, 2014). U istraživanju provedenom na 30 muških miševa, koji su bili podijeljeni u tri skupine (skupina koja nije tretirana RSV-om, skupina koja je primala nisku dozu RSV-a od 2 g/kg prehrane i skupina koja je primala visoku dozu RSV-a od 4g/kg prehrane) tijekom 12 tjedana izmjereni su razni čimbenici oksidacijskog stresa iz uzoraka krvi i jetre. U uzorcima krvi miševa tretiranih RSV-om primijećeno je smanjenje koncentracije MDA, a u tkivu jetre povećanje koncentracije GSH u odnosu na kontrolnu skupinu. Zaključeno je da resveratrol može smanjiti oksidacijski stres i metaboličke poremećaje lipida.

Koncentracija MDA u serumu mjerena je u pacijenata (N=40) kojima je ugrađivana premosnica (Đorđević *i ostali*, 2020). Pacijentima je uzimana krv prije operacije, tijekom operacije (nakon uklanjanja stezaljke na aorti) te 12, 24, 48 i 72 sata nakon operacije. Koncentracija MDA bila je

statistički značajno povišena tijekom operacije, a najviša koncentracija zabilježena je 12 sati nakon operacije. Nakon te točke koncentracija MDA je počela padati, a 72 sata nakon operacije nije se statistički značajno razlikovala od vrijednosti prije operacije. Pacijenti nisu dobivali nikakve suplemente (vitamine, antioksidanse i ostalo) barem 36 sati prije odlaska na operaciju. Iz rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da sama operacija uzrokuje oksidacijski stres koji se smanjuje postoperativno.

U istraživanju prikazanom u ovom diplomskom radu koncentracija MDA nije se značajno promijenila prije, tijekom i nakon operacije. Moguće je da je RSV, iako kratkotrajno uziman prije operacije, ipak pridonio tome da oksidacijski stres tijekom operacije ne raste, odnosno da sama operacija ne utječe značajno na oksidacijsko oštećenje lipida vidljivo kao porast koncentracije MDA.

U drugom istraživanju, u kojem je pacijentima ugrađena premosnica, jedna je skupina pacijenta dobivala lijek alopurinol (600 mg prije operacije) dok kontrolna skupina nije dobivala terapiju (Popović *i ostali*, 1994). Mjereni su čimbenici oksidacijskog stresa u plazmi. Uzorci krvi uzeti su prije operacije, u četiri vremenska intervala tijekom operacije te nakon operacije. Kontrolna skupina imala je veći omjer oksidiranog i reduciranog glutationa u eritrocitima. U skupini koja je primala alopurinol, najviši omjer oksidiranog i reduciranog glutationa u eritrocitima izmjeren u drugoj točki (dvije minute nakon otpuštanja aortne stezaljke). Nakon operacije omjeri oksidiranog i reduciranog glutationa u eritrocitima su se izjednačili u kontrolnoj skupini i skupini koja je primala alopurinol. Koncentracija MDA u plazmi pacijenata koji su primali alopurinol bila je veća tijekom operacije u odnosu na kontrolnu skupinu. Najveća koncentracija MDA izmjerena je u drugoj točki (dvije minute nakon otpuštanja aortne stezaljke). Nakon operacije koncentracija MDA u plazmi se smanjila u obje skupine.

U istraživanju prikazanom u ovom diplomskom radu koncentracija GSH u plazmi nije se značajno razlikovala u skupine koja je primala RSV u odnosu na kontrolnu skupinu. Najviša, statistički značajno različita koncentracija GSH izmjerena je u točki T3 – nakon dolaska pacijenata u jedinicu intenzivnog liječenja i to u obje skupine. Nakon 24, odnosno 78 sati poslije operacije, koncentracija GSH u plazmi se smanjila na razinu prije operacije. Budući da pojedini anestetici imaju dokazano antioksidacijsko djelovanje (Kundović *i ostali*, 2020), moguće je da je povećana koncentracija GSH po dolasku u jedinicu intenzivnog liječenja rezultat uzimanja RSV-a i djelovanja anestetika.

## 6. Zaključak

Koncentracija GSH i MDA ne razlikuje se statistički u plazmi pacijenata koji su primali RSV u odnosu na kontrolnu skupinu koja je primala placebo. Ovaj rezultat upućuje na moguće antioksidacijsko djelovanje laktuloze te na potrebu dugotrajnijeg uzimanja RSV-a u svrhu postizanja njegovog antioksidacijskog djelovanja. Nepromijenjena koncentracija MDA u svim točkama upućuje na nepostojanje oksidacijskog oštećenja lipida tijekom operacije. Koncentracija GSH značajno je povećana u plazmi pacijenata po dolasku u jedinicu intenzivnog liječenja. Moguće je da je ovo povećanje rezultat antioksidacijskog djelovanja anestetika. Rezultati ova dva čimbenika oksidacijskog stresa prikazana u ovom diplomskom radu ukazuju na malene promjene oksidacijskog stresa tijekom operacije zamjerne aortnog zaliska te protektivno djelovanje RSV-a i upućuju na potrebu mjerenja većeg broja čimbenika kako bismo dobili potpuniji uvid u utjecaj RSV-a na oksidacijski stres tijekom operacija.

## 7. Literatura

1. Arichi, H. *i ostali* (1982) „Effects of Stilbene Components of the Roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb, et Zucc. on Lipid Metabolism“, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 30(5), str. 1766–1770.
2. Asghari, S. *i ostali* (2018) „Effects of pharmacologic dose of resveratrol supplementation on oxidative/antioxidative status biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease patients: A randomized, double-blind, placebo- controlled trial“, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 8(2), str. 307–317.
3. Baur, J. A. *i ostali* (2006) „Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet“, *Nature*, 444(7117), str. 337–342.
4. Bays, H. E. *i ostali* (2021) „Ten things to know about ten cardiovascular disease risk factors“, *American Journal of Preventive Cardiology*, 5, str. 100149.
5. Becker, J. V. W. *i ostali* (2003) „Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol“, *FEMS Yeast Research*, 4(1), str. 79–85.
6. Bendich, A. i Langseth, L. (1995) „The Health Effects Of Vitamin C Supplementation: A Review“, *Journal of the American College of Nutrition*. J Am Coll Nutr, str. 124–136.
7. Bertelli, A. A. E. *i ostali* (1995) „Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine“, *International Journal of Tissue Reactions*, 17(1), str. 1–3.
8. Bertelli, A. A. E. *i ostali* (1996) „Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats“, *International Journal of Tissue Reactions*, 18(2–3), str. 67–71.
9. Bertelli, A. A. E. (2007) „Wine, research and cardiovascular disease: Instructions for use“, *Atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, str. 242–247.
10. Betteridge, D. J. (2000) „What is oxidative stress?“, u *Metabolism: Clinical and Experimental*. W.B. Saunders, str. 3–8.
11. Briskey, D. i Rao, A. (2020) „Trans-resveratrol oral bioavailability in humans using lipisperse™ dispersion technology“, *Pharmaceutics*, 12(12), str. 1–11.
12. Carando, S. *i ostali* (1999) „High-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection for the determination of trans-astringin in wine“, *Journal of Chromatography A*, 849(2), str. 617–620.
13. Carnethon, M. R. *i ostali* (2003) „Cardiorespiratory Fitness in Young Adulthood and the Development of Cardiovascular Disease Risk Factors“, *Journal of the American Medical Association*, 290(23), str. 3092–3100.
14. Chambial, S. *i ostali* (2013) „Vitamin C in disease prevention and cure: An overview“, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. Springer, str. 314–328.
15. Chen, X. *i ostali* (2011) „Lactulose: An indirect antioxidant ameliorating inflammatory bowel disease by increasing hydrogen production“, *Medical Hypotheses*, 76(3), str. 325–327.
16. Cherubini, A. *i ostali* (2005) „Potential markers of oxidative stress in stroke“, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., str. 841–852.
17. Clauss, M. i Breusch, S. J. (2019) „The ‘French paradox’ may not be a paradox after all – But for what reason?“, *Bone and Joint Research*. British Editorial Society of Bone and Joint Surgery, str. 1–2.
18. Conte, A., Pellegrini, S. i Tagliazucchi, D. (2003) „Synergistic protection of PC12 cells from  $\beta$ -amyloid toxicity by resveratrol and catechin“, *Brain Research Bulletin*, 62(1), str.

- 29–38.
19. Ćurin, K. (2001) „Uloga antioksidansa u prehrani i prevenciji kardiovaskularnih bolesti“, *Medica Jadertina*, 31(1–2), str. 29–39.
  20. Das, S. i Das, D. K. (2007) „Anti-inflammatory responses of resveratrol“, *Inflammation and Allergy - Drug Targets*, str. 168–173.
  21. Davies, J. M. S. *i ostali* (2017) „The Oxygen Paradox, the French Paradox, and age-related diseases“, *GeroScience*. Springer International Publishing, str. 499–550.
  22. Delanty, N. i Dichter, M. A. (1998) „Oxidative injury in the nervous system“, *Acta Neurologica Scandinavica*, 98(3), str. 145–153.
  23. Djordjević, A. *i ostali* (2020) „Pharmacodynamics of malondialdehyde as indirect oxidative stress marker after arrested-heart cardiopulmonary bypass surgery“, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 132(110877), str. 1–5.
  24. Drury, J. A., Nycyk, J. A. i Cooke, R. W. I. (1997) „Comparison of urinary and plasma malondialdehyde in preterm infants“, *Clinica Chimica Acta*, 263(2), str. 177–185.
  25. Dypbukt, J. M. *i ostali* (1994) „Different Prooxidant Levels Stimulate Growth, Trigger Apoptosis, or Produce Necrosis of Insulin-secreting RINm5F Cells. The role of intracellular polyamines“, *Journal of Biological Chemistry*, 269(48), str. 30553–60.
  26. Ellman, G. L. (1958) „A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans“, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 74(2), str. 443–450.
  27. Fang, J.-G. *i ostali* (2002) „Antioxidant Effects of Resveratrol and its Analogues against the Free-Radical-Induced Peroxidation of Linoleic Acid in Micelles“, *Chemistry - A European Journal*, 8(18), str. 4191–4198. .
  28. Frémont, L. (2000) „Minireview: Biological effects of resveratrol“, *Life Sciences*. Pergamon, str. 663–673.
  29. Fritzscheier, K. H. i Kindl, H. (1981) „Coordinate induction by UV light of stilbene synthase, phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase in leaves of vitaceae“, *Planta*, 151(1), str. 48–52.
  30. Gabrić, I. D. (2016) Prehrana i kardiovaskularno zdravlje, *Medicus*. Pliva Hrvatska d.o.o.
  31. Guerrero, R. F. *i ostali* (2009) „Wine, Resveratrol and Health: A Review“, *Natural Product Communications*, 4(5), str. 1934578X0900400.
  32. Guerrero, R. F. *i ostali* (2010) „Induction of stilbenes in grapes by UV-C: Comparison of different subspecies of Vitis“, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1), str. 231–238.
  33. Gutteridge, J. M. C. (1995) „Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage“, *European Beckman Conference Clinical Chemistry*.
  34. Gutteridge, J. M. C. i Halliwell, B. (1993) „Invited review free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence“, *Free Radical Research*, 19(3), str. 141–158.
  35. Halliwell, B. *i ostali* (1993) „Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance“, u *American Journal of Clinical Nutrition*. Am J Clin Nutr.
  36. Halliwell, B. (1994) „Free Radicals and Antioxidants: A Personal View“, *Nutrition Reviews*. Nutr Rev, str. 253–265.
  37. Halliwell, B. *i ostali* (1995) „Free Radicals and Antioxidants in Food and In Vivo: What They Do and How They Work“, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(1–2), str. 7–20.
  38. Halliwell, B. *i ostali* (1997) „Antioxidants and human disease: A general introduction“, u *Nutrition Reviews*. Blackwell Publishing Inc., str. S44–S49.
  39. Halliwell, B. (1999) „Establishing the significance and optimal intake of dietary

- antioxidants: The biomarker concept“, *Nutrition Reviews*. International Life Sciences Institute, str. 104–113.
40. Halliwell, B. i Gutteridge, J. M. C. (1990) „Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview“, *Methods in Enzymology*, 186(C), str. 1–85.
  41. Hamer, M. i Steptoe, A. (2009) „Prospective study of physical fitness, adiposity, and inflammatory markers in healthy middle-aged men and women“, *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(1), str. 85–89.
  42. Hampton, M. B. i Orrenius, S. (1997) „Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: Implications for apoptosis“, *FEBS Letters*, 414(3), str. 552–556.
  43. Hao, H. D. i He, L. R. (2004) „Mechanisms of cardiovascular protection by resveratrol“, *Journal of Medicinal Food*. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA , str. 290–298.
  44. Heredia, A., Davis, C. i Redfield, R. (2000) „Synergistic inhibition of HIV-1 in activated and resting peripheral blood mononuclear cells, monocyte-derived macrophages, and selected drug-resistant isolates with nucleoside analogues combined with a natural product, resveratrol“, *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 25(3), str. 246–255.
  45. Ignarro, L. J., Balestrieri, M. L. i Napoli, C. (2007) „Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: An update“, *Cardiovascular Research*. Cardiovasc Res, str. 326–340.
  46. Iriti, M. i ostali (2004) „Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*“, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), str. 4406–4413.
  47. Jackson, A. W. i ostali (2010) „Muscular strength is inversely related to prevalence and incidence of obesity in adult men“, *Obesity*, 18(10), str. 1988–1995.
  48. Jannin, B. i ostali (2004) „Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: Plasmatic protein binding and cell uptake“, u *Biochemical Pharmacology*. Biochem Pharmacol, str. 1113–1118.
  49. Kundović, S. A. i ostali (2020) „Oxidative stress under general intravenous and inhalation anaesthesia“, *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 71(3), str. 169–177.
  50. Landrault, N. i ostali (2002) „Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot development“, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), str. 2046–2052.
  51. Li, H. F., Chen, S. A. i Wu, S. N. (2000) „Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells“, *Cardiovascular Research*, 45(4), str. 1035–1045.
  52. Limón-Pacheco, J. i Gonsébat, M. E. (2009) „The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress“, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. Elsevier, str. 137–147.
  53. Macesic, B. i Spehar, B. (2013) „Prevention of cardiovascular diseases in primary health care“, *Sestrinski glasnik/Nursing Journal*, 18(3), str. 194–198.
  54. Magriplis, E., Andreou, E. i Zampelas, A. (2019) „The Mediterranean Diet: What It Is and Its Effect on Abdominal Obesity“, u *Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity*. Elsevier, str. 281–299.
  55. Man-Ying Chan, M. i ostali (2000) „Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway“, *Biochemical Pharmacology*, 60(10), str. 1539–1548.

56. Mertens-Talcott, S. U. i Percival, S. S. (2005) „Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells“, *Cancer Letters*, 218(2), str. 141–151.
57. Morris, V. L. *i ostali* (2015) „Anti-tumor properties of cis-resveratrol methylated analogs in metastatic mouse melanoma cells“, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 402(1–2), str. 83–91.
58. Pace-Asciak, C. R. *i ostali* (1995) „The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease“, *Clinica Chimica Acta*, 235(2), str. 207–219.
59. Pezet, R. *i ostali* (2004) „Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew“, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(6), str. 297–303.
60. Di Pierro, D. *i ostali* (2020) „Effects of oral administration of common antioxidant supplements on the energy metabolism of red blood cells. Attenuation of oxidative stress-induced changes in Rett syndrome erythrocytes by CoQ10“, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 463(1–2), str. 101–113.
61. Pollock, M. L. *i ostali* (2000) „Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: Benefits, rationale, safety, and prescription: An advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association“, *Circulation*, 101(7), str. 828–833.
62. Rees, K. *i ostali* (2013) „Mediterranean‘ dietary pattern for the primary prevention of cardiovascular disease“, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd.
63. Reid, K. F. *i ostali* (2008) „Lower extremity power training in elderly subjects with mobility limitations: A randomized controlled trial“, *Aging Clinical and Experimental Research*, 20(4), str. 337–343.
64. Renaud, S. i Gueguen, R. (1998) „The French paradox and wine drinking“, *Novartis Foundation Symposium*, 216(216), str. 208–222.
65. Renaud, S. i de Lorgeril, M. (1992) „Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease“, *The Lancet*, 339(8808), str. 1523–1526.
66. Rice-Evans, C. i Burdon, R. (1993) „Free radical-lipid interactions and their pathological consequences“, *Progress in Lipid Research*. Prog Lipid Res, str. 71–110.
67. Rizvi, S. *i ostali* (2014) „The role of Vitamin E in human health and some diseases“, *Sultan Qaboos University Medical Journal*. Sultan Qaboos University, str. 157–165.
68. Roldán, A. *i ostali* (2003) „Resveratrol Content of Palomino fino Grapes: Influence of Vintage and Fungal Infection“, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), str. 1464–1468
69. Russell, R. M. i Paiva, S. A. R. (1999) „β-Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants“, *Journal of the American College of Nutrition*, 18(5), str. 426–433.
70. Samsamikor, M. *i ostali* (2016) „Resveratrol Supplementation and Oxidative/Anti-Oxidative Status in Patients with Ulcerative Colitis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Pilot Study“, *Archives of Medical Research*, 47(4), str. 304–309.
71. De Santi, C. *i ostali* (2000) „Sulphation of resveratrol, a natural product present in grapes and wine, in the human liver and duodenum“, *Xenobiotica*, 30(6), str. 609–617.
72. Sastre, J. *i ostali* (2000) „Mitochondria, oxidative stress and aging“, *Free Radical Research*. Harwood Academic Publishers GmbH, str. 189–198.



73. Siemann, E. H. i Creasy, L. L. (1992) „Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine“, *American Journal of Enology and Viticulture*, 43(1), str. 49–52.
74. Sies, H. (1997) „Oxidative stress: oxidants and antioxidants“, *Experimental Physiology*, 82(2), str. 291–295.
75. Sies, H. (1999) „Glutathione and its role in cellular functions“, u *Free Radical Biology and Medicine*. Pergamon, str. 916–921.
76. Slater, T. F. (1984) „Free-radical mechanisms in tissue injury.“, *The Biochemical journal*. Biochem J, str. 1–15.
77. Södergren, E. (2000) „Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 949 Lipid Peroxidation in vivo Evaluation and Application of Methods for Measurement“.
78. Southorn, P. A. i Powis, G. (1988) „Free Radicals in Medicine. II. Involvement in Human Disease“, *Mayo Clinic Proceedings*. Mayo Clin Proc, str. 390–408.
79. Stoian, I., Oros, A. i Moldoveanu, E. (1996) „Apoptosis and free radicals“, *Biochemical and Molecular Medicine*, 59(2), str. 93–97.
80. Talbot, L. A., Weinstein, A. A. i Fleg, J. L. (2009) „Army physical fitness test scores predict coronary heart disease risk in Army National Guard soldiers“, *Military Medicine*, 174(3), str. 245–252.
81. Vivancos, M. i Moreno, J. J. (2008) „Effect of resveratrol, tyrosol and  $\beta$ -sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages“, *British Journal of Nutrition*, 99(6), str. 1199–1207.
82. Vrhovsek, U., Wendelin, S. i Eder, R. (1997) „Effects of Various Vinification Techniques on the Concentration of cis- and trans-Resveratrol and Resveratrol Glucoside Isomers in Wine“, *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(2), str. 214–219.
83. Vuori, I. (2010) „Physical activity and cardiovascular disease“, *Kinesiology*. Kineziološki fakultet, Hrvatska
84. Walle, T. i ostali (2004) „High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans“, *Drug Metabolism and Disposition*, 32(12), str. 1377–1382.
85. Wang, D. i ostali (2005) „Identification of the major metabolites of resveratrol in rat urine by HPLC-MS/MS“, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 829(1–2), str. 97–106.
86. Wenzel, E. i ostali (2005) „Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats“, *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(5), str. 482–494.
87. Widmer, R. J. i ostali (2015) „The Mediterranean diet, its components, and cardiovascular disease“, *American Journal of Medicine*. Elsevier Inc., str. 229–238.
88. Zhu, W. i ostali (2014) „Effects and mechanisms of resveratrol on the amelioration of oxidative stress and hepatic steatosis in KKAY mice“, *Nutrition and Metabolism*, 11(1).
89. Zoran, P. i ostali (1994) „Effects of allopurinol on oxygen stress status during open heart surgery“, *International Journal of Cardiology*, 44(2), str. 123–129.

## 8. Životopis

Rođena sam u Slavonskom Brodu 1995. godine. Nakon završene Osnovne škole Mate Lovraka u Županji, pohađala sam Prirodoslovno - matematičku gimnaziju u Županji. Akademske godine 2014./2015. upisala sam Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Biologija i kemija na Prirodoslovno - matematičkom fakultetu u Zagrebu.

S obzirom na to da su moji interesi više usmjereni na medicinu i fiziologiju čovjeka pri kraju studija obavila sam stručnu praksu na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu te je iz istraživanja provedenog u Jedinici za toksikologiju nastao moj diplomski rad. Tijekom studiranja volontirala sam u projektu Znanstvene čarolije kao član studentske sekcije Hrvatskog kemijskog društva.