

Utjecaj nanokristala resveratrola na Ehrlichov ascitesni tumor i njihov učinak na jetru i bubrež miša

Đermanović, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:161370>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-26**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Matea Đermanović

**Utjecaj nanokristala resveratrola na Ehrlichov ascitesni
tumor i njihov učinak na jetru i bubrež miša**

Diplomski rad

Zagreb, 2019. godina

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za Animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF – a, pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić te na Klinici za tumore, Službi za patologiju Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu uz pomoć dipl. ing. biol. Snježane Ramić. Predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc., Nadi Oršolić na predloženoj temi, nesebičnoj pomoći, savjetima, znanstvenom i stručnom vodstvu tijekom izrade rada.

Zahvaljujem dipl. ing. biol., Snježani Ramić na izdvojenom vremenu, pomoći i savjetima tijekom izrade rada na Klinici za tumore.

Od srca hvala mojim kolegama na zavodu, posebice asistentici Dyani Odeh na pristupačnosti i nesebičnoj pomoći tijekom izrade rada.

Zahvaljujem svojim roditeljima i sestri Andrei na razumijevanju i podršci tijekom studiranja, svojim prijateljicama na moralnoj podršci i svome dečku na nesebičnoj ljubavi i razumijevanju.

Najveća zahvala ide mojoj majci čije su me molitve pratile kroz cijelo moje studiranje!

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

UTJECAJ NANOKRISTALA RESVERATROLA NA EHRLICHOV ASCITESNI TUMOR
I NJIHOV UČINAK NA JETRU I BUBREG MIŠA

Matea Đermanović

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Cilj rada je bio istražiti učinke resveratrola i njegovih nanokristala u dozi od 25 mg/kg na inhibiciju rasta Ehrlichovog ascitesnog tumora (EAT), broj krvnih žila u peritoneumu i mehanizam stanične smrti, te istražiti odnos između razine oštećenja jetre i bubrega kroz histološku analizu prisutnosti stanica u mitozu, apoptozu i nekrozu te razine oksidacijskog stresa u njima. Tumor smo prouzročili intraperitonealnim (*ip*) injiciranjem $2,5 \times 10^6$ EAT stanica u trbušnu šupljinu miševa soja Swiss albino. Obrada životinja s EAT tumorom po skupinama započeta je idućeg dana *ip* injiciranjem resveratrola u dozi od 25 mg/kg i nanokristala resveratrola u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Kontrolna skupina obrađena je *ip* s fiziološkom otopinom. Rezultati ukazuju da resveratrol i nanokristali resveratrola imaju inhibicijski učinak na rast stanica tumora, antioksidacijski i zaštitni učinak te zaštitnu ulogu u očuvanju fiziološke funkcije bubrega i jetre. Mikroskopska analiza broja krvnih žila u peritonealnoj ovojnici potvrđuje veliki antiangiogeni potencijal resveratrola i njegovih nanokristala što posljedično vodi inhibiciji rasta tumora.

(96 stranica, 31 slika, 6 tablica, 124 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Ehrlichov ascitesni tumor, nanokristali resveratrola, resveratrol, angiogeneza, patohistološke promjene jetre i bubrega

Mentor: dr.sc. Nada Oršolić, red. prof. u trajnom zvanju

Ocjenjivači: dr.sc. Nada Oršolić, red. prof. u trajnom zvanju,

dr. sc. Sandra Radić Brkanac, izvanredni profesor,

dr. sc. Jasna Lajtner, izvanredni profesor

Rad prihvaćen: 18.9.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Graduation Thesis

Faculty of Science

Department of Biology

INFLUENCE APPLICATION OF RESVERATROL NANOCRYSTALS ON EHRlich
ASCITES TUMOR AND ITS EFFECTS ON LIVER AND KIDNEY OF MOUSE

Matea Đermanović

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The aim of the study was to investigate the effects of resveratrol and its nanocrystals at a dose of 25 mg/kg on inhibition of Ehrlich ascites tumor growth, blood count in the peritoneum and mechanism of cell death, and to investigate the relationship between liver and kidney damage levels through histological analysis of the presence of cells in mitosis, apoptosis and necrosis, and levels of oxidative stress in them. The tumor was caused by intraperitoneal (*ip*) injection of 2.5×10^6 cells into the abdominal cavity of Swiss albino mice. Treatment of animals with EAT tumor in groups was started the next day by injecting resveratrol at dose of 25 mg/kg and resveratrol nanocrystals at dose of 25 mg/kg every other day for 14 days. The control group was treated *ip* with saline. The results indicate that resveratrol and resveratrol nanocrystals have an inhibitory effect on tumor cell growth, an antioxidant and protective effect, and a protective role in preserving the physiological function of the kidney and liver. Microscopic analysis of the number of blood vessels in the peritoneal sheath confirms the great antiangiogenic potential of resveratrol and its nanocrystals, which in turn leads to inhibition of tumor growth.

(96 pages, 31 figures, 6 tables, 124 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Keywords: Ehrlich ascites tumor, resveratrol nanocrystals, resveratrol, angiogenesis, pathohistological changes of the liver and kidney

Supervisor: Nada Oršolić, PhD, Full Prof.

Reviewers: Nada Oršolić, PhD, Full Prof.,

Sandra Radić Brkanac, PhD, Associate Professor,

Jasna Lajtner, PhD, Associate Professor

Thesis accepted: 18.9.2019.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 TUMOR.....	1
1.2 NASTANAK TUMORA.....	1
1.3 GRAĐA, PODJELA I PODRIJETLO TUMORA.....	3
1.3.1 OSOVNE RAZLIKE IZMEĐU BENIGNIH I MALIGNIH TUMORA.....	4
1.4 RAST TUMORSKOG ČVORA.....	6
1.4.1 TUMORSKA ANGIOGENEZA.....	7
1.4.2 METASTAZIRANJE.....	8
1.5 MOLEKULARNA BIOLOGIJA TUMORA.....	9
1.6 TUMORSKA IMUNOLOGIJA.....	10
1.6.1 TUMORSKI ANTIGENI.....	11
1.6.2 STANIČNA IMUNOST.....	12
1.6.3 HUMORALNA IMUNOST.....	13
1.7 IMUNOTERAPIJA.....	14
1.8 RESVERATROL.....	15
1.9 NANOTEHNOLOGIJA.....	18
1.9.1 NANOKRISTALI.....	19
1.9.2 SVOJSTVA NANOKRISTALA.....	20
1.9.3 METODE IZRADE NANOKRISTALA.....	22
1.9.4 <i>IN VIVO</i> SUDBINA NANOKRISTALA.....	24
1.9.5 TOKSIČNOST NANOČESTICA.....	26
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	29
3. MATERIJALI I METODE.....	30
3.1 MATERIJALI.....	30
3.1.1 POKUSNE ŽIVOTINJE.....	30
3.1.2 TUMORSKE STANICE.....	30
3.1.3 RESVERATROL.....	31
3.1.4 LABORATORIJSKA OPREMA.....	31
3.2 METODE.....	32
3.2.1 OBRADA ŽIVOTINJA.....	32
3.2.2 PRAĆENJE PROMJENA TJELESNE MASE.....	32
3.2.3 ODREĐIVANJE UKUPNOG VOLUMENA PERITONEALNE TEKUĆINE I ODREĐIVANJE BROJA STANICA U PERITONEALNOJ TEKUĆINI.....	33
3.2.4 ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDACIJSKOG STRESA.....	33
3.2.5 HISTOLOŠKE METODE.....	39

3.3	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	40
4.	REZULTATI.....	41
4.1	PROMJENA MASE TUMORA	41
4.2	UKUPNI VOLUMEN PERITONEALNE TEKUĆINE	43
4.3	UKUPNI BROJ STANICA U PERITONEALNOJ TEKUĆINI.....	44
4.4	INHIBICIJA RASTA TUMORA	45
4.5	PROMJENA MASE UNUTARNJIH ORGANA	46
4.6	REZULTATI PARAMETARA OKSIDACIJSKOG STRESA.....	47
4.6.1	UKUPNI PROTEINI U UZORCIMA TKIVA JETRE MIŠEVA	47
4.6.2	MJERENJE RAZINE LIPIDNE PEROKSIDACIJE (MDA) U UZORCIMA TKIVA JETRE MIŠEVA	48
4.6.3	MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI KATALAZE (CAT) U UZORCIMA TKIVA JETRE MIŠEVA	49
4.6.4	MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DISMUTAZE (SOD) U UZORCIMA TKIVA JETRE MIŠEVA.....	50
4.6.5	MJERENJE RAZINE UKUPNOG GLUTATIONA (GSH) U UZORCIMA TKIVA JETRE MIŠEVA	51
4.6.6	UKUPNI PROTEINI U UZORCIMA TKIVA BUBREGA MIŠEVA	52
4.6.7	MJERENJE RAZINE LIPIDNE PEROKSIDACIJE (MDA) U UZORCIMA TKIVA BUBREGA MIŠEVA.....	53
4.6.8	MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI KATALAZE (CAT) U UZORCIMA TKIVA BUBREGA MIŠEVA.....	54
4.6.9	MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DISMUTAZE (SOD) U UZORCIMA TKIVA BUBREGA MIŠEVA	55
4.6.10	MJERENJE RAZINE UKUPNOG GLUTATIONA (GSH) U UZORCIMA TKIVA BUBREGA MIŠEVA.....	56
4.7	UČINAK NANOKRISTALA RESVERATROLA I RESVERATROLA NA ANGIOGENEZU.....	57
4.7.1	KVANTITATIVNO MJERENJE PROŽILJENOSTI PERITONEALNE OVOJNICE.....	57
4.7.2	KVANTITATIVNO MJERENJE PROŽILJENOSTI JETRE.....	60
4.7.3	KVANTITATIVNO MJERENJE PROŽILJENOSTI BUBREGA.....	62
4.8	UČINAK NANOKRISTALA RESVERATROLA I RESVERATROLA NA MITOZU I NEKROZU.....	64
4.8.1	KVANTITATIVNO MJERENJE STANICA U MITOZI U UZORCIMA JETRE	64
4.8.2	KVANTITATIVNO MJERENJE STANICA U NEKROZI U UZORCIMA JETRE	65

4.8.3 KVANTITATIVNO MJERENJE STANICA U MITOZI U UZORCIMA BUBREGA	66
4.8.4 KVANTITATIVNO MJERENJE STANICA U MITOZI U UZORCIMA ASCITESA	67
4.8.5 KVANTITATIVNO MJERENJE STANICA U NEKROZI U UZORCIMA ASCITESA	68
5. RASPRAVA	69
6. ZAKLJUČCI	76
7. LITERATURA:	77

1. UVOD

1.1 TUMOR

Tumor je pojam koji označava nakupinu promijenjenih stanica koje pokazuju nepravilan i progresivan rast. Tumor predstavlja oteklinu ili izraslinu koja nastaje bujanjem stanica što rezultira povećanjem tkiva ili organa ili pak nastaje zadržavanjem tekućine ili krvarenjem unutar tkiva što rezultira stvaranjem otoka. Takve otekline ili izrasline danas se još nazivaju i neoplazije (lat. *neoplasia*, -ae, f., - novotvorenine) ili blastomi (grč. *blastos*, -u, m., - klica + -sufiks -oma, novotvorina).

Novonastale tvorbe u organizmu, tzv. novotvorine, nastaju kao posljedica djelovanja različitih unutrašnjih i vanjskih čimbenika na organizam. Temeljna definicija koja potkrepljuje osobitosti tumora glasi: autonomni, nenormalni, nesvrshodni i neprestani rast atipičnih stanica koje postoje i nakon što je prestao djelovati početni čimbenik koji je ovakav rast prouzročio. U osnovi, tumori nastaju kad se izgubi normalna regulacija kontrolnih mehanizama rasta i diobe stanice. Ljudski tumori su monoklonalnog (unicelularnog) podrijetla, nastali od jedne transformirane stanice, što potvrđuju i dokazi da se u klonu svih stanica iste vrste tumora mogu naći zajednički biljezi.

1.2 NASTANAK TUMORA

Proces nastajanja tumora naziva se karcinogeneza. Karcinogeneza je proces koji se odvija u nekoliko stupnjeva, a središnji događaj predstavlja nesmrtno gensko oštećenje. Oštećenje gena može nastati kao posljedica vanjskih kancerogenih čimbenika poput kemijskih, fizikalnih, mehaničkih, virusnih ili kao posljedica spontanijh mutacija u organizmu.

Prvi stupanj karcinogeneze je inicijacija, a podrazumijeva izlaganje stanica određenoj dozi kancerogena koja dovodi do nastanka mutacija kao trajnih, ireverzibilnih promjena/oštećenja na DNA. Inicijacija je brzi i ireverzibilni proces koji samostalno ne može dovesti do nastanka tumora. Nakon inicijacije slijedi promocija, a karakterizira ju stimulacija proliferacije prethodno promijenjenih stanica. U ovoj fazi stanice ne posjeduju sposobnost autonomnog rasta, a promjene koje se događaju su kronične i reverzibilne. U fazi progresije tijekom akumulacije genskih mutacija dolazi do autonomnog rasta tumora, stoga djelovanje inicijatora i promotora više nije potrebno. Fazu progresije karakterizira genska nestabilnost, uspješniji rast, invazivnost, metastatski potencijal, aktivnost telomeraza, angiogenska aktivnost te smanjena

imunogenost. Posljednju fazu u procesu karcinogeneze predstavlja rak ili bilo koji drugi oblik neoplazme. Maligno transformirane stanice u ovoj fazi imaju sposobnost invazije i metastaziranja (Hanahan i sur., 2011).

Karcinogeneza može biti kemijska, fizička i biološka. Kemijska karcinogeneza počinje aktivacijom kemijskih karcinogena koja podrazumijeva metaboličke promjene; aktivaciju prekarcinogena, reakciju karcinogena sa staničnim sastojcima te važnost doze karcinogena i vrijeme njegove primjene. Nakon toga slijedi inicijacija i promocija zloćudne preobrazbe. Najvažnije kemijske karcinogene tvari predstavljaju alkilirajući spojevi koji imaju izravno djelovanje na DNA, policiklički aromatski ugljikovodici neizravnog djelovanja na DNA, aromatski amini i azo boje, prirodni produkti biljaka i mikroorganizama poput aflatoksina B1 kojeg proizvodi *Aspergillus flavus*, nitrozamini i amidi u začinima i konzervansima te azbest i polivinil klorid. Za razliku od kemijske, fizička karcinogeneza uzrokovana je ionizacijskim zračenjem ili ultravioletnim (UV) zrakama. Oštećenja nastala pod utjecajem sunčeva zračenja u većini slučajeva mogu se popraviti. To nije slučaj kod preosjetljivih osoba jer kod njih dolazi do poremećaja reparacijskih mehanizama, odnosno do oštećenja na razini gena koja su zadužena za popravak oštećenja DNA. Izlaganje UV zračenju povećava rizik od nastanka melanoma te planocelularnog i bazocelularnog karcinoma kože. Izlaganje ionizirajućem zračenju završetkom latentnog perioda od nekoliko godina znatno više pridonosi obolijevanju od leukemije, karcinoma štitne žlijezde, žlijezda slinovnica, kože. UV, gama zrake i rendgensko zračenje djeluju na genski materijal stvarajući dimere timina, hidrataciju pirimidina adiranjem molekule vode na dvostruku vezu i stvarajući kovalentne veze između lanaca DNA i proteina, a ionizirajuće zrake uzrokuju stvaranje mostova i kovalentnih veza što dovodi i do promjene u DNA molekuli. Karcinogeneza uzrokovana virusnim onkogenima te onkogenima i antionkogenima jest biološka. Onkogeni DNA virusi poput Humanog papiloma virusa (HPV) povezani su sa nastankom benignih tumora kože, papilomima larinksa, planocelularnim karcinomom cerviksa. Tipovi 16 i 18 su povezani sa nastankom invazivnog planocelularnog karcinoma cerviksa, dok su tipovi 6 i 11 povezani sa ravnim kondilomima koji se ne razvijaju u karcinom. Onkogeni RNA virusi, primjerice, humani T- leukemijski virus (HTLV-1), pokazuje tropizam za CD4+ T limfocite i povezuje se sa limfomom, odnosno T staničnom leukemijom (Hanahan i sur., 2011).

Karcinogeneza također može biti uzrokovana prehranom, pušenjem, primjenom lijekova, psihološkim poremećajima i poremećajima imunskog sustava, kao i poremećajima povezanim s dobi zbog sve većih pogrešaka u transkripciji i translaciji.

Čimbenici koji uzrokuju karcinogenezu dijele se na potpune i nepotpune kancerogene čimbenike. Potpuni kancerogeni čimbenici mogu dovesti do razvoja sva tri stadija malignog tumora; inicijacije, promocije i progresije, dok nepotpuni uzrokuju samo jedan od navedenih stadija, primjerice inicijaciju, što ovisi o koncentraciji kancerogenog čimbenika.

1.3 GRAĐA, PODJELA I PODRIJETLO TUMORA

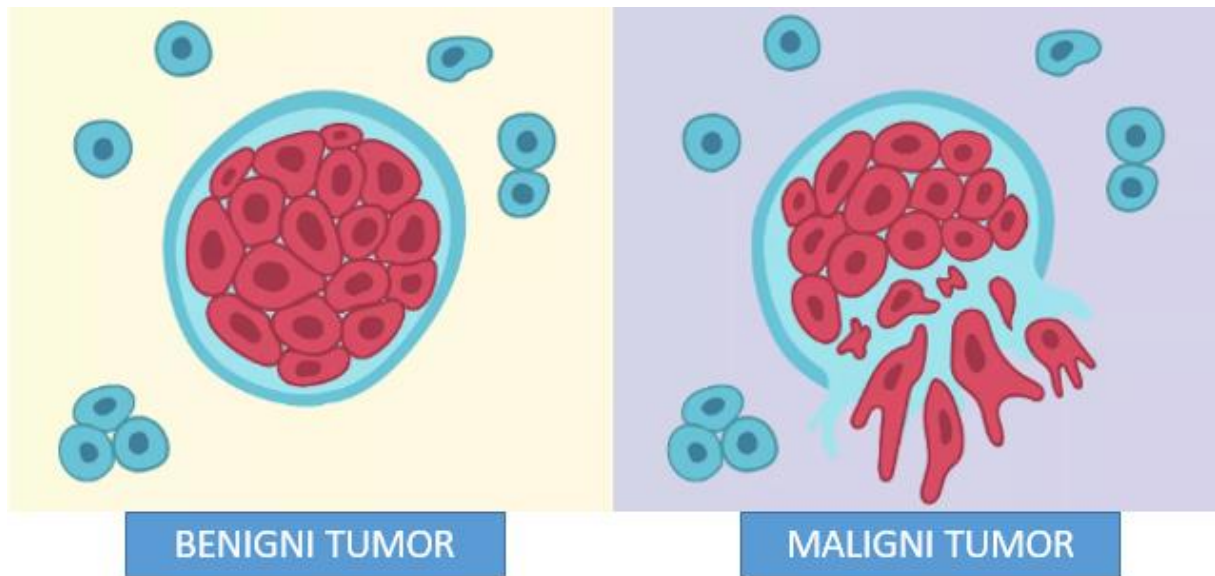
Tumor je građen od dva osnovna dijela: parenhima i strome. Parenhim čine pretvorene ili neoplastične stanice po kojem tumor dobiva svoje ime i po kojem se određuje njegovo biološko ponašanje, dok je potporna stroma građena od vezivnog tkiva, krvnih žila i vjerojatno limfnih žila, a presudna je za rast i razvoj tumora (Kumar i sur., 2000).

Podjela tumora određuje se s obzirom na biološko ponašanje tumora, no prisutna je i podjela prema tkivu iz kojeg tumori nastaju i vrsti stanica.

Prema svom biološkom ponašanju tumori se dijele u tri glavne skupine koje čine dobroćudni, zloćudni i granični tumori. Dobroćudni (benigni) tumori su u pravilu oštro ograničeni na tkiva u kojima se razvijaju, rastu ekspanzivno i ne stvaraju metastaze. Adenomi, papilomi, polipi i ciste adenoma samo su neki od predstavnika benignih tumora. Za razliku od njih, zloćudni (maligni) tumori su u pravilu neoštro ograničeni, rastu infiltrativno i metastaziraju u okolna tkiva i organe. Drugi naziv im je rak (grč. *karkinos,-u, m.*; lat. *cancer,-cri,-ceris, m.* - rak). Granični (semimaligni/atipično proliferirajući) tumori imaju niski zloćudni potencijal i u nekim slučajevima je problematično razlikovati granični tumor od zloćudnog tumora niskog histološkog gradusa (Kumar i sur., 2000).

Zloćudni (maligni) tumori mogu se podijeliti prema tkivu iz kojeg nastaju i vrsti stanica. Shodno tome, razlikujemo karcinome, sarkome te leukemije i limfome. Karcinomi u osnovi nastaju iz epitelnih stanica, sarkomi iz vezivnog i mišićnog tkiva te čine 90% malignih tumora, te leukemije i limfomi koji nastaju iz hematopoetskih stanica i živčanog tkiva i čine 7% malignih tumora (Kumar i sur., 2000).

1.3.1 OSOVNE RAZLIKE IZMEĐU BENIGNIH I MALIGNIH TUMORA



Slika 1.: Ilustrativni prikaz benignog i malignog tumora (preuzeto i prilagođeno prema <https://www.verywellhealth.com/what-does-malignant-and-benign-mean-514240>).

Tablica 1.: Razlike između benignih i malignih tumora

	BENIGNI TUMORI	MALIGNI TUMORI
STANIČNE KARAKTERISTIKE	Slične kao stanice iz koje su nastale (dobro su diferencirane).	Razlikuju se od stanica iz koje su nastale (slabo diferencirane).
KARAKTERISTIKE RASTA	Rubovi tumora kreću se glatko prema van (inkapsulirani), rastu ekspanzijom te komprimiraju i istiskuju okolna tkiva. Tumorske stanice ostaju vezane za klon ili masu stanica, ne šire se i ne stvaraju nove izrasline na drugim mjestima u tijelu.	Rubovi tumora se kreću prema van na nepravilan način (obično nisu inkapsulirani) i mogu se infiltrirati, invadirati te uništiti okolno tkivo. Stanice tumora mogu se odvojiti od klonirane mase, živjeti samostalno, premjestiti se na drugo područje tijela i započeti sa rastom ili stvaranjem novih klonova.
BRZINA RASTA	Spori rast	Brzi rast
STUPANJ VASKULARIZACIJE	Blaga vaskularizacija	Umjerenjena vaskularizacija
RIZIK VRAĆANJA NAKON OPERATIVNOG UKLANJANJA	Rijetko	Često
TUMORSKE NEKROZE	Rijetke	Česte

(Preuzeto i prilagođeno prema

http://www.toxicologyschools.com/Free_Toxicology_Course2/a33.htm).

I benigni i maligni tumori mogu biti epitelnog i mezenhimalnog podrijetla. Benigni tumori epitelnog podrijetla nazivaju se prema vrsti epitela od kojeg su nastali s dodatkom nastavka – oma (primjerice adenoma, papiloma, cistadenoma...), dok benigni tumori mezenhimalnog

podrijetla ime dobivaju prema vrsti potpornog tkiva od kojeg su nastali s nastavkom -oma (primjerice fibroma, lipoma, hemangioma, osteoma, hondroma, leiomioma). Maligni tumori epitelnog podrijetla, tzv. karcinomi, nazivaju se prema tipu epitela od kojeg su nastali (planocelularni karcinom pločastog epitela, adenokarcinom žljezdanog epitela, tranziciocelularni karcinom prijelaznog epitela, hepatocelularni karcinom jetrenih stanica, anaplastični karcinom nediferenciranih epitelnih stanica), dok se maligni tumori mezenhimalnog podrijetla (mišići, kosti, hrskavice; rijetki u ljudi), tzv. sarkomi (grč. *sarx*, -os, *f.* – meso), nazivaju prema vrsti potpornog tkiva s dodatkom riječi sarkoma (npr. liposarkoma, fibrosarkoma, hemangiosarkoma, osteosarkoma, hondrosarkoma, leiomiosarkoma, rabdomiosarkom) (Kumar i sur., 2000).

S obzirom na podrijetlo susrećemo se sa raznim terminima koji označavaju pojedine tumore. Tumori koji potječu iz žljezdanog tkiva ili svojim rastom stvaraju sliku žljezdanog tkiva nazivaju se adenomima. Karcinomi su novotvorine porijeklom iz epitelnih stanica pa bi stoga termin adenokarcinom označavao tumor u kojem tumorske stanice epitelnog porijekla rastu stvarajući žljezdane tvorbe. Tumorska tvorba mikroskopske debljine, koja se nalazi samo u epitelnom sloju tkiva i ne probija bazalnu membranu epitela naziva se karcinom *in situ* (CIS). CIS ima potencijal probijanja membrane i invazivnog rasta. Sarkomi su tumori koji potječu iz mezenhima ili njegovih derivata, dok su papilomi dobroćudni epitelni tumori koji stvaraju resičaste tvorbe te polipi koji označavaju tumore izbočene iznad površine sluznice, kao vidljiva, solitarna masa (Kumar i sur., 2000).

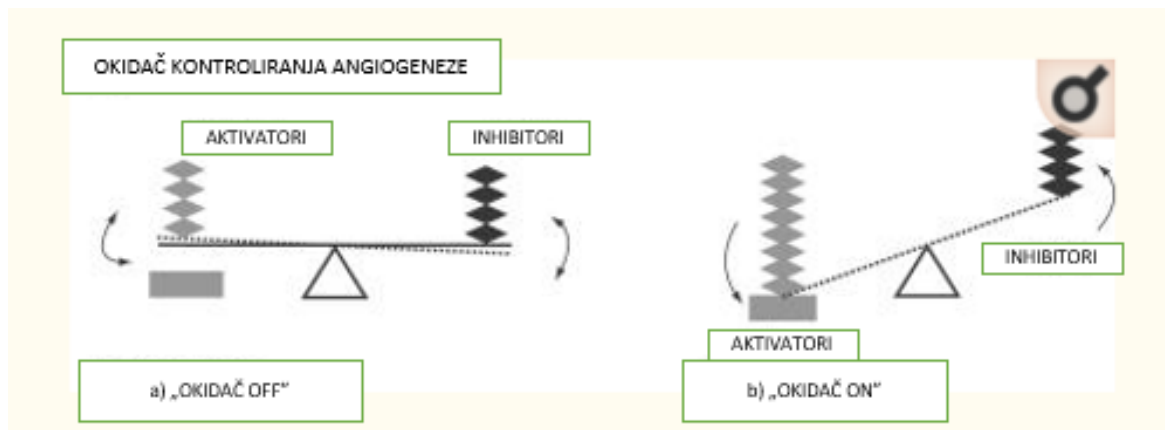
1.4 RAST TUMORSKOG ČVORA

Kako bi se iz jedne tumorske stanice razvio cijeli tumorski čvor potrebno je da ta tumorska stanica nađe adekvatan okoliš u kojem može nesmetano rasti. Mikrookoliš tumora uključuje obližnje tkivo, imunosne stanice, krvne žile i izvanstanični matriks, a sve njegove komponente uvelike određuju rast tumora. Pojedinačne tumorske stanice se godinama mogu zadržavati u tijelu bez razvitka kliničke tumorske slike, sve dok ne organiziraju vlastitu prokrvljenost prilikom čega izražavaju svoj maligni fenotip. Tumorski čvor ima sposobnost širenja u susjedne ili udaljene organe, što ga čini opasnim po život. Stanice tumora mogu prodrijeti kroz krvne ili limfne žile, cirkulirati kroz intravaskularni tok, a zatim proliferirati na drugom mjestu: metastazama. Za metastatsko širenje tkiva tumora važan je rast krvožilne mreže. Proces kojim nastaju novi oblici krvnih i limfnih žila naziva se angiogeneza, odnosno limfangiogeneza. Oba načina rasta imaju bitnu ulogu u formiranju nove krvožilne

mreže za opskrbu hranjivim tvarima, kisikom i imunološkim stanicama, kao i za uklanjanje otpadnih proizvoda (Sarkar i sur., 2013).

1.4.1 TUMORSKA ANGIOGENEZA

Rast tumora i metastaza ovise o angiogenezi i limfangiogenezi izazvanoj kemijskim signalima iz tumorskih stanica u fazi brzog rasta (Amioka i sur., 2002). U odsutnosti krvožilne podrške, tumori mogu postati nekrotični ili čak apoptotski, stoga je angiogeneza važan čimbenik u progresiji raka (Awada i sur., 2005). Nastanak novog krvožilja (neovaskularizacija), uključujući angiogenezu tumora, u osnovi je proces u četiri koraka. Najprije je bazalna membrana u tkivima ozlijeđena lokalno. Postoji trenutno uništavanje i hipoksija. Zatim endotelne stanice aktivirane angiogenetskim čimbenicima migriraju. Nakon toga endotelne stanice proliferiraju te se stabiliziraju. Na koncu angiogeni čimbenici nastavljaju utjecati na angiogeni proces. Stanice krvožilnog endotela dijele se u prosjeku svakih 1000 dana (Evans i sur., 2005). Angiogeneza se stimulira kada tumorska tkiva zahtijevaju hranjive tvari i kisik te je regulirana i aktivatorskim i inhibitorским molekulama (Tablica 2.). Međutim, regulacija aktivnosti angiogenih čimbenika sama po sebi nije dovoljna za angiogenezu neoplazme, pa negativni regulatori ili inhibitori rasta krvnih žila također moraju biti smanjeni (Slika 2.) (Dvorak, 2002).



Slika 2.: Angiogeneza je regulirana ravnotežom između aktivatora i inhibitora (a). U nedostatku hranjive tvari i kisika stimulira se angiogeneza. Međutim, samoregulacija djelovanja angiogenih aktivatora nije dovoljna za angiogenezu neoplazme. Negativni regulatori ili inhibitori rasta krvnih žila također moraju biti smanjeni (b). (Peuzeto i prilagođeno prema Nishida i sur., 2006).

Tablica 2.: Endogeni regulatori angiogeneze

AKTIVATORI ANGIOGENEZE		INHIBITORI ANGIOGENEZE	
FGF	hepatocitni čimbenik rasta	trombospondin -1 i -2	TIMP
VEGF	placentni čimbenik rasta	interferon- α , - β , - γ	
Angiogenin	čimbenik rasta granulocitnih kolonija	angiostatin	
Angiotropin	prostaglandini E1 i E2	Endostatin	
TGF- β	leukotrijeni C4 i D4	1,25- dihidroksi vitamin D3	
TNF- α		protein IP-10	
PD-ECGF		IL-1 α i - β	
IL-1,-6,-8,-4		IL-12	
Estrogen		prolaktin	

(Preuzeto i prilagođeno prema Nishida i sur., 2006).

1.4.2 METASTAZIRANJE

Metastaziranje (grč. *metastasis*, -*eos*, *f*.- premještanje, promjena) je proces širenja stanica tumora na tkiva i organe izvan njegovog primarnog mjesta nastanka te proces formiranja novih tumora (sekundarna i tercijarna žarišta), što je jedini događaj koji rezultira smrću većine pacijenata s tumorom. U vrijeme dijagnoze tumora, barem polovica pacijenata već ima klinički otkrivenu metastatsku bolest. Proces metastaziranja se sastoji od niza uzastopnih događaja koji se moraju dovršiti kako bi tumorska stanica uspješno metastazirala, a taj niz uzastopnih događaja naziva se metastatska kaskada. Ovaj proces doprinosi složenosti tumora kao multipleksne bolesti. Tijekom metastatske kaskade, promjene adhezije stanica-stanica i stanica-matriks su od najveće važnosti (Martin i Jiang, 2009).

Metastatska kaskada može se široko podijeliti u tri glavna procesa: invazija, intravazacija i ekstravazacija. Gubitak sposobnosti adhezije stanica-stanica omogućuje malignim tumorskim stanicama da se odvoje od mase primarnog tumora, a promjene u međureakciji stanica-matriks omogućuju stanicama da napadnu okolnu stromu; proces invazije. To uključuje izlučivanje tvari za razgradnju bazalne membrane i izvanstaničnog matriksa te također ekspresiju/supresiju proteina uključenih u kontrolu motiliteta i migracije. Tumor također mora inicirati angiogenezu za svoj daljnji rast; lokalna difuzija za prijenos hranjivih tvari i uklanjanje otpadnih produkata s mjesta tumora dostatna je za tumore promjera do 2

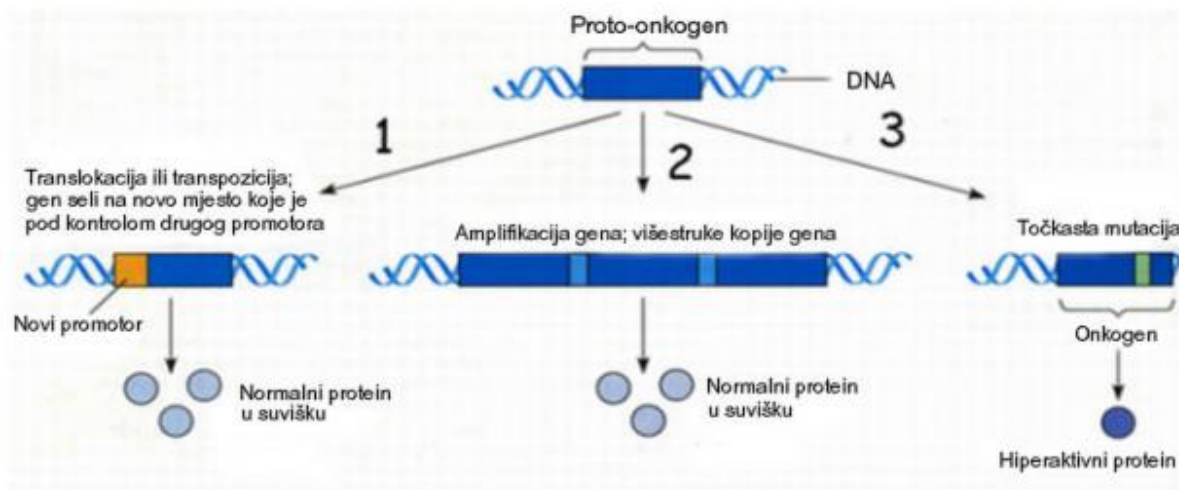
mm (Hoevel i sur., 2002). Blizina tumora tada može osigurati put za odvojene stanice da uđu u cirkulacijski sustav i metastaziraju na udaljena mjesta; proces intravazacije. Međureakcija između tumorske stanice i okolne strome je iznimno važna u razvoju tumorske angiogeneze (Nakagawa i sur., 2011). Metastatska kaskada ovisi, dakle, o gubitku adhezije između stanica, što rezultira disocijacijom stanice od primarnog tumora, a time i sposobnošću stanice da postigne pokretni fenotip preko promjena u međureakciji stanica i matriksa. Nakon što tumorska stanica stigne do moguće točke intravazacije, stvara međureakciju s endotelnim stanicama prolaskom kroz biokemijske međureakcije te razvijaju adheziju na endotelne stanice da bi formirale jače veze i tako prodiru u endotel i bazalnu membranu; proces ekstravazacije. Novi tumor tada može proliferirati na novom sekundarnom žarištu.

1.5 MOLEKULARNA BIOLOGIJA TUMORA

Danas je poznato da proces kojim se normalne stanice postupno transformiraju u maligne zahtijeva sekvencijalno stjecanje mutacija koje nastaju kao posljedica oštećenja genoma. Ova oštećenja mogu biti posljedica endogenih procesa kao što su pogreške u replikaciji DNA, unutrašnja kemijska nestabilnost određenih baza DNA ili posljedica napada slobodnih radikala generiranih tijekom metabolizma. Oštećenje DNA također može biti rezultat međureakcija s vanjskim čimbenicima kao što su ionizirajuće zračenje, UV zračenje i kemijski karcinogeni. Stanice su evoluirale u smislu popravka takvog oštećenja, ali iz različitih razloga javljaju se pogreške i uvode se trajne promjene u genomu, mutacije. Neke inaktivirajuće mutacije javljaju se u genima odgovornim za održavanje genomske cjelovitosti olakšavajući stjecanje dodatnih mutacija. Evolucija normalne stanice do maligne uključuje procese kojima geni uključeni u normalne homeostatske mehanizme koji kontroliraju proliferaciju i staničnu smrt trpe mutacijsku štetu. To rezultira aktivacijom gena koji stimuliraju proliferaciju ili zaštitu od stanične smrti, onkogeni i inaktivacijom gena koji bi inače inhibirali proliferaciju, tumorskih supresorskih gena. Napokon, nakon što je prevladala normalne kontrolne mehanizme, proliferaciju i staničnu smrti, stanica tumora mora prevladati replikativno starenje i postati besmrtna te omogućiti dostatne zalihe hranjivih tvari i kisika kako bi održala visoku stopu proliferacije. Najsposobnija stanica je ona koja preživi da bi formirala novu populaciju genetski različitih stanica, tumora (Capecci, 2005).

Mutacije odgovorne za nastanak tumora se javljaju na tri skupine gena: onkogenima, tumor supresorskim genima i genima za provjeru i popravak DNA. Onkogeni su mutirani oblici

normalnih gena (protoonkogeni) čiji proizvodi potiču stanični rast. U normalnoj stanici protoonkogeni sudjeluju u brojnim staničnim funkcijama vezanim za rast i diferencijaciju stanice; kodiraju proteine, koji mogu biti enzimi, proteine koji vežu DNA, čimbenike rasta, receptore čimbenika rasta ili transkripcijske čimbenike. Protoonkogeni čine skupinu od oko stotinjak gena, a do danas je poznato više od 50 protoonkogeni koji mutacijama mogu postati onkogeni. Mehanizmi koji sudjeluju u aktivaciji onkogeni su: mutacija (točkasta), translokacija i amplifikacija (Capecchi, 2005).



Slika 3.: Načini postanka protoonkogeni onkogenima: 1. translokacijom, 2. amplifikacijom, 3. točkastom mutacijom (Preuzeto i prilagođeno prema <http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl17.html>).

Tumor supresori su geni koji obuzdavaju rast, odnosno progresiju tumora, a njihova inaktivacija, tj. mutacija, uvelike doprinosi razvoju tumora. Nazivamo ih još i antionkogenima. Proteinski produkti tumor supresorskih gena različito djeluju na stanični ciklus; odgovaraju na signale oštećene DNA i povezuju ih sa staničnim ciklusom, utišavaju gene važne za nastavak staničnog ciklusa te na taj način inhibiraju staničnu diobu, stimuliraju apoptozu te inhibiraju metastaziranje. Inaktivacija tumor supresorskih gena odvija se na tri načina: točkastom mutacijom, delecijom ili epigenetskim čimbenicima (Englert i sur., 1995).

1.6 TUMORSKA IMUNOLOGIJA

Urođeni i adaptivni imunski sustav djeluju kako bi zaštitio domaćina od stranih patogena i općenito je tolerantan prema tkivima domaćina, razlikujući „vlastite“ i „nevlastite“ antigene. U

okruženju evoluirajućeg tumora, imunosni sustav je vjerojatno izložen brojnim, prije nevidljivim, antigenima koji proizlaze iz genetskih abnormalnosti. Zanimljivo je da je imunosni sustav sposoban uočiti i odstraniti neke tumore u ranom razvoju. Međutim, teorija „imunoeditinga“, koja uključuje proces imunosnog nadzora, ukazuje na to da određeni tumori izlaze iz stanja ravnoteže prethodno održavanog pod kontrolom imunosnog sustava te postaju klinički značajni (Dunn i sur., 2004).

1.6.1 TUMORSKI ANTIGENI

Tumorski antigeni su antigenske tvari proizvedene u tumorskim stanicama, odnosno, aktiviraju imunosni odgovor u domaćinu. Po kemijskom sastavu su glikoproteini, a nastali su preradbom tumorskih bjelančevina koji se limfocitima T predočuju vezani za molekule MHC-I ili MHC-II. Prema mjestu na kojem se nalaze tumorski se antigeni mogu podijeliti na antigene na staničnoj površini, antigene u unutrašnjosti stanice i antigene koje tumorske stanice otpuštaju u okolinu. Prema tome, tumorski antigeni mogu biti smješteni u jezgri, citoplazmi, na membrani, te mogu biti otpušteni u okoliš. Antigeni tumora su korisni tumorski biljezi u otkrivanju tumorskih stanica dijagnostičkim testovima i potencijalni su kandidati za uporabu u terapiji tumora (Borello i sur., 2002).

Imunosni sustav reagira na dva opća tipa tumorskih antigena: tumorski specifični antigeni (prema engl. *tumour-specific antigens*, TSA) koji su jedinstveni za tumorske stanice i tumoru pridruženi antigeni (prema engl. *tumour-associated antigens*, TAA) koji se pojavljuju kako i na normalnim, tako i na tumorskim stanicama. Tumor specifične antigene (TSA) predstavlja protein ili neka druga molekula koja se nalazi samo na stanicama tumora, a ne na normalnim stanicama. Mogu nastati zbog mutacije u tumorskim stanicama što rezultira proizvodnjom promijenjenih staničnih bjelančevina koje se zatim u citosolu prerađuju u novi peptid te se pridružuju molekulama MHC-I. Na taj način mogu potaknuti staničnu imunost. TSA mogu pomoći tijelu da stvori imunosni odgovor protiv stanica tumora. Mogu se koristiti kao moguće mete za ciljanu terapiju ili za imunoterapiju kako bi se potaknuo imunosni sustav tijela da ubije više stanica tumora. TSA se također mogu koristiti u laboratorijskim testovima kako bi se dijagnosticirala neka vrsta tumora. Prvi tumor za koji je utvrđen antigen specifičan za tumor je maligni melanom. Činjenica da se melanomi povremeno podvrgavaju "spontanoj" regresiji kod pojedinaca ukazuje na to da imunosni odgovor može biti učinkovit u odbacivanju tumorskih stanica. Tumoru pridruženi antigeni (TAA) na tumorskim stanicama nisu kvalitativno različiti po strukturi od antigena koji se nalaze na normalnim stanicama, ali su prisutni u znatno većim količinama. Zbog njihovog izobilja, oni se često izlijevaju u krvotok. Povišene razine tih

antigena mogu se koristiti kao tumorski biljezi - to jest, pokazatelji tumora. Osim na tumorskim stanicama, TAA se nalaze na nekim stanicama embrijskog tkiva, na stanicama za vrijeme virusne infekcije, ili pak i u normalnim stanicama, ali u iznimno niskoj koncentraciji (Borello i sur., 2002).

Imunosni odgovor na strane antigene sastoji se od humoralnih i staničnih mehanizama. Većina humoralnih odgovora ne može spriječiti rast tumora. Međutim, efektorske stanice, kao što su T stanice, makrofagi i prirodne stanice ubojice (engl. *natural killer cells*, NK stanice), imaju relativno učinkovite tumoricidne sposobnosti. Aktivnost efektorske stanice je inducirana stanicama koje predstavljaju tumor specifične antigene (TSA) ili tumoru pridružene antigene (TAA) na svojoj površini i podržane su citokinima (npr. interleukini, interferoni). Usprkos aktivnosti efektorskih stanica, imunoreaktivnost domaćina može propustiti kontrolu tumora i rasta (Borello i sur., 2002).

1.6.2 STANIČNA IMUNOST

T-stanica je primarna stanica odgovorna za izravno prepoznavanje i ubijanje tumorskih stanica. T-stanice provode imunosni nadzor, zatim proliferiraju i uništavaju novo transformirane tumorske stanice nakon prepoznavanja TAA. T-stanični odgovor na tumore moduliran je drugim stanicama imunosnog sustava; neke stanice zahtijevaju prisustvo humoralnih protutijela usmjerenih protiv tumorskih stanica (stanična citotoksičnost ovisna o protutijelu) da bi započeli međureakciju koja dovodi do smrti tumorskih stanica. Nasuprot tome, supresorske T-stanice inhibiraju imunosni odgovor protiv tumora (Zilberberg i sur., 2015).

Citotoksični T-limfociti (CTL) prepoznaju antigene na ciljnim stanicama i liziraju te stanice. Ti antigeni mogu biti proteini na staničnoj površini ili mogu biti unutarstanični proteini (npr. TAA) koji se eksprimiraju na površini u kombinaciji s molekulama MHC I. Tumor specifični CTL pronađeni su u neuroblastomu, melanomu, sarkomu, karcinomima kolona, pluća, jetre, cerviksa, jajnika, testisa. Prirodne stanice ubojice (NK stanice) su druga populacija efektorskih stanica s tumoricidnom aktivnošću. Za razliku od CTL, NK stanice nemaju receptor za prepoznavanje antigena, ali još uvijek mogu prepoznati normalne stanice inficirane virusima ili tumorske stanice. Njihova tumoricidna aktivnost naziva se prirodna jer nije inducirana specifičnim antigenom. Proučava se mehanizam kojim NK stanice razlikuju normalne i abnormalne stanice. Dokazi pokazuju da MHC molekule klase I na površini normalnih stanica inhibiraju NK stanice i sprječavaju lizu. Stoga, smanjena razina ekspresije MHC I karakteristična za mnoge tumorske stanice može omogućiti aktivaciju NK stanica i kasnije

liziranje tumora. Makrofagi mogu ubiti specifične tumorske stanice kada se aktiviraju kombinacijom čimbenika, uključujući limfokine (topljivi čimbenici koje proizvode T-stanice) i interferon. Oni su manje učinkoviti od citotoksičnih mehanizama posredovanih T-stanicama. Pod određenim okolnostima, makrofagi mogu predstavljati TAA za T-stanice i stimulirati tumor specifičan imunski odgovor. Postoje najmanje 2 klase makrofaga povezanih s tumorom (TAM): TAM-1 (M1) stanice olakšavaju ubijanje tumorskih T-stanica, dok TAM-2 (M2) stanice potiču toleranciju tumora. Smatra se da su M1 i M2 u kontinuitetu sve dok se maksimalno ne diferenciraju (polariziraju) u M1 i M2. Takva polarizacija može varirati tijekom vremena i ovisi o stadiju i vrsti tumora, kao i o načinu obrade tumora. Dendritičke stanice su namjenske antigen-predočne stanice prisutne u tkivima (npr. koža, limfni čvorovi). Oni igraju središnju ulogu u iniciranju tumor specifičnog imunskog odgovora. Te stanice uzimaju proteine povezane s tumorom, obrađuju ih i predočavaju TAA T-stanicama kako bi stimulirali CTL odgovor na tumor. Nekoliko klasa dendritičkih stanica može posredovati poticanje ili suzbijanje tumora. Limfokini koje proizvode imunosne stanice stimuliraju rast ili potiču aktivnosti drugih imunskih stanica. Takvi limfokini uključuju interleukin-2 (IL-2), također poznat kao čimbenik rasta T-stanica i interferone. IL-12 se proizvodi dendritičkim stanicama i specifično inducira CTL, čime se pojačavaju protutumorski imunski odgovori. Regulatorne T-stanice normalno su prisutne u tijelu i pomažu u sprječavanju autoimunskih reakcija. One se proizvode tijekom aktivne faze imunskog odgovora na patogene i ograničavaju snažan imunski odgovor koji može oštetiti domaćina. Akumulacija tih stanica u tumoru inhibira protutumorske imunosne odgovore. Mijeloidne supresorske stanice sastoje se od nezrelih mijeloidnih stanica i njihovih prekursora. Ove stanice povećavaju broj tumora kao i upale i infekcije. Stanice imaju jaku immunosupresivnu aktivnost. Razlikuju se dvije populacije tih stanica: granulocitne i monocitne. Mijeloidne supresorske stanice akumuliraju se u velikom broju u karcinomima i predviđaju slabe kliničke ishode kod različitih vrsta tumora (Zilberberg i sur., 2015).

1.6.3 HUMORALNA IMUNOST

Za razliku od citotoksične imunosti T-stanica, čini se da humoralna protutijela ne daju značajnu zaštitu protiv rasta tumora. Većina protutijela ne može prepoznati TAA. Bez obzira na to, humoralna protutijela koja reagiraju s tumorskim stanicama *in vitro* otkrivena su u serumu pacijenata s različitim tumorima, uključujući Burkittov limfom, melanom, osteosarkom, neuroblastom, karcinom pluća i jetre. Citotoksična protutijela su usmjerena protiv površinskih antigena tumorskih stanica. Ta protutijela mogu pokazati protutumorska djelovanja putem

fiksacije komplementa ili služeći kao zastavica za uništavanje tumorskih stanica pomoću T-stanica (citotoksičnost posredovana staničnim protutijelima). Druga populacija humoralnih protutijela, nazvana pojačavajuća protutijela (blokirajuća protutijela), može zapravo više potaknuti nego inhibirati rast tumora. Mehanizmi i relativna važnost takvog imunskog poboljšanja nisu dobro shvaćeni (Zilberberg i sur., 2015).

1.7 IMUNOTERAPIJA

Imunosni sustav je moćno oružje protiv bolesti, infekcija i neispravnih stanica. Budući da su stanice tumora tjelesne mutirane stanice, imunski sustav ih ne prepoznaje uvijek kao napadače. Također, stanice tumora imaju više načina za izbjegavanje, završavanje ili nadvladavanje imunskog napada. Imunoterapija je široka kategorija terapija protiv tumora koja je osmišljena kako bi stimulirala imunski sustav tijela da bolje prepozna i bori se protiv tumora imunoterapije (Stanley i sur., 2017).

Inhibitori kontrolnih točaka, cjepiva i citokini samo su neke od komponenata uključenih u imunoterapiju koja se koristi za liječenje raka. Inhibitori kontrolnih točaka (engl. *checkpoint inhibitors*) rade tako da ometaju signale stanica tumora te ih izlažu imunskom sustavu za napad. Određeni proteinski receptori smješteni na površini imunskih stanica pomažu im da razlikuju zdrave stanice od stanica tumora. Stanice tumora mogu slati signale imunskim stanicama na određenim kontrolnim točkama koje „govore“ imunskom sustavu da su normalne stanice. Inhibitori kontrolnih točaka blokiraju te signale i izlažu stanice za napad. Za razliku od inhibitora kontrolnih točaka, cjepiva ne sprečavaju izravno tumor, ali se koriste za liječenje specifičnih karcinoma i sprječavanje stanja koja mogu uzrokovati tumor. Cjepiva za tumor dolaze u dvije kategorije. Prva su profilaktička ili preventivna cjepiva koja napadaju viruse koji mogu uzrokovati tumor. Cjepivo humanog papiloma virusa (HPV), na primjer, cilja na specifične sojeve humanog papiloma virusa povezane s većinom slučajeva raka grlića maternice, grla, analnog i drugih vrsta raka. Druga kategorija cjepiva jesu terapijska ili terapijska cjepiva koja stimuliraju imunski sustav da napadne tumor na određenom mjestu u tijelu. *Bacillus Calmette-Guérin* cjepivo, na primjer, je živa bakterija koja se ubrizgava u mokraćni mjehur i privlači imunosne stanice da napadnu stanice raka. Molekule proteina koje pomažu u reguliranju i usmjeravanju imunskog sustava nazivaju se citokini. Stanice oslobađaju citokine, koji djeluju kao glasnici drugim stanicama, govoreći im kada i gdje pokrenuti imunski odgovor. Tijelo prirodno proizvodi različite vrste citokina. U liječenju raka, citokini se sintetiziraju u laboratoriju i ubrizgavaju u većim dozama nego što bi tijelo normalno proizvodilo. U imunoterapiji tumora koriste se dva uobičajena citokina: IL-2 i IFN- α .

Interleukin 2 (IL-2) organizam prirodno proizvodi kako bi pomogao u borbi protiv infekcija i spriječio autoimune bolesti. U liječenju raka, IL-2 je namijenjen za ciljanje adaptivnih imunskih stanica, kao što su T-stanice i B-stanice, da reagiraju na tumore. IL-2 može pomoći tijelu da proizvede T-stanice koje se bore protiv antigena i stimulira B-stanice da proizvode više protutijela. Interferon-alfa (IFN- α) je jedan od nekoliko proteina koji pomažu tijelu odbiti viruse i bakterije. U liječenju raka, IFN- α pomaže tijelu generirati urođene imunosne stanice, kao što su dendritičke stanice i makrofagi, koje su dizajnirane da napadaju nezdrave stanice imunoterapije (Stanley i sur., 2017).

Imunoterapija može uzrokovati da imunosne stanice napadaju zdrave stanice, koje uzrokuju različite nuspojave, uključujući umor, mučninu, proljev i simptome slične gripi. Tijekom cijelog liječenja, tim za njegu može pružati usluge podrške, uključujući prehranbenu terapiju, naturopatsku terapiju (terapiju prirodnim lijekovima) i medicinu uma i tijela. Ove terapije su namijenjene smanjenju nuspojava i poboljšanju kvalitete života tijekom imunoterapije (Stanley i sur., 2017).

Jedan od oblika nespecifične terapije je modulacija imunskog sustava prirodnim pripravcima kao što su polifenolne/flavonoidne sastavnice, uključujući resveratrol.

1.8 RESVERATROL

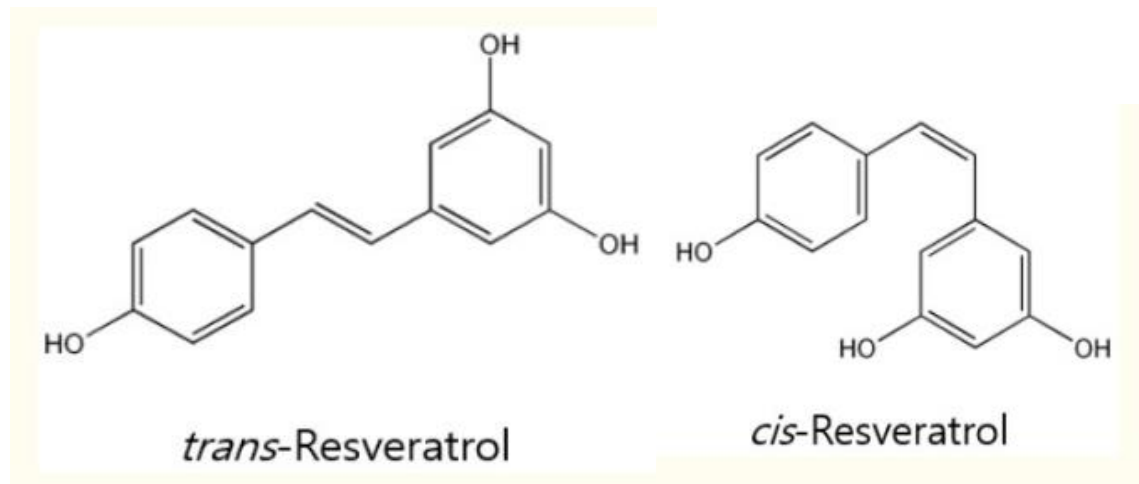
Spojevi prirodnih proizvoda nedavno su privukli značajnu pozornost znanstvene zajednice zbog njihovih snažnih učinaka protiv bolesti uzrokovanih upalama, uključujući i tumor. Znatna količina istraživanja, uključujući preklinička, klinička i epidemiološka istraživanja, pokazala je da prehranbena potrošnja polifenola, pronađena u visokoj razini u žitaricama, mahunarkama, povrću i voću, može spriječiti razvoj niza bolesti, uključujući tumor. Razvoj tumora je pomno vođena progresija u kojoj normalne stanice dobivaju mutacije u svom genetskom sastavu, što uzrokuje da stanice kontinuirano rastu, koloniziraju i metastaziraju u druge organe kao što su jetra, pluća, debelo crijevo i mozak. Spojevi koji moduliraju ove onkogene procese mogu se smatrati potencijalnim antikancerogenim sredstvima koja na kraju mogu dovesti do kliničke primjene. Od davnina se prirodni proizvodi koriste za prevenciju nekoliko kroničnih bolesti, uključujući rak (Shanmugam i sur., 2011). Oživljeni interes za fitokemikalije dobivene iz prehranbenih ili ljekovitih biljnih izvora osigurava alternativni izvor bioaktivnih spojeva koji se mogu koristiti kao preventivni ili terapijski pripravci protiv raznih bolesti (Shanmugam i sur., 2012). Fitokemikalije, kao što su fitoestrogeni, moduliraju višestruke puteve signalizacije na stanicama, bez ili s minimalnom toksičnošću za normalne stanice (Newman i sur., 2014).

Primjena tvari na prevenciju ili odgodu razvoja karcinogeneze nazvana je kemoprevencijom (Li i sur., 2015), a postoji i zanimanje za korištenje prirodnih spojeva kao mogućih kemopreventivnih i terapijskih sredstava za ljudsku populaciju.

Resveratrol (3,4',5-trihidroksi-trans-stilben), prirodni stilben i ne-flavonoidni polifenol, je fitoestrogen koji posjeduje antioksidacijska, protuupalna, kardioprotektivna i protutumorska svojstva. Resveratrol je fitoaleksin koji se prirodno pojavljuje u mnogim vrstama biljaka, uključujući kikiriki, grožđe, borove te pomaže u odgovoru na infekcije uzrokovane patogenima (Cucciolla i sur., 2007). Zanimljivo je da su u kinesku i japansku tradicionalnu medicinu uključeni i pripravci poput onih dobivenih iz *Polygonum cuspidatum*, koji se mogu koristiti za liječenje upala, glavobolja, raka i amenoreje. Primjećeno je da resveratrol može preokrenuti rezistenciju na više lijekova u stanicama tumora, a kada se koristi u kombinaciji s klinički korištenim lijekovima, može uzrokovati osjetljivost stanice tumora na standardna kemoterapijska sredstva. Razvijeno je nekoliko novih analoga resveratrola s poboljšanom antikancerogenom aktivnošću, biodostupnošću i farmakokinetičkim profilom. Primjena resveratrola je u porastu jer ima tumor preventivna i protutumorska svojstva (Aggarwal i sur., 2004; Bishayee, 2009).

Struktura resveratrola temelji se na stilbenima i sastoji se od dva fenolna prstena povezana dvostrukom vezom stirena kako bi se proizveo 3,4',5-trihidroksistilben, koji se pojavljuje u trans- i cis-izoformama (Slika 4.). Trans-izoforma je glavni izooblik i predstavlja najviše istraživanu kemijsku formu. Izlaganje toplini i ultraljubičastom zračenju može prouzročiti pretvaranje trans-izoforme u cis-izoformu, čija struktura je vrlo slična onoj od sintetskog estrogena dietilstilbestrola. Zbog toga je resveratrol također klasificiran kao fitoestrogen. Njegov biosintetski put započinje reakcijom između malonilnog CoA i kumarilnog derivata, koji se katalizira enzimom stilbenske sintetaze (Wang i sur., 2011). Resveratrol je lako dostupan u redovitoj prehrani i ima brojna zdravstvena svojstva, kao i neke prirodne analoge, kao što su viniferini, pterostilbene i piceid (Jeandet i sur., 2002). Osim toga, za neke polusintetičke analoge resveratrola također je pronađeno određeno farmakološko djelovanje, uključujući kemopreventivna djelovanja, antioksidacijska djelovanja i svojstva protiv starenja (Colin i sur., 2008). Također je pokazano da resveratrol može dokinuti otpornost na lijekove u različitim tumorskim stanicama senzibiliziranjem na kemoterapijska sredstva (Mondal i sur., 2016). Konkretno, objavljeno je da trans-resveratrol i njegov glukozid imaju široke učinke, uključujući kardioprotektivna, antioksidacijska, protuupalna, estrogenska/anti-estrogenska i protutumorska

svojstva (Carter i sur., 2014). Štoviše, za protumikrobne učinke trans-resveratrola utvrđeno je da su korisni u liječenju kognitivnih poremećaja kao što je demencija (Molino i sur., 2016).



Slika 4.: Kemijska struktura dvaju geometrijskih izomera resveratrola (Preuzeto od Jeong-Hyeon KO i sur., 2017).

Nakon što su Jang i suradnici otkrili da je resveratrol 1997. godine inhibirao karcinogenezu u modelu tumora miša kože, slijedilo je mnoštvo publikacija. Pokazalo se da resveratrol ima *in vitro* citotoksične učinke protiv velikog raspona humanih tumorskih stanica, uključujući stanice mijeloidnog i limfoidnog karcinoma te karcinoma dojke, kože, cerviksa, jajnika, želuca, prostate, debelog crijeva, jetre, gušterače i karcinoma štitnjače (Tome-Carneiro i sur., 2013). Resveratrol utječe na različite stadije tumora od inicijacije i promocije do progresije, utječući na različite puteve prijenosa signala koji kontroliraju rast i podjelu stanica, upalu, apoptozu, metastaze i angiogenezu.

Terapijska primjena resveratrola ograničena je njegovim fizičko-kemijskim (slaba topljivost, nestabilnost) i farmakokinetiskim (brzi metabolizam, kratko vrijeme polueliminacije, niska bioraspoloživost, brza eliminacija) značajkama (Amri i sur., 2011; Singh i sur., 2015). Istraživanja farmakokinetike resveratrola pokazuje da je bioraspoloživost oralno primjenjenog resveratrola jednaka nuli, čime se dovodi u pitanje relevantnost *in vitro* ispitivanja s visokim koncentracijama resveratrola (Amri i sur., 2011).

Jedan od mogućih načina za iskorištavanje protutumorskih svojstava resveratrola je povećanje količine slobodnog trans-resveratrola na ciljanom mjestu djelovanja, zaobilazeći mogućnost brzog metaboliziranja u crijevima i jetri (Singh i sur., 2015). Jedan od važnijih pristupa povećanja bioraspodjelivosti slabo topljivih tvari je smanjenje veličina čestica takve tvari do nanometarskog područja dimenzija, odnosno izrade nanokristala slabo topljive tvari. Teško topljiva tvar u obliku nanokristala dispergirana je najčešće u vodeno disperzijskom sredstvu (> 97%). Mali udjel stabilizatora (1 - 2%) osigurava stabilnost takve nanosuspencije, a stabilizatori su pomoćne tvari koje se uobičajeno koriste u izradi odobrenih farmaceutskih oblika lijekova (Sigfridsson i sur., 2017). Smanjenjem veličine čestica slabo topljive tvari do nanometarskih dimenzija različitim tehnološkim postupcima (primjerice, vlažno mljevenje, visokotlačno homogeniziranje) odnosno povećanjem površine čestica takve tvari u odnosu na volumen, povećava se topljivost i brzina otapanja te se poboljšavaju biofarmaceutske značajke slabo topljive tvari (Sun, 2012). Primjena i terapijska vrijednost tehnologije nanokristala intenzivno se ispituje u razvoju farmaceutskih oblika lijekova za različite puteve primjene (oralna, dermalna, pulmonalna, intravenska, intramuskularna, intraperitonejska) i ciljanu dostavu (engl. *targeted drug delivery*) (Sun, 2012).

1.9 NANOTEHNOLOGIJA

Nanotehnologija je područje znanosti koje bi u budućnosti trebalo značajno unaprijediti različite dijelove ljudskog života među kojima se svakako ističe medicina. Korištenjem takve tehnologije otvara se mogućnost poboljšavanja postojećih, ali i otkrivanja novih fizičkih, kemijskih i bioloških svojstava materijala u nanometarskom rasponu dimenzija. Suvremeni nanotehnološki sustavi smatraju se oni raspona dimenzija od 1-1000 nm (Etheridge i sur, 2013).

Selektivno i ciljano djelovanje djelatne tvari kao krajnji domet razvoja novog lijeka za posljedicu sve češće ima odabir molekula (*new chemical entites*, NCEs) velike molekulske mase i lipofilnosti kao prikladnih kandidata za daljnji razvoj (40%). Molekule takvih fizikalno-kemijskih svojstava u pravilu prati i niska topljivost. Stoga mnoge molekule (NCEs) odabrane preciznom i selektivnom metodologijom kao prikladni kandidati za daljnji razvoj i ispitivanje karakterizira niska topljivost u vodenom mediju, a ponekad istovremeno i u organskim otapalima. Niska topljivost molekule posljedično dovodi do mnogih problema u daljnjim biofarmaceutskim ispitivanjima u razvoju lijeka, čini izazovnim razvoj krajnje formulacije te je često bila i razlog odustajanja od daljnjeg ispitivanja.

Promjene na molekularnoj razini (npr. stvaranje soli ili formiranje proliječka, kompleksacija sa ciklodekstrinima), korištenje koloidnih sustava (npr. mikroemulzije) ili promjene svojstava molekule na razini čestice (npr. smanjenje veličine čestica) neki su od načina poboljšanja topljivosti slabo topljivih molekula (Malamatari i sur., 2018).

Jedan od glavnih nedostataka u razvoju terapijskih nanosustava općenito je nisko uklapanje djelatne tvari u odnosu na veliku količina sustava/sirovina koji služe kao nosači djelatne tvari. Udio djelatne tvari otopljen/vezan/dispergirani u određenom nanosustavu smatra se uklopljenim.

Primjena tehnologije nanokristala omogućava povećanje topljivosti slabo topljive tvari te posljedično i njene bioraspoloživosti, bez korištenja nanonosaa čime se izbjegava problem uklapanja djelatne tvari (Gao, 2013).

1.9.1 NANOKRISTALI

Nanokristalizacija odnosno izrada nanokristala slabo topljive tvari postupak je smanjenja veličine čestica takve tvari do nanometarskog područja dimenzija. Smanjenjem veličine čestica, odnosno povećanjem površine čestica tvari u odnosu na volumen, povećava se topljivost i brzina otapanja te se poboljšavaju biofarmaceutske značajke slabo topljive tvari (Sun i sur., 2012).

Nanokristali su krute čestice teško topljive tvari nanometarskih veličina dispergirane najčešće u vodeno disperzijsko sredstvo (> 97 %). Takvi sustavi nazivaju se nanosuspencije, a sadržavaju i mali udio stabilizatora (1-2%) koji sprječava agregaciju i „rast“ nanokristala odnosno osigurava stabilnost sustava (Lu, 2016). Stabilizatori su pomoćne tvari koje se uobičajeno koriste u izradi odobrenih farmaceutskih oblika lijekova kao što su derivati celuloze, polivinilpirolidon (PVP), poloksameri ili amfifilni površinski aktivni spojevi kao što su polisorbati ili natrijev dodecil sulfat (SDS) (Rahim i sur., 2017).

Prednost nanokristala u odnosu na druge terapijske nanosustave je gotovo 100 %-tni sastav djelatne tvari bez potrebe korištenja nosača često neispitanog sigurnosnog profila sa niskim udjelom uklapanja djelatne tvari kao i primjereno iskorištenje procesa u različitim mjerilima (laboratorijsko, pilot, industrijsko) proizvodnje. Možemo reći da tehnologija primjene nanokristala dovodi do povećanja topljivosti i brzine otapanja slabo topljivih tvari te posljedično poboljšavanja biofarmaceutskih svojstava uz značajno smanjenje potencijalne

toksičnosti nosača/pomoćnih tvari karakterističnih za ostale nanosustave kao što su liposomi, micelle itd. (Lu i sur., 2017). Postoje različiti načini za poboljšanje topljivosti spojeva; na molekularnoj razini prolijevakova (Huttunen i sur., 2011), stvaranje soli (Serajuddin, 2007), sustavi ko-otapala (Seedher i Kanojia, 2009) ili ciklodekstrini (Bilensoy i Hincal, 2009). Također su intenzivno proučavana korištenja metastabilnih polimorfa na razini čestica (Blagden i sur., 2007), ko-kristali (Thakuria i sur., 2013), amorfni sustavi (Babu i Nangia, 2011) ili smanjenje veličine čestica (Tuomela i sur., 2015). Treći pristup za poboljšanje topljivosti/otapanja su koloidni sustavi (Thi i sur., 2009), (mikro/nano) emulzije (Shakeel i Faisal, 2010) ili različite vrste drugih sustava temeljenih na lipidima (Porter i sur., 2007). Na temelju fizikalno-kemijskih svojstava treba odabrati najprikladniji način za poboljšanje topljivosti (Shakeel i Faisal, 2010).

Primjena i terapijska vrijednost tehnologije nanokristala intenzivno se ispituje u razvoju farmaceutskih oblika lijekova za različite puteve primjene (oralna, dermalna, pulmonalna, intravenska, intramuskularna, intraperitonejska) i ciljanu dostavu (engl. *targeted drug delivery*) (Sun i sur., 2012). Posebno je potrebno naglasiti da je primjena tehnologije nanokristala znatno unaprijedila terapijsku vrijednost određenih djelatnih tvari u odobrenim lijekovima za oralnu (primjerice sirolimus, aprepitant, fenofibrat) i parenteralnu (olanzapin, paliperidon) primjenu na području Europske unije (Malamatari i sur., 2018).

1.9.2 SVOJSTVA NANOKRISTALA

1.9.2.1. FIZIČKO-KEMIJSKA SVOJSTVA NANOKRISTALA

Prema Noyes-Whitneyjevoj jednadžbi kojom se opisuje brzina otapanja krutina u otapalu (dc_x/dt), vidljivo je da je brzina otapanja krutine djelatne tvari veća što je veća specifična površina krutine s koje se odvija proces otapanja:

$$dc_x/dt = k \times A \times (c_s - c_x)$$

gdje je k konstanta brzine otapanja (tzv. intrinzička konstanta koja uključuje viskoznost otopine; što je veća viskoznost manja je brzina otapanja), A specifična površina krutine koja se otapa, c_s topljivost krutine, a c_x koncentracija djelatne tvari u otopini u vremenu t (Jašenjak i sur., 1998).

Ukoliko je veličina čestica smanjena sa 50 μm , što je tipična veličina mikronizirane krutine, na veličinu od 500 nm karakterističnu za nanokristale lijeka, dolazimo do povećanja brzine otapanja od 100 puta prema gore navedenoj Noyes-Whitneyjevoj jednadžbi.

Smanjenje debljine stacionarnog difuzijskog sloja otapala oko nanokristala u usporedbi s mikro- i makrokristalima krutine djelatne tvari također je bitno fizičko-kemijsko svojstvo krutine djelatne tvari nanometarskih dimenzija. Smanjena debljina stacionarnog difuzijskog sloja otapala oko nanokristala rezultira značajnim povećanjem koncentracijskog gradijenta pri procesu otapanja nanokristala djelatne tvari.

Povećanje topljivosti čestica tvari nanometarskih dimenzija njihovo je treće važno fizičko-kemijsko svojstvo. Topljivost je općenito definirana kao konstantna vrijednost pojedine tvari u određenom otapalu pri stalnoj temperaturi, a usitnjavanjem takve tvari do nanometarskog raspona dimenzija njezina topljivost se povećava (Lovrić i sur, 2015).

1.9.2.2. BIOFARMACEUTSKA SVOJSTVA NANOKRISTALA

Veliki broj čestica nanokristala djelatne tvari i njihova velika specifična površina dovodi do poboljšanja adhezivnosti te posljedično boljeg prijanjanja na površinu membrane preko kojeg će se djelatna tvar apsorbirati. Poboljšana adhezivnost nanočestica objašnjava se različitim teorijama koje uključuju elektrostatsku teoriju (međudjelovanja površine nanočestice i apsorpcijske membrane osnivaju se na elektrostatskim privlačnim silama), adsorpcijsku teoriju (međudjelovanja površine nanočestica i apsorpcijske membrane osnivaju se na privlačnim vodikovim i van der Waalsovima vezama), difuzijsku teoriju (međudjelovanja površine nanočestice i apsorpcijske membrane osnivaju se molekulskom ispreplitanju polimernih lanaca površine nanočestice i proteina apsorpcijske membrane), teorija zarobljavanja (engl. trapping theory) (osniva se na produljenom zadržavanju nanočestica na neravnoj površini apsorpcijske membrane) (Gao i sur 2013, Gao i sur 2012). Povećana topljivost i brzina otapanja te poboljšana adhezivnost na apsorpcijskoj membrani nanokristala djelatne tvari posljedično dovode do i bolje apsorpcije djelatne tvari.

Posljedica opisanih svojstava nanokristala koja uključuju povećanu topljivost, brzinu otapanja i specifičnu površinu te bolja svojstva adhezivnosti, dovode i do poboljšanja bioraspoloživosti djelatne tvari i s tim povezano poboljšanje terapijskog učinka (Lovrić i sur, 2015).

1.9.3 METODE IZRADE NANOKRISTALA

Nanokristali teško topljive tvari dobivaju se različitim farmaceutsko-tehnološkim metodama (primjerice vlažno mljevenje, visokotlačno homogeniziranje, kontrolirana precipitacija), a mogu se podijeliti u dvije glavne skupine:

- i) metode povećanja veličine čestica (engl. *bottom-up*)
- ii) metode smanjenja veličine čestica (engl. *top-down*).

Takozvanim “*top-down*” metodama ishodne krutine djelatne tvari sastavljene od velikih čestica slabo topljive tvari smanjuju se do nanometarskih dimenzija, dok se “*bottom-up*” metodama nanokristali talože iz prikladnih otopina slabo topljive tvari uz prisustvo odgovarajućeg antiotapala (Sun, 2012).

1.9.3.1. METODE POVEĆANJA VELIČINE ČESTICA

Metode izrade nanokristala “*bottom up*” temelje se na izradi otopine djelatne tvari u otapalu u kojem je takvu djelatnu tvar moguće relativno dobro otopiti. Nakon toga se otopina djelatne tvari miješa s antiotapalom. Miješanjem otopine djelatne tvari i antiotapala u različitim mehaničkim uređajima dolazi do nukleacije odnosno stvaranja kristalnih jezgri te daljnjeg „rasta“ čestica do nanokristala. Superkritični fluid, ultrazvučni valovi ili kontrolirano isparavanje otapala također se mogu se koristiti za poticanje nanokristalizacije.

Kod ove vrste postupaka dobivanja nanokristala kritičnu točku predstavlja precizno kontroliranje procesa taloženja te prevencija “rasta” kristala tijekom proizvodnje. Negativna strana ovih metoda svakako je, osim složenog postupka te potrebe za preciznom kontrolom procesa, i potencijalni rizik od ostalih organskih otapala (Sun, 2012).

1.9.3.2. METODE SMANJENJA VELIČINE ČESTICA

Metode izrade nanokristala smanjenjem veličine čestica temelje se na dvjema osnovnim tehnološkim postupcima: vlažno mljevenje i visokotlačno homogeniziranje.

Postupak vlažnog mljevenja je najčešće korištena metoda izrade nanokristala u farmaceutskoj industriji. Odvija se u komori za mljevenje djelovanjem smičnih sila kuglica ili perlica na velike čestice teško topljive tvari u vodenoj otopini uz dodatak najmanje jednog stabilizatora. Veličina čestica dobivenih postupkom vlažnog mljevenja ovisi o “čvrstoći” teško topljive tvari, utrošenoj energiji, vremenu mljevenja te koncentraciji stabilizatora.

Primjeri postupaka visokotlačnog homogeniziranja su mikrofluidizacija i homogenizacija na principu klipa i uskog otvora (engl. *piston gap homogenization*). Dok se postupak

mikrofluidizacije provodi pod visokim tlakom u komori Y-oblika u kojoj se čestice djelatne tvari usred kolizije, smicanja i kavitacije smanjenju do nanometarskih veličina, homogenizacija na principu klipa i uskog otvora dovodi do smanjenja veličine čestica prolaskom suspenzije teško topljive tvari kroz procjep pod tlakom. Sila smicanja, brzi protok suspenzije te kovitlac koji se stvara tijekom prolaska suspenzije kroz procjep dovode do smanjenja veličine čestica teško topljive tvari. Krajnji rezultat odnosno veličina čestica tvari ovisi o broju ciklusa i utrošenoj energiji.

U usporedbi s “*bottom-up*” postupcima, “*top-down*” postupci zahtijevaju mnogo više energije te vremenski dulje traju. Također, kao nedostatak se često ističe i kontaminacija česticama koje nastaju erozijom kuglica prilikom vlažnog mljevenja (Sun i sur, 2012).

1.9.3.2.1 MLJEVENJE U MINIJATURNOM MJERILU (engl. *top-down approach*)

U procesu razvoja novog lijeka kada se ispituje mogućnost dobivanja nanokristala djelatne tvari, moguće formulacije (vrsta i koncentracija stabilizatora, smjesa stabilizatora itd.) te različita ispitivanja stabilnosti, bitno je imati mogućnost provođenja ispitivanja u laboratorijskom mjerilu čime štedimo vrijeme, ali i ispitivanu molekulu. Kod početnih ispitivanja kada su dostupne količine ispitivane molekule često ograničene, potrebno je moći provesti ispitivanja u laboratorijskom mjerilu.

Komercijalno dostupna oprema za vlažno mljevenje zahtijeva minimalan volumen od 50-100 mL ispitivane suspenzije i ako uzmemo u obzir da za primjereni proces mljevenja trebamo suspenziju sa najmanje 5% ispitivane molekule (idealno 20%), dolazimo do minimalne količine od 2,5 g ispitivane tvari po jednom procesu mljevenja.

Prema Romero i sur. (2016) postupak vlažnog mljevenja moguće je provesti u minijaturnom mjerilu koristeći samo 0,5 mL suspenzije (50 mg ili 5 mg djelatne tvari, ovisno o koncentraciji ispitivane suspenzije) što je značajno manje u usporedbi sa komercijalnim Micron LAB 40 homogenizatorom za kojeg je potrebno 40 mL suspenzije (4 g ili 0,4 g djelatne tvari, ovisno o koncentraciji ispitivane suspenzije).

Postupkom vlažnog mljevenja u minijaturnom mjerilu dobivaju se parametri bitni za daljnji razvoj kao što su najmanja veličina čestica koju je moguće postići, kinetika smanjenja veličine čestica, utjecaj veličine kuglica na veličinu nanokristala kao i promjene u suspenziji koje se mogu dogoditi tijekom postupka vlažnog mljevenja (npr. stvaranje agregata). Također,

dobiveni podaci mogu se koristiti prilikom optimiziranja proizvodnog postupka u pilot ili industrijskom mjerilu.

Mogućnost provođenja postupka vlažnog mljevenja u minijaturnom mjerilu ubrzava proces razvoja, ali i olakšava postavljanje proizvodnog procesa, a istovremeno je jeftin te omogućava dobar uvid u testnu formulaciju (Romero i sur., 2016).

1.9.4 *IN VIVO* SUDBINA NANOKRISTALA

Iako je primjena tehnologije nanokristala unaprijedila terapijsku vrijednost različitih djelatnih tvari i obzirom da su poboljšali određene terapijske učinke u usporedbi s konvencionalnim formulacijama, njihova *in vivo* sudbina nije još uvijek razjašnjena. Jedan od glavnih problema je nedostatak funkcionalnih pristupa za otkrivanje nanokristala u tijelu. Obzirom na njihovu strukturalnu specifičnost, odnosno, pravilnu orijentaciju rešetke i odsustvo sustava/sirovina koji služe kao nosači djelatne tvari, teško je označiti nanokristale na isti način kao što je to učinjeno za nanonosače. Ono što je trenutno poznato o ponašanju nanokristala *in vivo* zapravo se temelji na farmakokinetičkim i biodistribucijskim podacima dobivenim praćenjem razina lijeka, no jasno je da se rezultati na temelju tih podataka ne mogu izravno ukazati na ponašanje nanokristala.

1.9.4.1. PRIMJENA NANOKRISTALA

Najčešći put primjene nanokristala je oralni. Tekući oralni oblici (odnosno suspenzije) te čvrsti oralni oblici (odnosno tablete i kapsule) najčešći su farmaceutski oblici korišteni za primjenu nanokristala (Malamatari i sur., 2018).

Oralno primijenjeni nanokristali susreću se s nizom fizioloških spojeva te pH gradijentom gastrointestinalnog sustava koji se kreće od pH 1,0-2,0 želuca, preko pH 6,0-7,4 tankog crijeva do pH >7,0 u rektumu. Nanokristali koji „prežive“ susret s gastrointestinalnim sustavom, apsorbiraju se putem sluznice. Kaveolin-posredovana endocitoza i makropinocitoza posredovana enterocitima kao i apsorpcija membranskim stanicama (M-stanice) smatraju se putevima prijenosa nanokristala iz gastrointestinalnog sustava. Stanični prijenos nanokristala kumarina proučavan je na modelu MDCKII jednoslojne kulture stanica te je pokazano da je kaveolin-posredovana endocitoza dominantan put prijenosa, kao i da su endoplazmatski retikulum/Golgijevo tijelo te Golgijevo tijelo/plazmatska membrana uključeni u egzocitozu nanokristala (Lu i sur, 2017). Nanokristali koji preživljavaju gastrointestinalnu okolinu mogu

biti zahvaćeni epitelom, kao što je opaženo u mezenteričnoj limfi pomoću transmisivskog elektronskog mikroskopa (Hollis, 2014).

Slično kao kod oralno primijenjenih nanokristala, *in vivo* sudbina intravenski (*iv.*) primijenjenih nanokristala ovisi o brzini njihovog otapanja u krvotoku. Sudbina *iv.* primijenjenih nanokristala ovisi o njihovoj međureakciji s imunološkim sustavom. Stanice monocitno-fagocitnog sustava (engl. *mononuclear phagocyte system*, MPS) otkrivaju nanokristale kao strane čestice te ih posljedično tome vrlo brzo fagocitiraju. Primjerice, 5 minuta nakon *iv.* primjene i do 90% doze završi u jetrenim makrofazima (Kupfferove stanice) te oko 5% u makrofazima gušterače. Otprilike 5-10 minuta nakon primjene je potrebno da se nanokristali otope, a neotopljeni kristali završe u jetri te manjim dijelom u slezeni. Ovakav ishod *iv.* primjene nanokristala ima različite posljedice koje uključuju citotoksični učinak na makrofage. Akumulacija u jetri dovodi do promjene farmakokinetičkog profila primijenjene molekule. Ovakav ishod može se smatrati i poželjnim kod nekih molekula te dovesti do razvoja novog farmaceutskog oblika (injekcija nanosuspenzije) u odnosu na infuzijsku primjenu otopine iste molekule (Müller i sur., 2011).

Istraživanja nanokristala paklitaksela veličine 200 nm, poznatog i često korištenog citostatika, nakon *iv.* primjene na modelu miša nositelja HT-29 tumorskih stanica pokazala su jednak protutumorski učinak nanokristala uz značajno smanjenu toksičnost u odnosu na odobreni lijek Taxol. Isto ispitivanje pokazalo je i da se nanokristali nakon *iv.* primjene akumuliraju u jetri, plućima, slezeni i bubrezima pri čemu je njihova koncentracija bila značajno manja u tumorskom tkivu nego u ranije navedenim organima što se može pripisati ne samo svojstvima nanokristala nego i tipu ispitivanog tumorskog modela. Međutim, čak je i koncentracija od 1% nanokristala unutar tumora pokazala dobar protutumorski učinak te je posljedično zaključeno da bi ključ dobre protutumorske terapije mogao biti u smanjenju akumulacije protutumorskog lijeka u ključnim organima (npr. srcu i mozgu) kako bi se smanjile poznate nuspojave (Hollis i sur., 2013).

U posljednje vrijeme počinje se ispitivati mogućnost dermalne primjene nanokristala, pogotovo nakon dobrih rezultata kozmetičkih pripravaka. Naime, kozmetički pripravci Juvedical (Juvena Marlies Moller AG) i Platinum Rare collection (La Prairie) sadržavaju nanokristale prirodnih antioksidansa rutina i hesperidina. Formulacija sa nanokristalima rutina (Juvedical) pokazala je 1000x veću aktivnost u odnosu na dermalno primijenjen topljivi derivat rutin-glikozid. Osim navedenih antioksidanasa, ispituju se i nanosuspenzije sa kafeinom i diklofenakom za dermalnu primjenu (Malamatari i sur., 2018; Lu i sur., 2017).

Idealan oblik za dostavu slabo topljive molekule u pluća bili bi nanokristali u obliku aerosola. Generalno gledajući, bolje otapanje i produljeno zadržavanje molekule doprinose poboljšanju bioraspoloživosti. Pretpostavlja se da mehanizmi uključeni u sudbinu nanokristala nakon inhalacije uključuju otapanje, uklanjanje mukocilijarnim sustavom, fagocitozu makrofazima te prijenos u stanice, krv i limfu (Lu i sur., 2017). Apsorpcija te bioraspoloživost inhaliranog lijeka ovise o udjelu lijeka koji se zadržava te otapa u plućnim tekućinama. Jednom kad čestice lijeka dospiju na površnu pluća, bivaju uklonjene mukocilijarnim sustavom te apsorbirane, što predstavlja dva međusobno kompetitivna mehanizma koji odlučuju o sudbini primijenjenog lijeka. Kada mukocilijarni sustav brže uklanja čestice djelatne tvari nego što se one stignu otopiti i apsorbirati, kao u slučaju molekula slabe topljivosti, posljedično dolazi do smanjenja apsorpcije i bioraspoloživosti. Pokazano je da se slabo topljive molekule brže otapaju te apsorbiraju nakon inhalacije kada se u farmaceutskim oblicima nalaze u nanočesticama.

Intramuskularno primijenjeni nanokristali molekule paliperidonpalmitat ispoljavaju terapijsko djelovanje jedan mjesec nakon primjene što se pripisuje ograničenom otapanju koje je dovelo do promjene u farmakokinetici lijeka. Međutim, i mišićno tkivo pridonosi produljenom djelovanju nanokristala paliperidonpalmitata. Primijećeno je da nanokristali na mjestu injiciranja potiču razvoj granulomatozne upalne reakcije. Skladište za formulaciju je okruženo gustom upalnom ovojnicom, koja obuhvaća uglavnom epitelioidne makrofage, više od 24 sata nakon primjene. Također je uočena unutarstanična prisutnost nanokristala unutar makrofaga koji okružuju skladište. Sporo unutarstanično otapanje unutar makrofaga vjerojatno pridonosi produljenom oslobađanju intramuskularno injiciranih nanokristala (Malamatari i sur., 2018; Lu i sur., 2017).

1.9.5 TOKSIČNOST NANOČESTICA

Dostupne su različite metode za procjenu toksičnosti nanočestica na organizme. Na Slici 5. prikazane su vrste nanočestica, eksperimentalni modeli i toksično djelovanje nanočestica. Metode za procjenu toksičnosti mogu se kategorizirati kao *in vitro* i *in vivo*.

In vitro procjena toksičnosti nanočestica je jedna od važnijih metoda. Prednosti uključuju niže troškove, brže i minimalne etičke brige. Procjena se može podijeliti na proliferacijsku analizu, test apoptoze, test nekroze, test oksidativnog stresa i analizu oštećenja DNA.

Procjena toksičnosti *in vivo* normalno se provodi na životinjskim modelima kao što su miševi i štakori. Metode procjene toksičnosti *in vivo* uključuju biološku raspodjelu, hematologiju, sastav seruma i histopatologiju. Istraživanja biološke raspodjele ispituju put lokalizacije nanočestica u tkivo ili organ. Nanočestice se otkrivaju kod žrtvovanih ili živih životinja putem radioaktivnih oznaka (Kim, 2001). Pročišćavanje nanočestica provodi se ispitivanjem izlučivanja i metabolizma nanočestica u različitim vremenskim točkama nakon izlaganja (Li, 2001). Druga metoda za procjenu toksičnosti *in vivo* je ispitivanje promjena u sastavu seruma i tipu stanica nakon izlaganja nanočesticama (Baker, 2008). Histopatologija stanice, tkiva ili organa nakon izlaganja koristi se za određivanje razine toksičnosti uzrokovane nanočesticama. Histopatološki pregled koristi se za tkiva izložena nanočesticama kao što su pluća, oči, mozak, jetra, bubrezi, srce i slezena (Zhu, 2008). Unapređenje procjene toksičnosti uključuje uporabu mikroelektrokemije i mikrofluida.

1.9.5.1. UTJECAJ NA ORGANIZAM

U modelima *in vivo* učinak nanokristala je vjerojatno povezan s njihovim načinom primjene. Različite istraživačke skupine otkrile su da izloženost nanočestica dišnom sustavu može rezultirati astmom, bronhitisom, emfizemom i rakom pluća. Unošenje nanočestica kroz gastrointestinalni sustav može dovesti do Crohnove bolesti i raka debelog crijeva. Nadalje, otkriveno je da izlaganje nanočestica cirkulacijskom sustavu može dovesti do zgrušavanja krvi i bolesti srca (Madani i sur., 2013; Buzea i sur., 2007).

U istraživanju kalifornijske pastrve liječene SW-CNT-om (engl. *Single-walled carbon nanotubes*) u količini od 0,1-0,5 mg/L tijekom 10 dana, SW-CNT je uzrokovao respiratornu toksičnost, odgovornu za neurotoksičnost i oštećenja staničnog ciklusa. MW-CNT (engl. *Multi-walled carbon nanotubes*) također su poznati po povećanoj frekvenciji mikronukleusa i kromosomskim aberacijama, promicanju alergijskog odgovora kod miševa, aktivaciji ciklooksigenaznih enzima potiskivanjem sustavne imunostne funkcije u slezeni i promjeni ekspresije gena u jetri (Nygaard i sur., 2009). Ostali učinci MW-CNT-a uključuju apoptozu, fenotipske nedostake, toksičnost u bakterijama i nastanak abnormalne kralježnice u embriju zebrice (Kang i sur., 2008). *In vivo* izlaganje nanočestica zlata uzrokovalo je apoptozu i akutnu upalu u jetri, bioakumulaciju u organima i sposobnost prodora u područjima glave i repa sperme (Wiwantkit i sur., 2009). U istraživanju je korišteno 13 nanometarskih zlatnih nanočestica obloženih PEG-om za promatranje toksičnosti u jetri. Uočeno je da se čestice nakupljaju u jetri i slezeni do 7 dana nakon injiciranja. Ove nanočestice izazivaju apoptozu i upalu u jetri.

Istraživanje je također pokazalo prisutnost nanočestica zlata obloženih PEG-om u makrofagima slezene i lizosomu jetre (Cho, 2009). *In vivo* istraživanja su izvijestile o oticanju astrociti, uništenju krvno-moždane barijere, oksidativnom stresu izazvanom slobodnim radikalima, promjeni ekspresije gena i oštećenju neurona prilikom izloženosti nanočesticama srebra (Rahman, 2009).



Slika 5.: Tipovi nanočestica i eksperimentalni modeli korišteni za proučavanje nanočestica kao i njihovi toksični učinci (Preuzeto i prilagođeno prema Kumar i sur., 2016).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj rada jest istražiti učinke resveratrola i njegovih nanokristala u dozi od 25 mg/kg na inhibiciju rasta Ehrlichovog ascitesnog tumora, broj krvnih žila u peritoneumu i mehanizam stanične smrti, te istražiti odnos između razine oštećenja jetre i bubrega kroz histološku analizu prisutnosti stanica u mitozu, apoptozu i nekrozu te razine oksidacijskog stresa u njima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1 POKUSNE ŽIVOTINJE

U istraživanju su korišteni visokosrodni Swiss albino miševi istog spola stari 2 do 3 mjeseca, mase 20 do 25 grama, uzgojeni na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Istraživanje je provedeno na ukupno 18 mužjaka podijeljenih u 3 skupine sa po 6 životinja s obzirom na obradu (otopina resveratrola i njegovi nanokristali). Životinje su hranjene standardnom hranom za laboratorijske životinje (4RF 21 Mucedola S.R.L., Italija), uz stalnu dostupnost vode. Uvjeti su bili standardni; dnevni ritam od 12 sati dana i 12 sati mraka, temperatura 24 °C uz kontroliranu vlažnost zraka.

Istraživanje je provedeno prema etičkim načelima važećima u Republici Hrvatskoj (Pravilnik o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa, Narodne Novine br. 19/1999; Zakon o zaštiti životinja, Narodne novine br. 102/2017) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS (NIH) Publ # 86-23, 1985).

3.1.2 TUMORSKE STANICE

Ehrlichov ascitesni tumor (EAT) izvorno se javlja kao spontani karcinom mliječne žlijezde u miša. EAT je slabo diferencirani, heterogeni, brzorastući zloćudni tumor koji sadrži populacije stanica različite osjetljivosti. Stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora održavale su se intraperitonealno (*ip*) u Swiss albino miševima serijskim presađivanjem stanica svakih 7 dana u obliku ascitesa. Najprije se ispere trbušna šupljina s 3 mL fiziološke otopine te se lagano masira trbušna stijenka. Zatim se napravi rez i otvori peritonealna šupljina miša pri čemu se Pasteurovom pipetom uzme peritonealna tekućina s tumorskim stanicama i razrijedi s fiziološkom otopinom (0,9% otopina natrij klorida, Pliva) do ciljane koncentracije $2,5 \times 10^6$ EAT stanica/0,5 mL.

3.1.3 RESVERATROL

3.1.3.1. PRIPREMA RESVERATROLA

Otopina resveratrola pripravljena je otapanjem resveratrola u pročišćenoj vodi i DMSO koristeći najmanju moguću količinu DMSO (16 mg/mL) kako bi se povećala njegova topljivost. Otopina resveratrola primijenjena je *ip* u dozi od 25 mg/kg.

3.1.3.2. PRIPREMA NANOKRISTALA RESVERATROLA

Kao metoda pripreme nanokristala resveratrola korištena je modificirana metoda prema Romero i sur., 2015) odnosno metoda mljevenja u minijaturnom mjerilu, engl. "*top-down approach*".

Za dobivanje nanokristala resveratrola pripravljena je 5% suspenzija resveratrola (w/w) i 1% stabilizatora Pluronic F127 proizvođača Sigma-Aldrich. Dobivena suspenzija podvrgnuta je mljevenju u minijaturnom mjerilu (engl. *top-down approach*). Postupak mljevanja suspenzije provodi se u okrugloj bočici dimenzija 12 × 35 mm koja sadržava pet cilindričnih magneta dimenzija 10 x 6 mm. Kao medij za mljevenje suspenzije korištena je smjesa kuglica itrij stabiliziranog cirkonijevog oksida različitih veličina (0,1 mm, 0,2 mm i 0,4 - 0,6 mm) pomiješanih u jednakim omjerima. Za postupak mljevenja korišten je mješač Magnetic stirrer MIX 15 eco, Berlin, Njemačka. Pripravljena suspenzija nanokristala resveratrola primijenjena je *ip* u dozi od 25 mg/kg.

3.1.4 LABORATORIJSKA OPREMA

Centrifuga: Centrifuge 5702 (proizvođač: Eppendorf, Njemačka);

Spektrofotometar: Libra S22 (proizvođač: Biochrom, UK) i UV-160, Shimadzu

Mikrotitarski čitač Microplate reader Model 550, Bio-Rad i iEMS Reader MF, Labsystems

Vaga: ABS 220 – 4 (proizvođač: Kern & Sohn, Njemačka)

Vortex: Vortex Genius 3 (proizvođač: IKA, SAD)

Homogenizator: Sonopuls mini (proizvođač: Bandelin, Njemačka).

3.2 METODE

3.2.1 OBRADA ŽIVOTINJA

Nakon početnog vaganja, miševi istog spola podijeljeni su u 3 skupine po 6 jedinki, te je u njih intraperitonealno (*ip*) injicirano $2,5 \times 10^6$ EAT stanica što označava 0. dan pokusa. Obrada životinja s EAT tumorom po skupinama započeta je idućeg dana (1. dan pokusa) *ip* injiciranjem resveratrola u dozi od 25 mg/kg i nanokristala resveratrola u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Kontrolna skupina obrađena je *ip* s fiziološkom otopinom (Tablica 3.). Životinje su žrtvovane nakon 15 dana njihove obrade kako bi se prikupila tkiva i organi za daljnju analizu. Prilikom žrtvovanja, životinje su adekvatno anestetizirane i analgezirane *ip* primjenom kombinacije Narketana® (Vetoquinol S.A. BP 189 Lure Cedex, Francuska) i Xylapana® (Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska).

Tablica 3.: Pokusne skupine i način obrade

Miševi nositelji EAT u ascitesnom obliku ($2,5 \times 10^6$, <i>ip</i>)	
SKUPINA	OBRADA
Kontrola	Fiziološka otopina
Nanokristali-resveratrol 25	25 mg/kg suspenzija nanokristala resveratrola
Resveratrol 25	25 mg/kg otopina resveratrola (otapalo DMSO)

3.2.2 PRAĆENJE PROMJENA TJELESNE MASE

Prije početka izvođenja pokusa, kao i tijekom samog izvođenja pokusa, životinje su pojedinačno označene i izvagane. Na temelju mase životinja za pojedinu skupinu određena je količina pojedinačnih pripravka koje su davane tijekom pokusa, te je praćena promjena mase tijekom izvođenja pokusa. Mjerenja tjelesnih masa obavljena su digitalnom vagom.

3.2.2.1. RELATIVNI INDEKS TEŽINE ORGANA

Relativna težina organa izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$\text{relativna težina organa (g/100 g)} = \frac{\text{ukupna težina organa} \times 100}{\text{konačna tjelesna težina}}$$

Relativna težina organa izražena je u g/100 g.

3.2.3 ODREĐIVANJE UKUPNOG VOLUMENA PERITONEALNE TEKUĆINE I ODREĐIVANJE BROJA STANICA U PERITONEALNOJ TEKUĆINI

Nakon ispiranja peritoneuma s 3 mL fiziološke otopine i lagane masaže trbuha, napravljen je rez i otvorena je peritonealna šupljina miša te je Pasteurovom pipetom uzeta peritonealna tekućina. Pomoću graduiranih epruveta izmjeren je ukupni volumen peritonealne tekućine koja je dobivena od pojedinog miša. Broj živih i mrtvih tumorskih stanica u peritonealnoj tekućini određen je brojanjem stanica obojenih tripanskim modrilom u Bürker-Türkovoju komorici. Žive tumorske stanice su neobojane zbog sposobnosti izbacivanja boje, dok su mrtve tumorske stanice plavo obojane. Postotak inhibicije rasta tumora preračunat je prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije tumora} = \left(\frac{\text{br. stanica u kontroli} - \text{br. stanica u pokusnoj skupini}}{\text{br. stanica u kontroli}} \right) \times 100\%$$

3.2.4 ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDACIJSKOG STRESA

3.2.4.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA METODOM PO LOWRY-U

Metodom po Lowry-u i sur. (1951) određena je količina proteina u uzorcima tkiva bubrega i jetre. Metoda kombinira oksidaciju aromatskih bočnih ogranaka i biuretsku reakciju. Biuretska reakcija temelji se na redukciji bakra u reakciji sa peptidnom vezom proteina u lužnatom mediju. Ioni Cu^{2+} vežu se na peptidne veze i reduciraju u Cu^+ te nastaje kompleks Cu^+ - protein. Dodatkom Folinova reagensa u reakcijsku smjesu dolazi do njegove reakcije sa Cu^+ - protein kompleksom kao i sa bočnim lancima Tyr, Trp i Cys (tirozina, triptofana i cisteina) stvarajući u početku nestabilan kompleks koji se polako reducira pri čemu se razvija plavo obojenje otopine.

Uzorci tkiva bubrega razrijeđeni su 10x, dok su uzorci jetre razrijeđeni 40x. U epruvetu je stavljeno 100 μL uzorka i 2 mL otopine D (Tablica 4.) te je 10 min inkubirano na sobnoj temperaturi. Zatim je dodano 200 μL otopine E (Tablica 4.) te su uzorci vorteksirani i stavljeni na inkubaciju u mraku u trajanju od 30 min na sobnoj temperaturi. Apsorbancija je izmjerena na spektrofotometru na valnoj duljini od 600 nm. Kao standard korišten je albumin govedeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*, BSA) u poznatim koncentracijama (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625 mg/mL). Korištenjem standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o

koncentraciji BSA određen je nagib pravca, te su koncentracije proteina u uzorcima izračunate preko nagiba pravca, prema formuli:

$$c = \left(\frac{A_{uzorka} - b_{st.krivulje}}{\text{nagib pravca st. krivulje}} \right) \times \text{razrijeđenje}$$

Koncentracije su izražene kao mg proteina/mL uzorka.

Tablica 4.: Priprema otopina za određivanje proteina

Otopine	Način pripreme
Otopina A: 2% (w/v) Na ₂ CO ₃ u 0,1M NaOH	9,6 g + 480 mL 0,1M NaOH
Otopina B: 1% (w/v) natrij-kalij tartarat u dH ₂ O	0,1 g + 10 mL dH ₂ O
Otopina C: 0,5% (w/v) CuSO ₄ × 5H ₂ O u dH ₂ O	0,05 g + 10 mL dH ₂ O
Otopina D	pomiješati otopine A:B:C u omjeru 48:1:1
Otopina E	pomiješati Folin & Ciocalteu's phenol reagens i dH ₂ O u omjeru 2:1 (npr. 14 mL Folin & Ciocalteu's phenol reagens + 7 mL dH ₂ O)

3.2.4.2. MJERENJE RAZINE LIPIDNE PEROKSIDACIJE

Malondialdehid (MDA) u organizmu nastaje kao posljedica lipidne peroksidacije, odnosno kada reaktivni kisikovi spojevi razgrađuju višestruko nezasićene masne kiseline pri čemu nastaju razni aldehidi, pa tako i MDA. Za određivanje koncentracije MDA u biološkom uzorku najčešće se koristi metoda derivatizacije MDA s 2-tiobarbituratnom kiselinom (TBA) pri čemu MDA reagira s dva ekvivalenta TBA i nastaje MDA-(TBA)₂ kompleks. Kako bismo dobili crveni fluorescentni kompleks MDA-(TBA)₂, reakcija se mora odvijati na visokoj temperaturi (95 °C) i u kiselim uvjetima. Zatim se koncentracija MDA-(TBA)₂ mjeri na spektrofotometru pri valnoj duljini od 532 nm.

Za mjerenje MDA u uzorcima tkiva jetre i bubrega korišteni su homogenati. U Eppendorf epruvetu stavljeno je 100 µL uzorka i dodano je 1,6 mL prethodno pripremljene otopine A (Tablica 5.). Stalak sa epruvetama umotan u aluminijsku foliju stavljen je u vodenu kupelj 60 min na 95 °C. Nakon toga se otopina naglo ohladi, pa je stalak s epruvetama stavljen na led 10 min te su potom uzorci centrifugirani na 5000 okretaja 10 min. Hlađenjem su se folikule, koje su nastale miješanjem uzorka i otopine A, slegnule na dno. Supernatant je odvojen i mjerena je apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 532 nm. Ukupna

koncentracija MDA izračunata je pomoću ekstinkcijskog koeficijenta za MDA ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) prema sljedećoj formuli:

$$C = \frac{A_{uzorka} \times V_{reakcijske \text{ smjese}}(mL)}{\epsilon \times V_{uzorka}(mL) \times C_{proteina \text{ u uzorku}}(\frac{mg}{mL})}$$

Ukupna koncentracija MDA izražena je kao nmol MDA po mg proteina.

Tablica 5.: Priprema otopina za određivanje koncentracije MDA

Otopine	Način pripreme otopina
8,1% SDS	0,81 g SDS-a u 10 mL dH ₂ O
20% octena kiselina	20 mL 99,5% octene kiseline i 2,31 mL HCl, nadopuni se do 50 mL dH ₂ O i podesi pH = 3,5 te nadopuni s dH ₂ O do 100 mL
0,8% TBA	0,8 g TBA u 40 mL dH ₂ O uz lagano zagrijavanje. Nakon što se otopi dodaje se 500 µL 5M NaOH te se nadopuni s dH ₂ O do 100 mL.
Otopina A	100 µL 8,1% SDS + 750 µL 20% octene kiseline (pH = 3,5) + 750 µL 0,81% TBA

3.2.4.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNOG GLUTATIONA (GSH)

Tietze (1969) je opisao modificiranu metodu prema kojoj je određena količina ukupnog glutationa u uzorcima tkiva jetre i bubrega. U stanicama sisavaca, jedan od najznačajnijih antioksidanasa jest reducirani oblik glutationa (GSH). Sulfhidrilna grupa GSH reagira sa tiolnim reagensom 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) pri čemu nastaje žuto obojeni kromofor (5-tionitrobenzoična kiselina (TNB)) koji se može očitati fotometrijski na valnoj duljini 405-415 nm. Osim TNB, stvara se i miješani disulfid, GS-TNB, čijom se daljnjom redukcijom GSH reduktazom i NADPH otpušta molekula TNB i reciklira GSH. Brzina nastanka TNB je proporcionalna reciklirajućoj reakciji koja je izravno proporcionalna koncentraciji GSH u uzorku. U ovoj metodi sav oksidirani GSH (disulfid GSSG) brzo se reducira do GSH. Konačan dobiveni rezultat odgovara ukupnoj koncentraciji oksidiranog i reduciranog GSH u uzorku.

Mjerenje koncentracije ukupnog GSH provedeno je u mikrotitarskoj pločici korištenjem razrjeđenja 10x za uzorke bubrega i razrjeđenje 40x za uzorke jetre. U svaku pojedinu jažicu

dodano je 20 μL uzorka, 40 μL 0,035M HCl i 40 μL 10mM DTNB nakon čega je slijedila inkubacija 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancija je mjerena na valnoj duljini od 415 nm. Zatim je dodano 100 μL otopine GR (20 μL GR (50 U/mL) + 9980 μL 0,8mM NADPH) te je apsorbancija mjerena tijekom 5 min. Za sve standarde nacrtani su pravci kao promjena apsorbancije u vremenu. Nakon očitavanja nagiba pravca, nacrtan je pravac kao ovisnost nagiba pravca o koncentraciji GSH. Taj dobiveni pravac korišten je za dobivanje koncentracije ukupnog GSH u uzorku prema formuli:

$$c = \frac{\text{nagib pravca} - \text{nagib slijepe probe}}{\text{nagib pravca standarda}} \times \text{razrjeđenje}$$

Koncentracija ukupnog GSH prikazna je kao μM GSH po mL proteina.

3.2.4.4. MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DISMUTAZE (SOD)

Flohé i Ötting (1971) opisali su metodu prema kojoj je određena aktivnost superoksid dismutaze u uzorcima. SOD je metaloenzim koji katalizira dismutaciju dvaju superoksidnih radikala (O_2^-) u kisik i vodikov peroksid. SOD su bjelančevine koje kao kofaktor sadrže bakar, cink, mangan, željezo ili nikal. Aktivnost SOD određuje se inhibicijom redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza (XOD).

U metodi su korištene dvije slijepe probe; prva je bila samo otopina A (Tablica 6) kojoj je na valnoj duljini od 550 nm tijekom 3 minute u spektrofotometru izmjerena apsorbancija, dok je druga slijepe proba koristila za namještanje aktivnosti ksantin oksidaze (XOD) koja treba biti oko 0,025 U/min. Uzorci su analizirani tek nakon što se postignula optimalna aktivnost SOD. U kivetu je stavljeno 25 μL fosfatnog pufera, 1,45 mL otopine A i na kraju enzim XOD u početnom volumenu od 25 μL . U svaku reakcijsku smjesu, umjesto pufera, dodano je 25 μL uzorka i odgovarajući volumen ksantin oksidaze te je odmah nakon toga mjerena apsorbancija u spektrofotometru. Za određivanje aktivnosti SOD prvo je izračunat postotak inhibicije aktivnosti XOD prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = 100 - \frac{\Delta A_{\text{uzorka}}}{\Delta A_{\text{slijepe probe}}} \times 100.$$

Iz % inhibicije je izračunata aktivnost SOD izražena kao U/mL uzorka prema formuli:

$$\text{aktivnost SOD} = 10^{\frac{\% \text{inhibicije} + 12,757}{30,932}}.$$

Aktivnost SOD (U/mg proteina) je izračunata prema formuli:

$$\text{aktivnost SOD} = \frac{\text{aktivnost SOD U/mL}}{c_{\text{proteina u uzorku}}} \times \text{razrjeđenje}.$$

Korištena razrjeđenja uzoraka bubrega jesu 10x, dok su za jetru korištena razrjeđenja 40x.

Tablica 6.: Priprema otopina za određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Otopine	Način pripreme otopina
50mM PBS	Pomiješati 17 mL (1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u 50 mL dH_2O) i 183 mL (5,678 g Na_2HPO_4 u 200 mL dH_2O), namjestiti $\text{pH} = 7,8$ te nadopuniti do 800 mL dH_2O
50mM PBS s 0,1mM EDTA	3,72 mg EDTA u 100 mL 50mM PBS
Reakcijska otopina A	190 mL 0,05 mM citokroma c (29 mg citokroma c u 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA do 190 mL) i 19 mL 1mM ksantina (3 mg ksantina u 19,74 mL 1mM NaOH, teško se otapa, lagano zagrijavati)
Reakcijska otopina B XOD (aktivnost 0,8 U/mL)	40 μL ksantin oksidaze i 960 μL dH_2O

3.2.4.5. MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI KATALAZE (CAT)

Spektrofotometrijskom metodom po Aebiju (1984) određena je aktivnost katalaze; aktivnost katalaze se u ovoj metodi određuje kao količina potrošenog vodikovog peroksida (H_2O_2). Za određivanje katalaze korištena su razrjeđenja 40x za uzorke bubrega, dok su za uzorke jetre korištena razrjeđenja 100x. U kivetu ukupnog volumena 1 mL dodano je 20 μL uzorka i 980 μL prethodno pripremljenog 10mM H_2O_2 (113 μL 30% H_2O_2 + 99,887 mL PBS). Aktivnost katalaze mjerila se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 240 nm tijekom jedne minute i izračunata je prema formuli:

$$CAT = \frac{A_{uzorka}}{\varepsilon_{(\text{H}_2\text{O}_2)} \times l} \times \text{razrjeđenje}$$

Ekstinkcijski koeficijent H_2O_2 je $\varepsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a broj l je jednak putu koji zraka svijetla prođe kroz kivetu (1 cm). Dobivena koncentracija izražena je kao U/mg proteina, što odgovara μmol razgrađenog H_2O_2 u minuti po miligramu proteina.

3.2.5 HISTOLOŠKE METODE

3.2.5.1. POSTUPAK PROŽIMANJA TKIVA PARAFINOM

Prilikom uzimanja biološkog materijala, tkiva se pripremaju za daljnju obradu. Tkivo je izrezano na komadiće veličine 2x1x0,5cm te je prošlo kroz proces fiksacije u posudama s puferiranim, neutralnim 10% formalinom kroz 24 - 48 sati. Zatim su uzorci tkiva stavljeni i zatvoreni u plastične kazete te su uklopljeni u parafin u uređaju za prožimanje tkiva parafinom. Postupak prožimanja tkiva parafinom je trajao oko 22 sata na sobnoj temperaturi u seriji od uzlaznog niza alkohola (70% alkohol – 96% alkohol – apsolutni alkohol), ksilena do parafina. Tkiva prožeta parafinom premještena su u kalupe te zalivena tekućim parafinom 56 - 58 °C. Dobiveni parafinski blokovi ohlađeni su na -20 °C kako bi se tkivo moglo tanko izrezati.

3.2.5.2. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE

Uzorci tumorskog tkiva uklopljeni u parafinske blokove izrezani su na debljinu od 2-3 µm. Iz svakog bloka izrezano je više rezova od kojih je jedan obojan hematoksilin-eozinom za patohistološku analizu, dok su ostali ostavljeni za imunohistokemijsku obradu. Rez je stavljen na površinu vode zagrijanu do 55 °C da se malo razvuče te je montiran na silanizirana predmetna stakalca. Stakalca sa uzorcima tumorskog tkiva osušena su u termostatu pri 60 °C oko 40 minuta.

Tako pripremljene uzorke tumorskog tkiva potrebno je deparafinirati i rehidrirati prije imunohistokemijske reakcije. To se provodi u nizu ksilena i silaznih alkohola (apsolutni alkohol – 96% alkohol – 70% alkohol) do destilirane vode.

U biološkom materijalu fiksiranom formalinom, stvaraju se molekularne interakcije, pa je tkiva potrebno obraditi prije imunohistokemijske reakcije kako bi željeni epitopi (antigeni) postali slobodni i dostupni za protutijela. Termičkom obradom tkiva u vodenoj kupelji na 97 °C u trajanju od 20 minuta u Tris/EDTA puferu (DakoCytomation, Target Retrieval Solution, S 2368, Glostrup, Danska), pH = 9,0, koji istovremeno deparafinira tkivo i demaskira antigen, pripremljeno je tkivo za daljnji postupak. Nakon kuhanja, stakla su ostavljena u puferu na sobnoj temperaturi oko 20 minuta kako bi se ohladila te su isprana destiliranom vodom.

Proces imunohistokemijskog bojanja provodi se na sobnoj temperaturi u automatiziranom uređaju za imunohistokemijsko bojenje (DakoAutostainer, Dako Danska). Za određivanje izraženosti primarnih protutijela korištena je HRP/DAB metoda u kojoj se mjesto vezanja primarnog protutijela vizualizira pomoću anti-mouse/rabbit sekundarnog protutijela, koje se sastoji od polimera dekstrana na koji je konjugirano sekundarno protutijelo i molekule

enzima peroksidaze. Kao kromogen u ovoj reakciji korišten je DAB (3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid) koji daje smeđe obojenje. Za cijeli postupak korišten je EnVision™ FLEX/HRP kit (K8010, Dako, Danska) koji sadrži sve potrebne reagense. 10 minutnom inkubacijom s DAB (3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid) kromogenom omogućena je vizualizacija specifične imunohistokemijske reakcije te kontrastno obojenje hematoksilinom kako bi bile vidljive sve histološke strukture. Zatim su stakla dehidrirana u uzlaznom nizu alkohola (70% alkohol – 96% alkohol – apsolutni alkohol), razbistrena u ksilenu te pokrivena pokrovnicom.

3.2.5.3. MIKROSKOPIRANJE

Nakon što su uzorci obojani i pripremljeni, uslijedilo je mikroskopiranje. Izbrojane su krvne žile na cijelim uzorcima jetre i bubrega, dok su na jetri izbrojane u 10 vidnih polja najvećeg povećanja 5x.

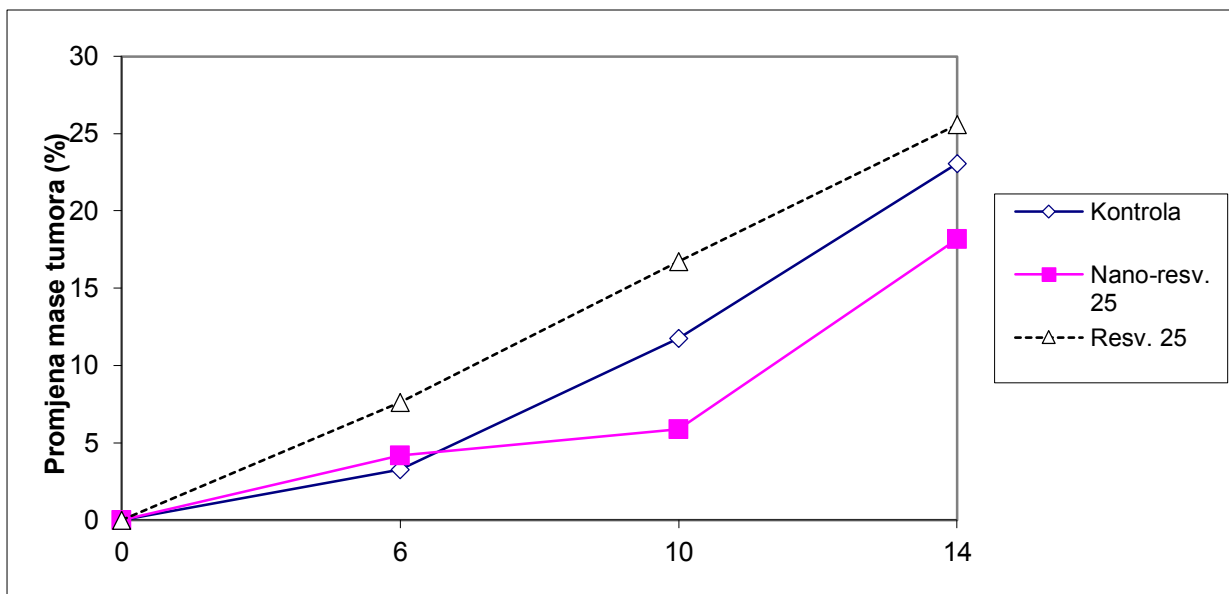
3.3 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička analiza je provedena pomoću STATISTICA 13 programa (StatSoft, Tulsa, OK, USA), a statistička točnost određena je s $P < 0,05$. Svi rezultati izraženi su kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška (SV \pm SP). Podaci su analizirani pomoću Kruskal-Wallis ANOVA-a testa. Daljnja analiza koja ukazuje na razlike između skupina napravljena je višestrukom komparacijom srednjih vrijednosti svih skupina. Rezultati su prikazani tablično i grafički pomoću box-plot prikaza. Za pripremu podataka korišten je računalni program Microsoft Excel 2016.

4. REZULTATI

4.1 PROMJENA MASE TUMORA

Praćenjem promjene tjelesne mase, pratili smo promjenu mase tumora tijekom pokusa te dobili uvid u brzinu rasta mase tumora, odnosno, volumena ascitesa kod pojedine skupine, gdje je rast tumora izračunat kao % u odnosu na početnu masu tumora unutar skupine. Rezultati su prikazani na Slici 6. Kod kontrole je zamijećen lagani rast tjelesne mase (TM) tijekom prvih 6 dana od unosa EAT stanica, te oštri, linearni rast TM od 6. do 14. dana. Skupina obrađena nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg prati kontrolnu skupinu u povećanju TM prvih 6 dana, nakon čega slijedi blagi pad TM do 10 dana u odnosu na ostale skupine, te ponovni rast od 10 do 14. dana. Najveće odstupanje u rastu tumora, tj. promjeni TM pokazuje skupina obrađena s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg koja ima najbrži linearni porast TM tijekom perioda obrade. Sve obrađene skupine u periodu od 10 do 14 dana pokazuju porast tjelesne mase s time da je porast tjelesne mase najmanji u skupini obrađenoj nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg.



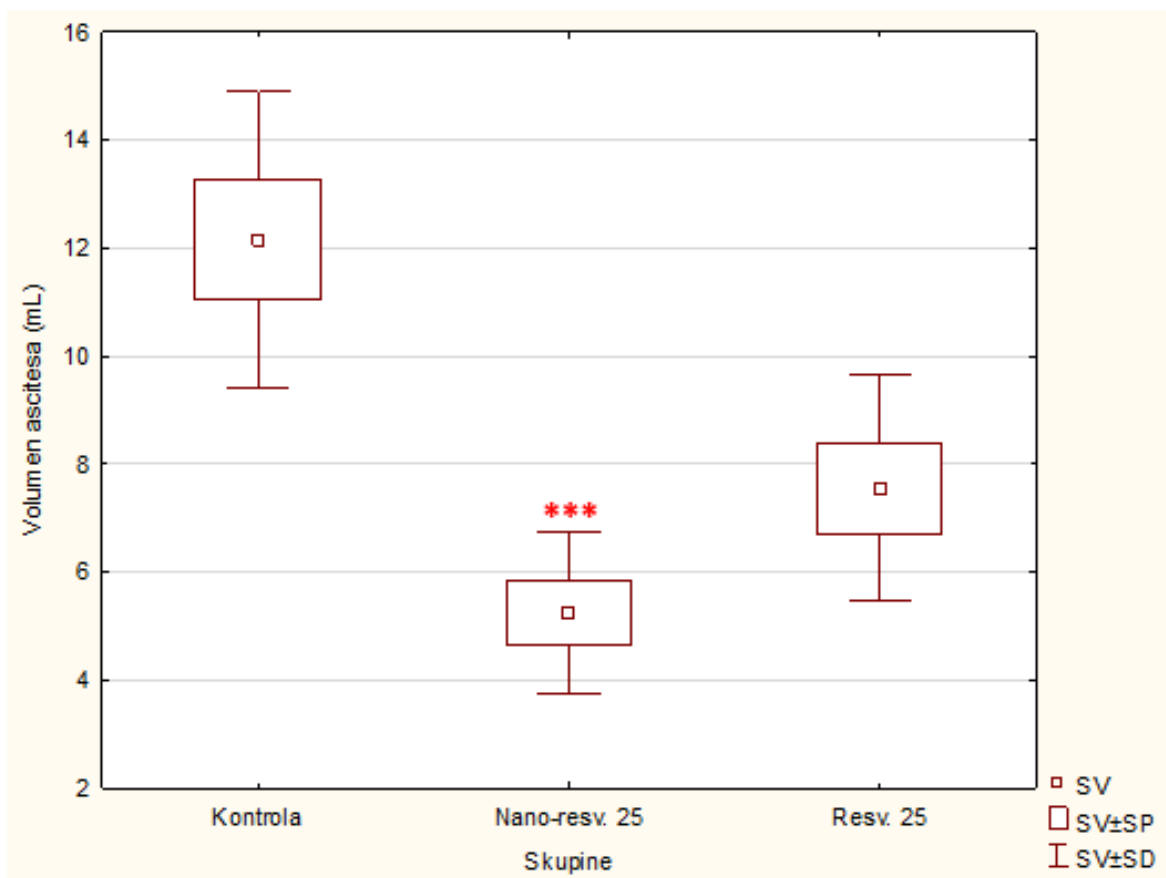
Slika 6.: Promjene mase tumora u miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Rast mase tumora izražen je kao % u odnosu na početnu masu miševa unutar skupine prema formuli: % promjene u masi tumora = $(\text{Konačna težina životinja} - \text{Početna težina životinja}) \times 100 / \text{Konačna težina životinja}$.

Kratice: Nano-resv. 25 – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg.

4.2 UKUPNI VOLUMEN PERITONEALNE TEKUĆINE

Prilikom analize volumena ascitesa vidljivo je da je došlo do njegovog smanjenja u peritonealnoj šupljini kod svih obrađenih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu koje su obrađene tijekom 14 dana (Slika 7.). Najveća statistički značajna redukcija peritonealne tekućine utvrđena je kod skupine obrađene s nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ($P \leq 0,001$).



Slika 7.: Ukupni volumen ascitesa u peritonealnoj šupljini miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

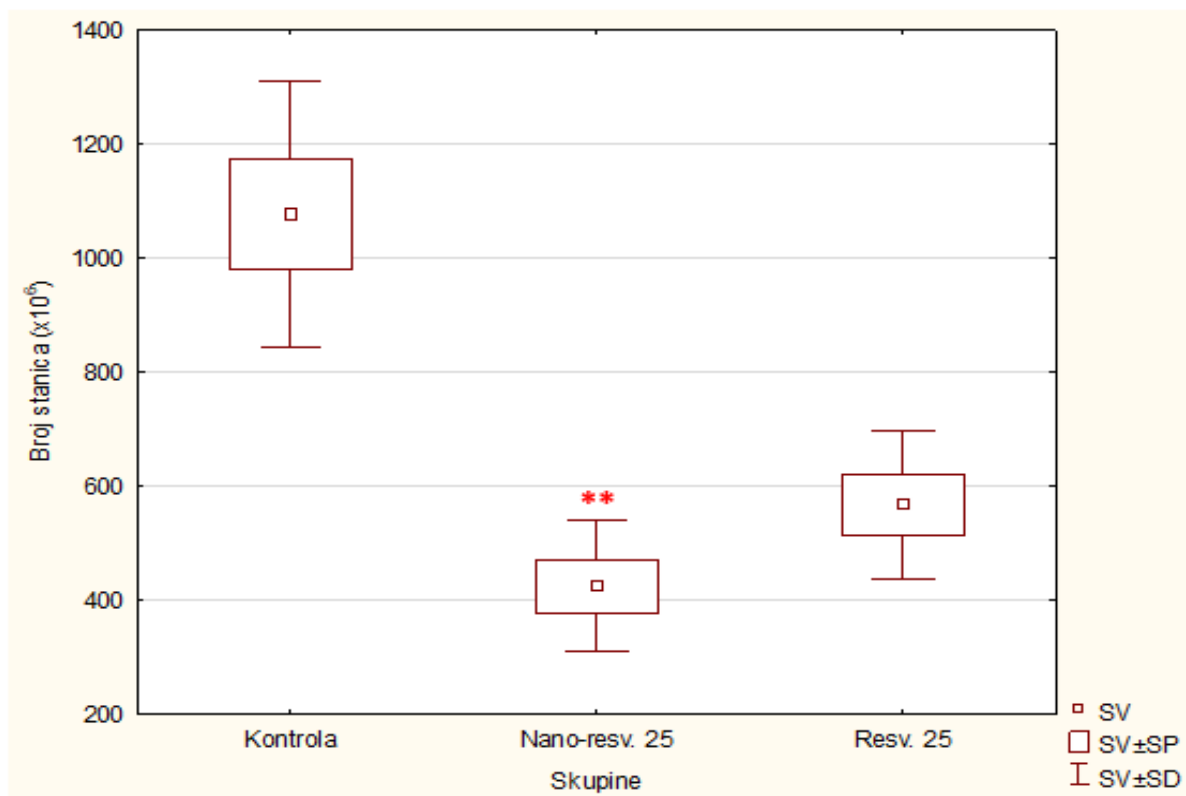
Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Statistički značajno različito: Nano-resv. 25 vs Kontrola ($*** P \leq 0,001$)

Kratice: **Nano-resv. 25** – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.3 UKUPNI BROJ STANICA U PERITONEALNOJ TEKUĆINI

Analiza određivanja ukupnog broja stanica u peritonealnoj tekućini ukazuje da je srednja vrijednost broja stanica statistički značajno smanjena kod skupine koja je obrađena s nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ($P \leq 0,01$) (Slika 8.). Smanjenje broja stanica u peritonealnoj šupljini kod obrađenih skupina podudara se sa smanjenjem volumena peritonealne tekućine.



Slika 8.: Ukupni broj stanica u peritonealnoj tekućini miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

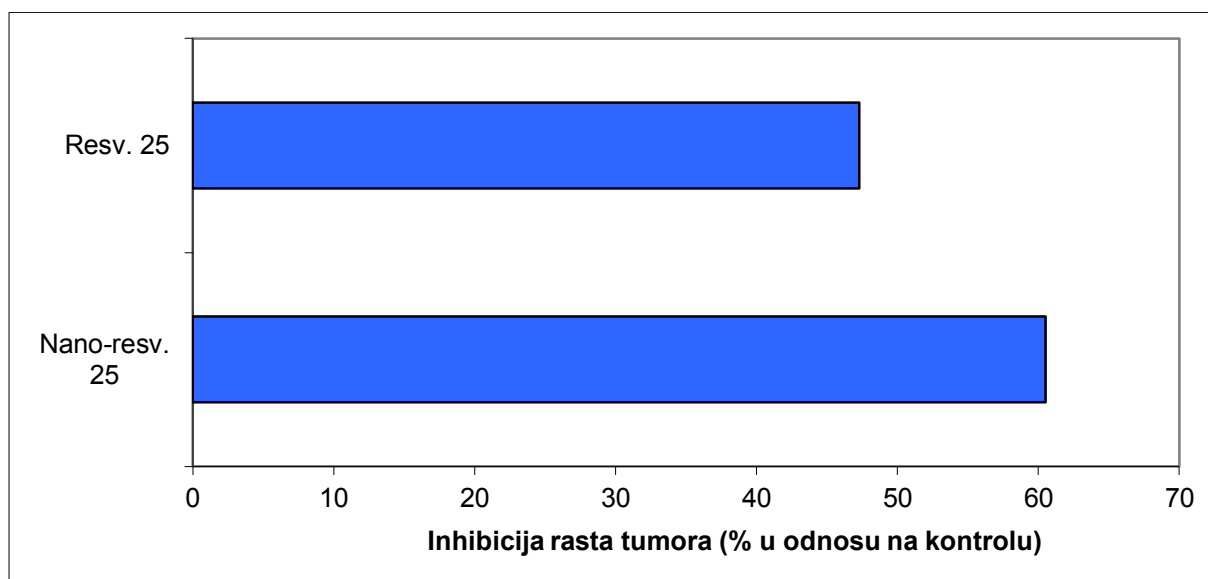
Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Statistički značajno različito: Nano-resv. 25 vs Kontrola (** $P \leq 0,01$)

Kratice: **Nano-resv. 25** – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.4 INHIBICIJA RASTA TUMORA

Rezultati mjerenja inhibicije rasta tumora (Slika 9.) ukazuju na visoki postotak inhibicije kod obje obrađene skupine; 47% kod skupine obrađene s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolu i 60% kod skupine obrađene s nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolu.



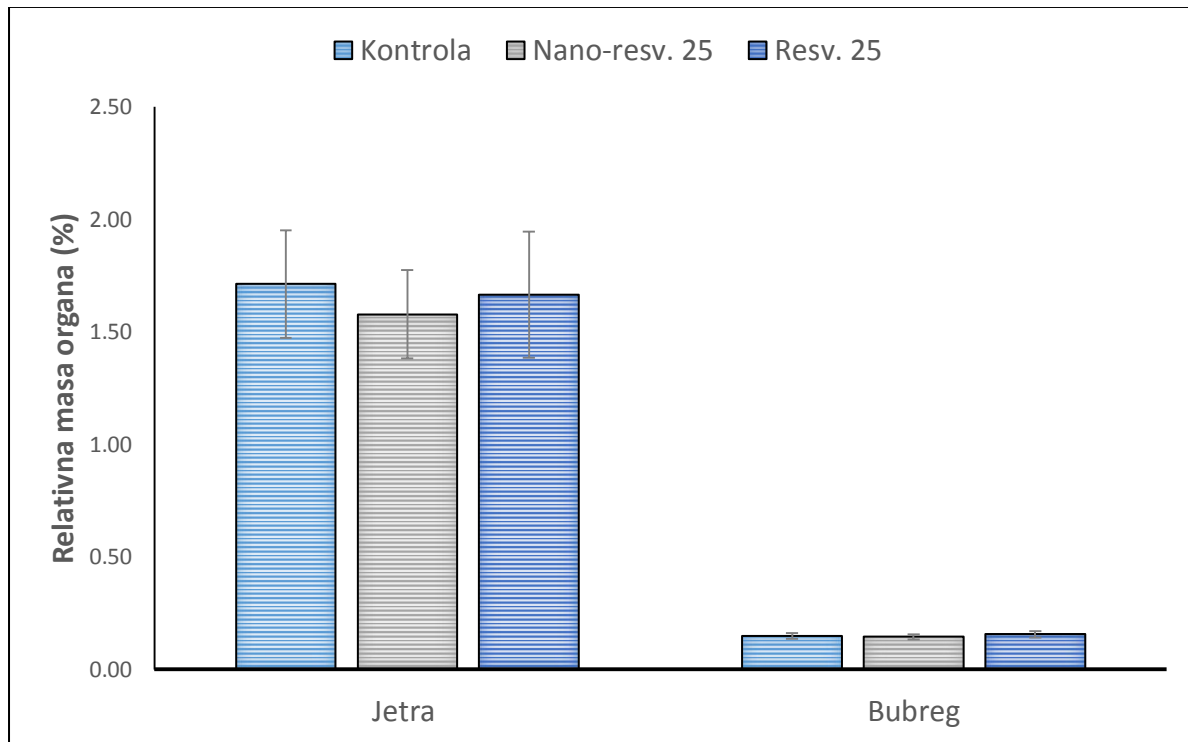
Slika 9. Postotak inhibicije rasta tumora u miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolu

Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Inhibicija rasta tumora izražena je kao % u odnosu na kontrolnu skupinu prema formuli: % inhibicije rasta tumora = $(\text{Srednja vrijednost broja tumorskih stanica u kontrolnoj grupi} - \text{Srednja vrijednost broja tumorskih stanica u pokusnoj grupi}) \times 100 / \text{Srednja vrijednost tumorskih stanica u kontrolnoj grupi}$.

Kratice: Nano-resv. 25 – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; Resv. 25 – resveratrol u dozi od 25 mg/kg.

4.5 PROMJENA MASE UNUTARNJIH ORGANA

Praćenjem promjene mase organa, odnosno jetre i bubrega, kod obrađenih skupina tijekom 14 dana nije uočena statistički značajna razlika između obrađenih skupina (Slika 10.).



Slika 10.: Promjena mase organa (jetra i bubreg) u miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

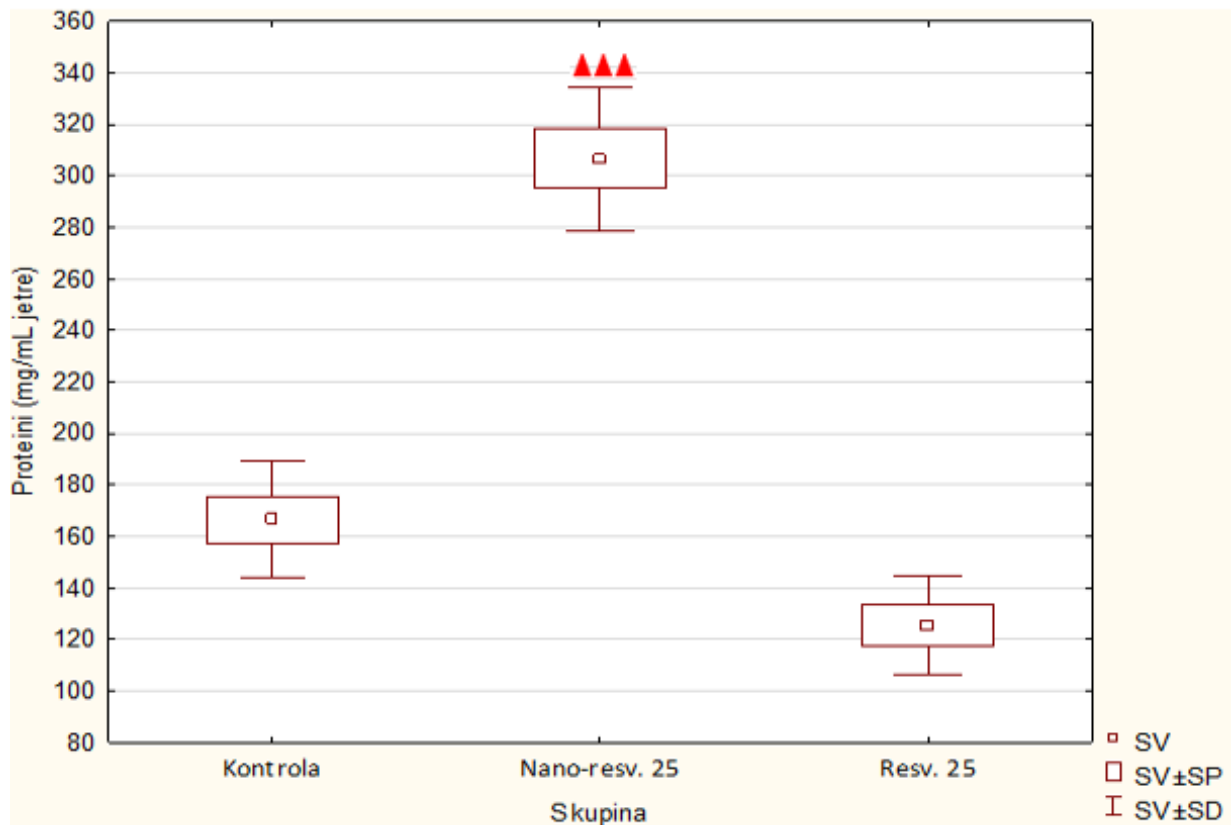
Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana.

Kratice: **Nano-resv. 25** – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg.

4.6 REZULTATI PARAMETARA OKSIDACIJSKOG STRESA

4.6.1 UKUPNI PROTEINI U UZORCIMA TKIVA JETRE MIŠEVA

Rezultati mjerenja ukupnih proteina u uzorcima tkiva jetre (Slika 11.) ukazuju na statistički značajno višu koncentraciju ukupnih proteina u skupini obrađenoj s nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg u odnosu na skupinu obrađenu s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg ($P \leq 0,001$).



Slika 11.: Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima tkiva jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

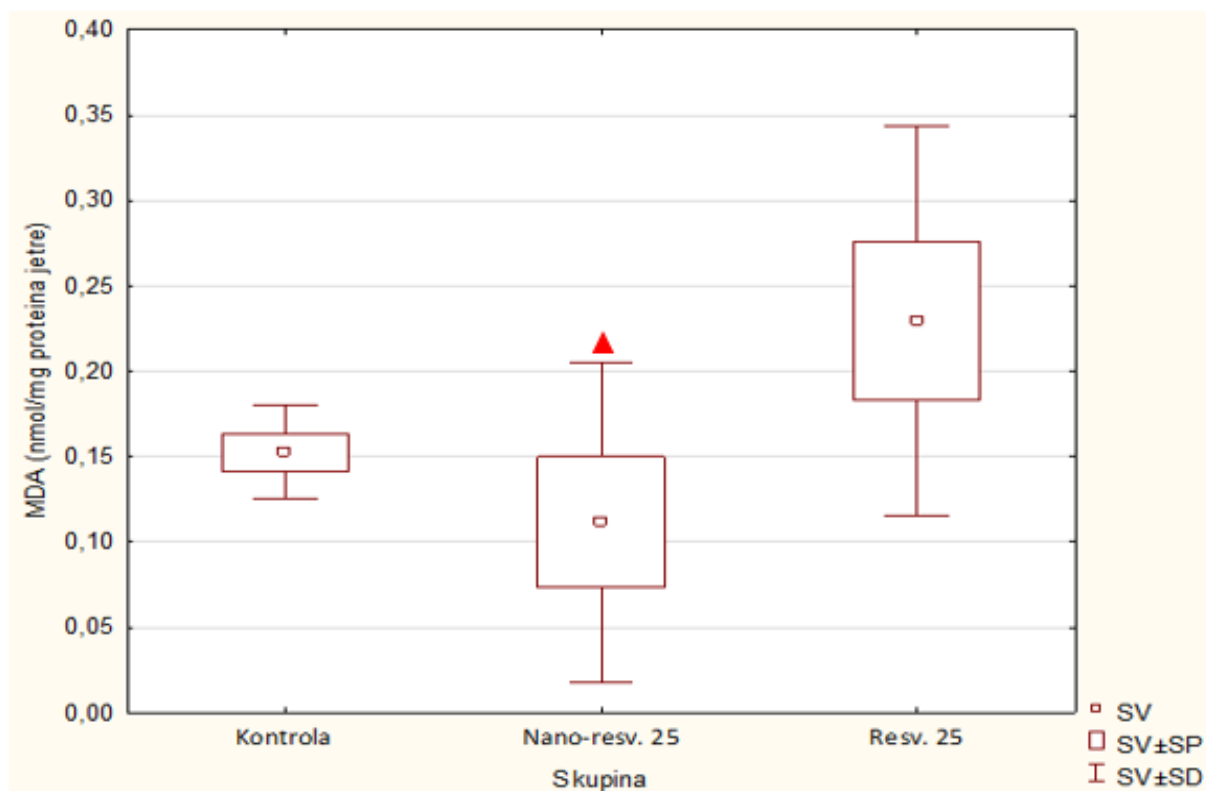
Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Statistički značajno različito: Nano-resv. 25 vs Resv. 25 ($\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P \leq 0,001$)

Kratice: **Nano-resv. 25** – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.6.2 MJERENJE RAZINE LIPIDNE PEROKSIDACIJE (MDA) U UZORCIMA TKIVA JETRE MIŠEVA

Rezultati mjerenja koncentracije MDA u uzorcima tkiva jetre (Slika 12.) pokazuju na statistički značajno nižu vrijednost MDA u skupini obrađenoj s nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg u odnosu na skupinu obrađenu s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg ($P \leq 0,05$).



Slika 12.: Koncentracija MDA u uzorcima tkiva jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

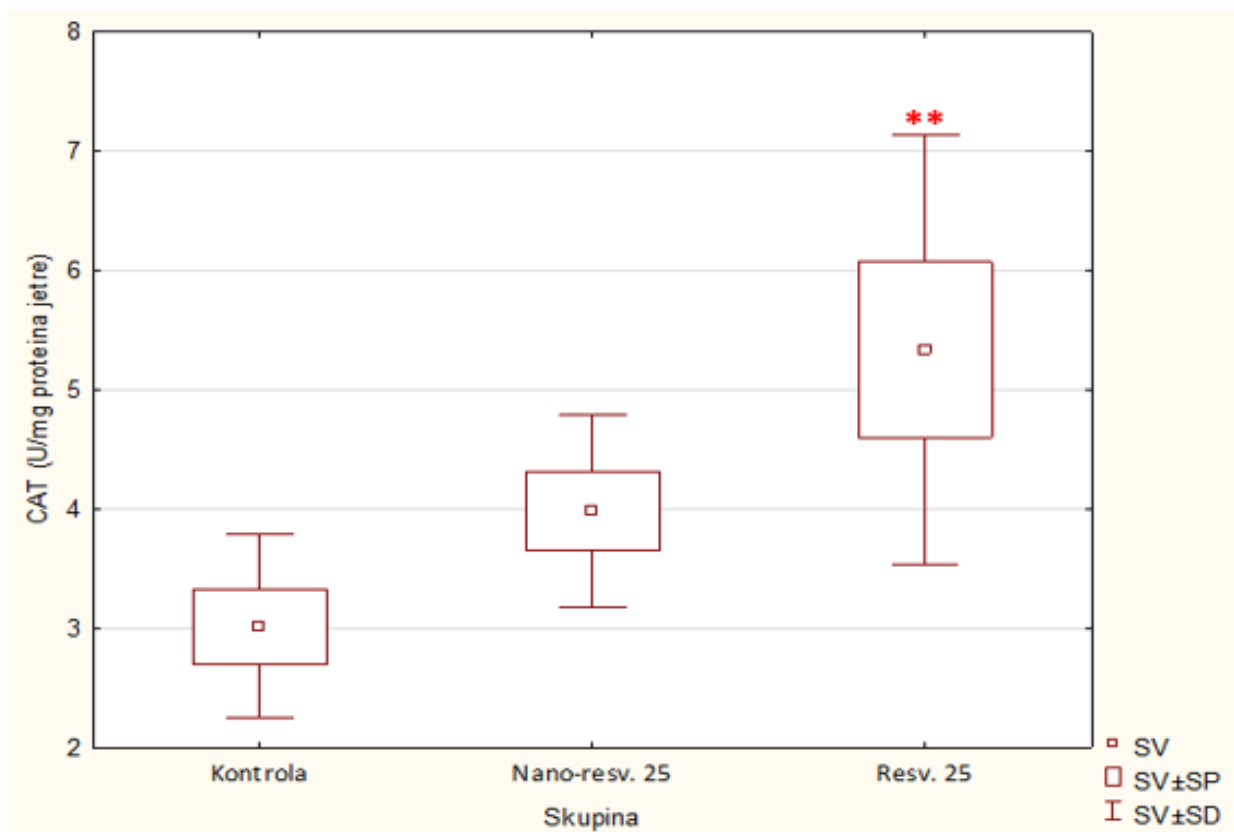
Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Statistički značajno različito: Nano.-resv. 25 vs Resv. 25 ($\blacktriangle P \leq 0,05$)

Kratice: **Nano-resv. 25** – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.6.3 MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI KATALAZE (CAT) U UZORCIMA TKIVA JETRE MIŠEVA

Rezultati određivanja aktivnosti katalaze u uzorcima tkiva jetre (Slika 13.) ukazuju na statistički značajno veću aktivnost katalaze kod skupine obrađene s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ($P \leq 0,01$).



Slika 13.: Koncentracija CAT u uzorcima tkiva jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

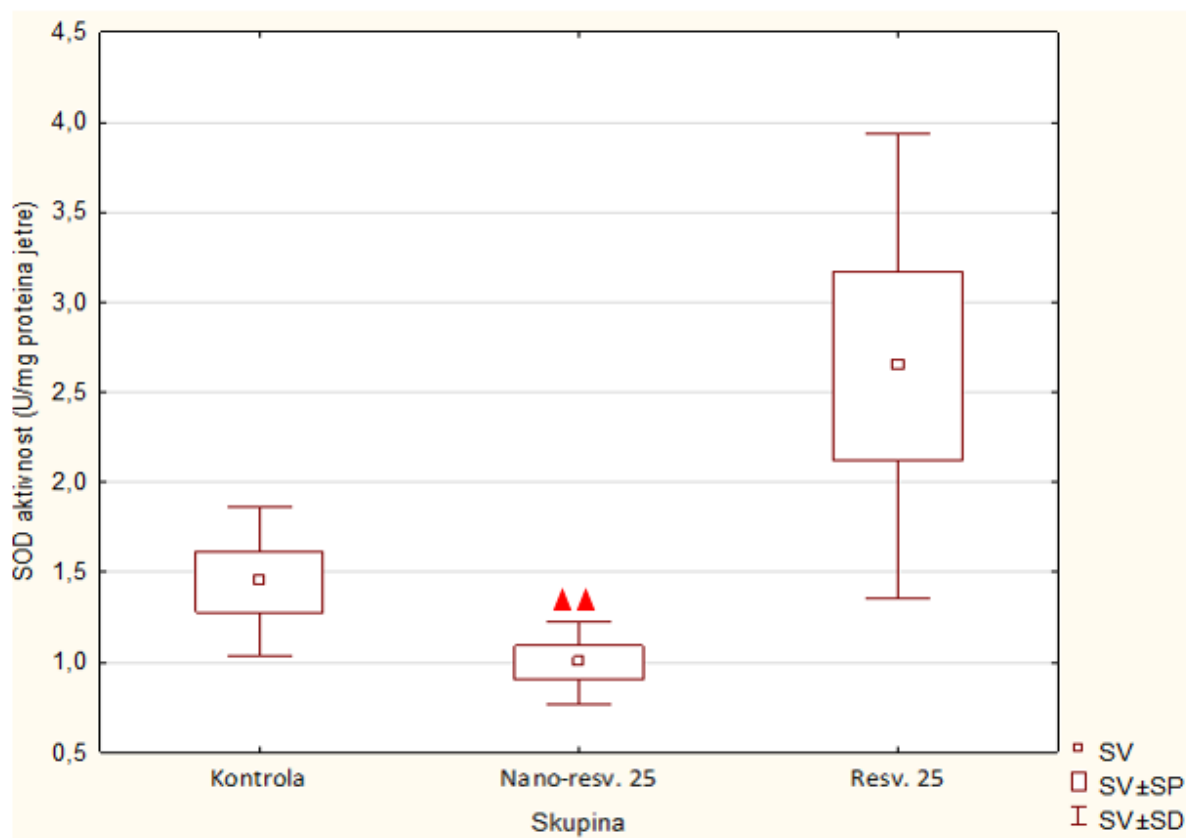
Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Statistički značajno različito: Resv. 25 vs Kontrola (** $P \leq 0,01$)

Kratice: **Nano-resv. 25** – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.6.4 MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DISMUTAZE (SOD) U UZORCIMA TKIVA JETRE MIŠEVA

Rezultati mjerenja aktivnosti SOD u uzorcima tkiva jetre (Slika 14.) ukazuju na statistički značajno nižu aktivnost SOD kod skupine obrađene s nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg u odnosu na skupinu obrađenu s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg ($P \leq 0,01$).



Slika 14.: Aktivnost SOD u uzorcima tkiva jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

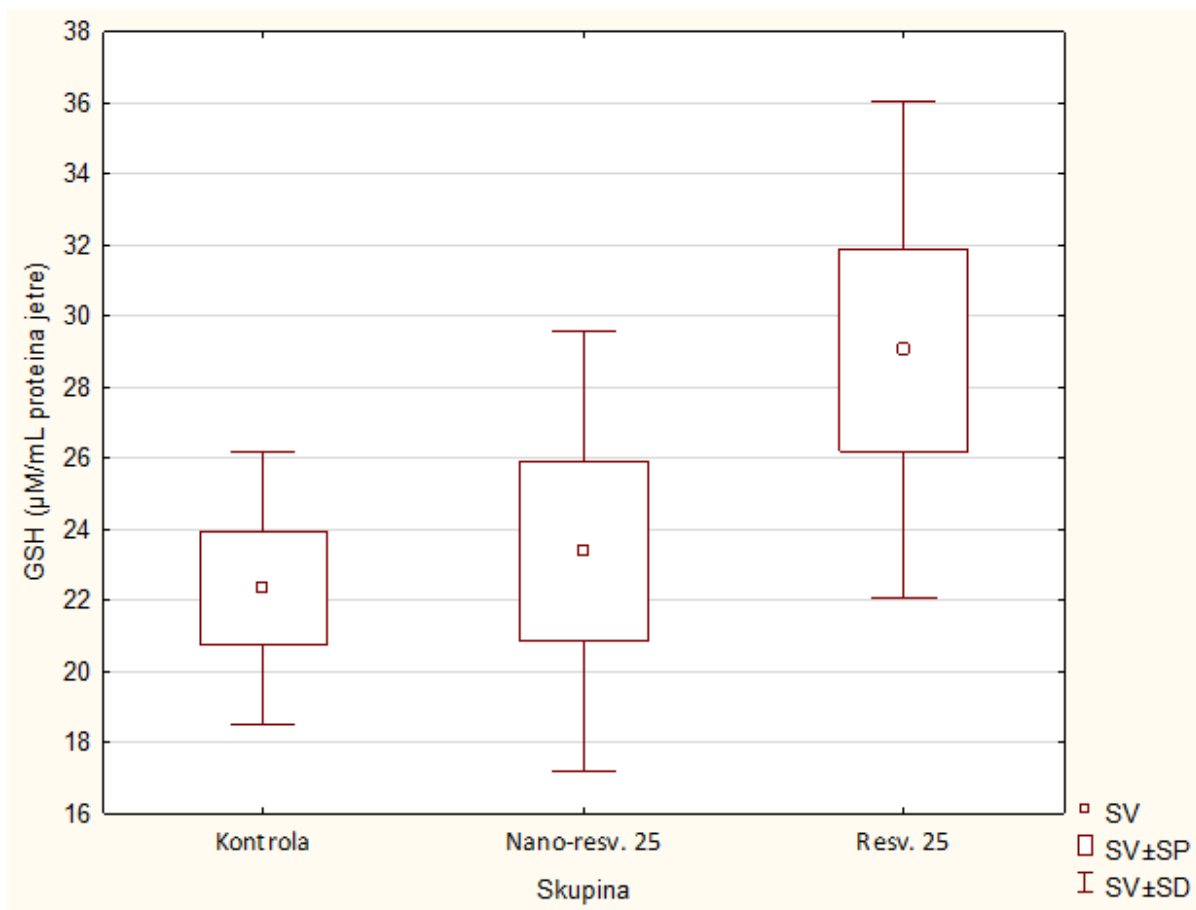
Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Statistički značajno različito: Nano-resv. 25 vs Resv. 25 ($\blacktriangle\blacktriangle P \leq 0,01$)

Kratice: **Nano-resv. 25** – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.6.5 MJERENJE RAZINE UKUPNOG GLUTATIONA (GSH) U UZORCIMA TKIVA JETRE MIŠEVA

Rezultati određivanja koncentracije ukupnoga glutationa ne pokazuju statistički značajnu razliku u koncentraciji ukupnog glutationa između ispitivanih skupina (Slika 15.).



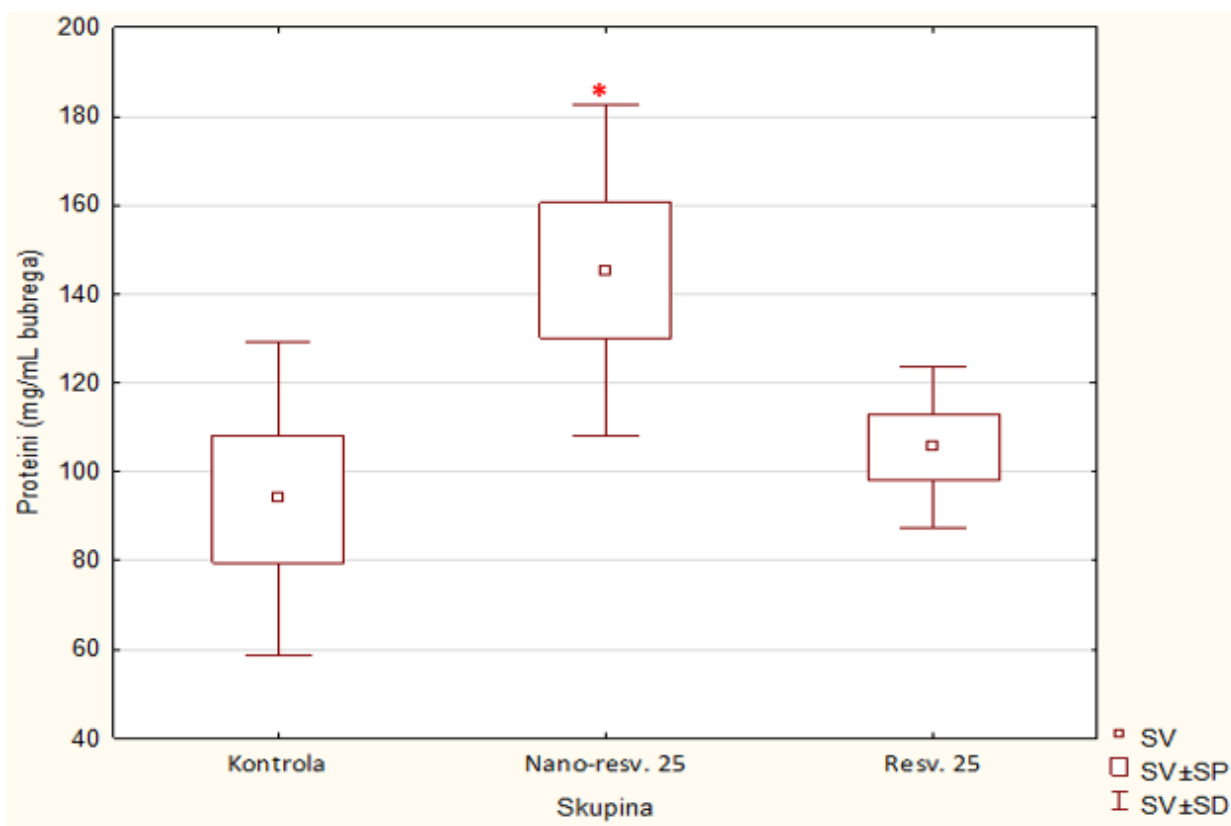
Slika 15.: Koncentracija GSH u uzorcima tkiva jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Kratice: **Nano-resv. 25** – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.6.6 UKUPNI PROTEINI U UZORCIMA TKIVA BUBREGA MIŠEVA

Rezultati mjerenja ukupnih proteina u uzorcima tkiva bubrega prikazani su na Slici 16. Iz rezultata je vidljiva viša koncentracija ukupnih proteina u skupini obrađenoj s nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ($P \leq 0,05$).



Slika 16.: Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima tkiva bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

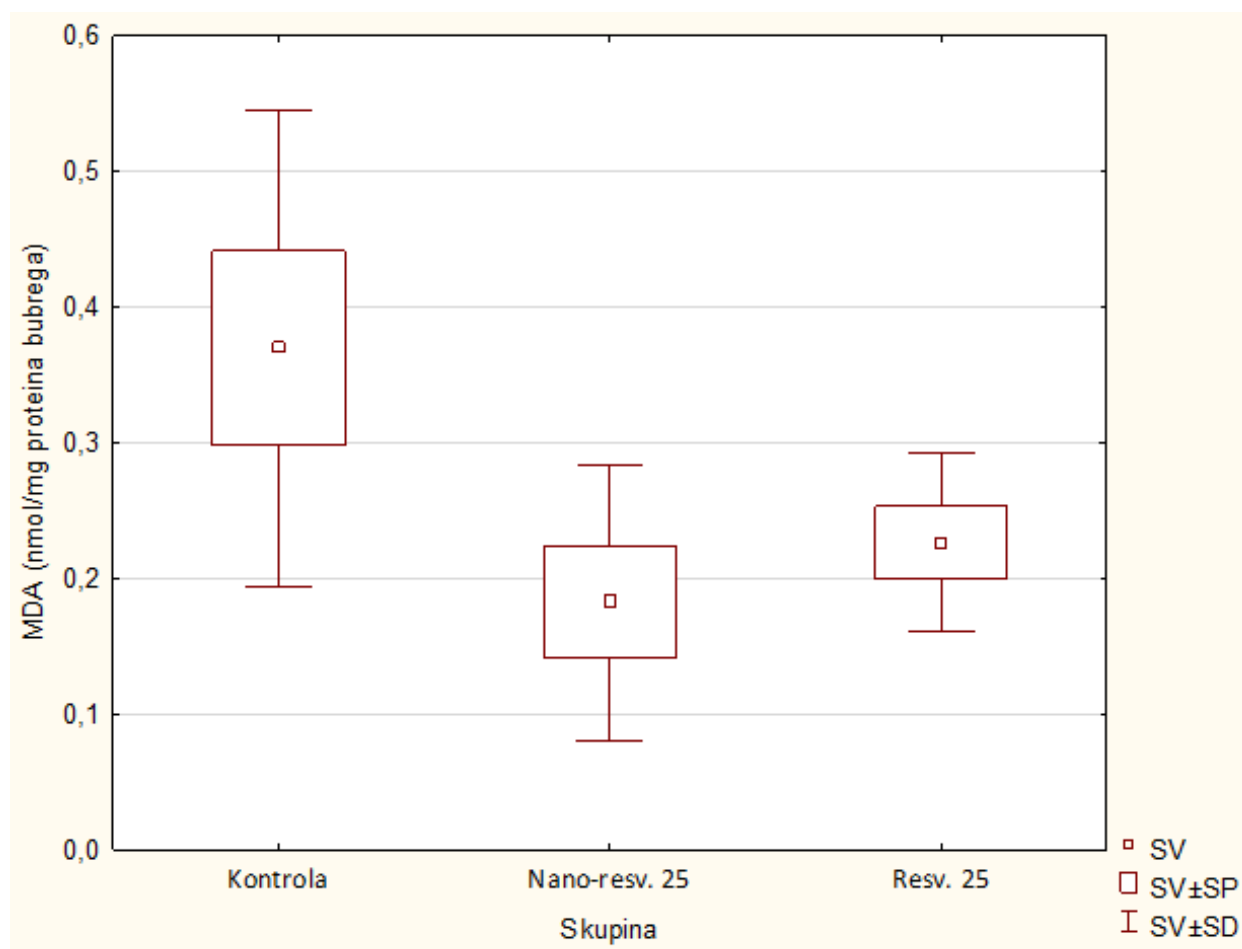
Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Statistički značajno različito: Nano-resv. 25 vs Kontrola (* $P \leq 0,05$)

Kratice: Nano-resv. 25 – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; Resv. 25 – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD – standardna devijacija.

4.6.7 MJERENJE RAZINE LIPIDNE PEROKSIDACIJE (MDA) U UZORCIMA TKIVA BUBREGA MIŠEVA

Rezultati mjerenja MDA ne pokazuju statistički značajnu razliku između ispitivanih skupina (Slika 17.).



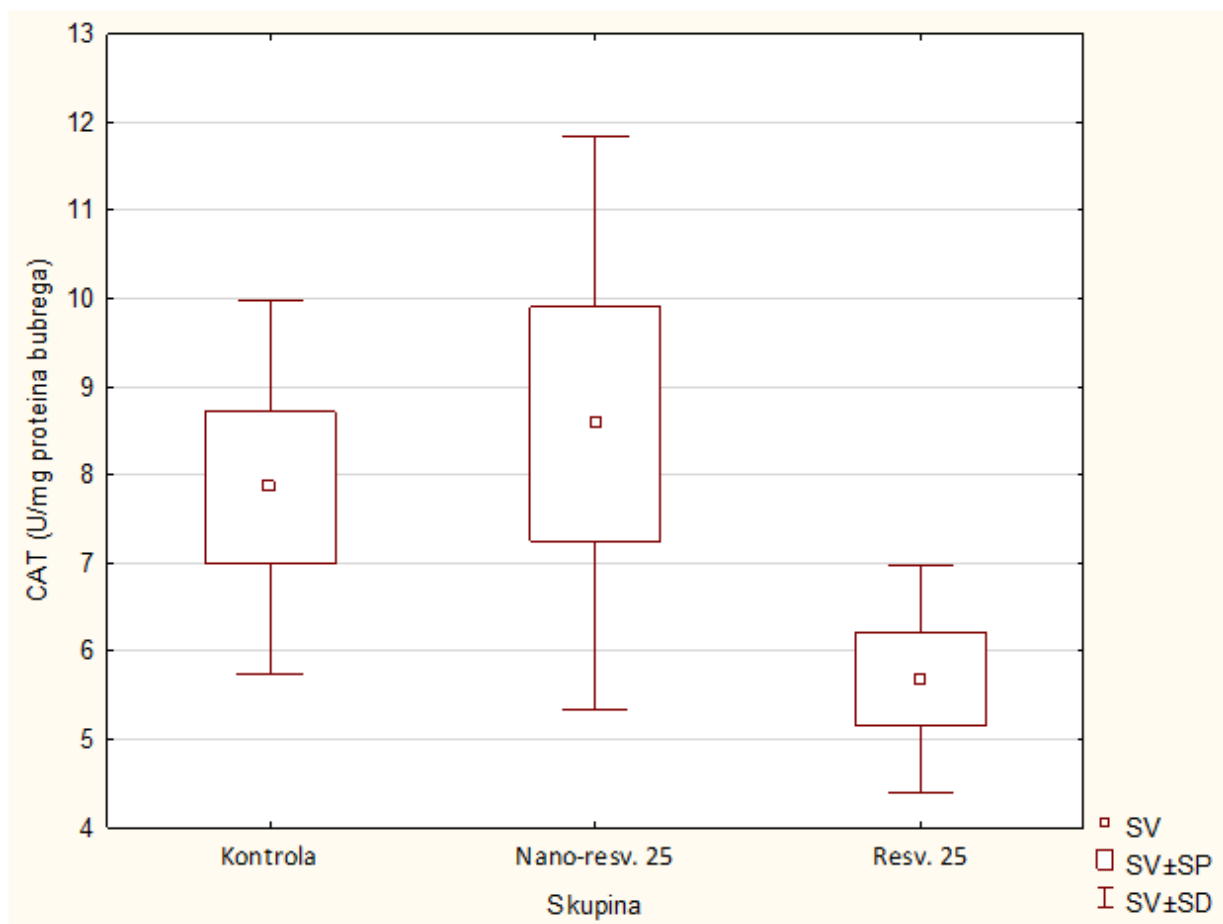
Slika 17.: Koncentracija MDA u uzorcima tkiva bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Kratice: **Nano-resv. 25** – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.6.8 MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI KATALAZE (CAT) U UZORCIMA TKIVA BUBREGA MIŠEVA

Rezultati određivanja aktivnosti katalaze u uzorcima tkiva bubrega ne pokazuju statistički značajnu razliku između ispitivanih skupina (Slika 18.).



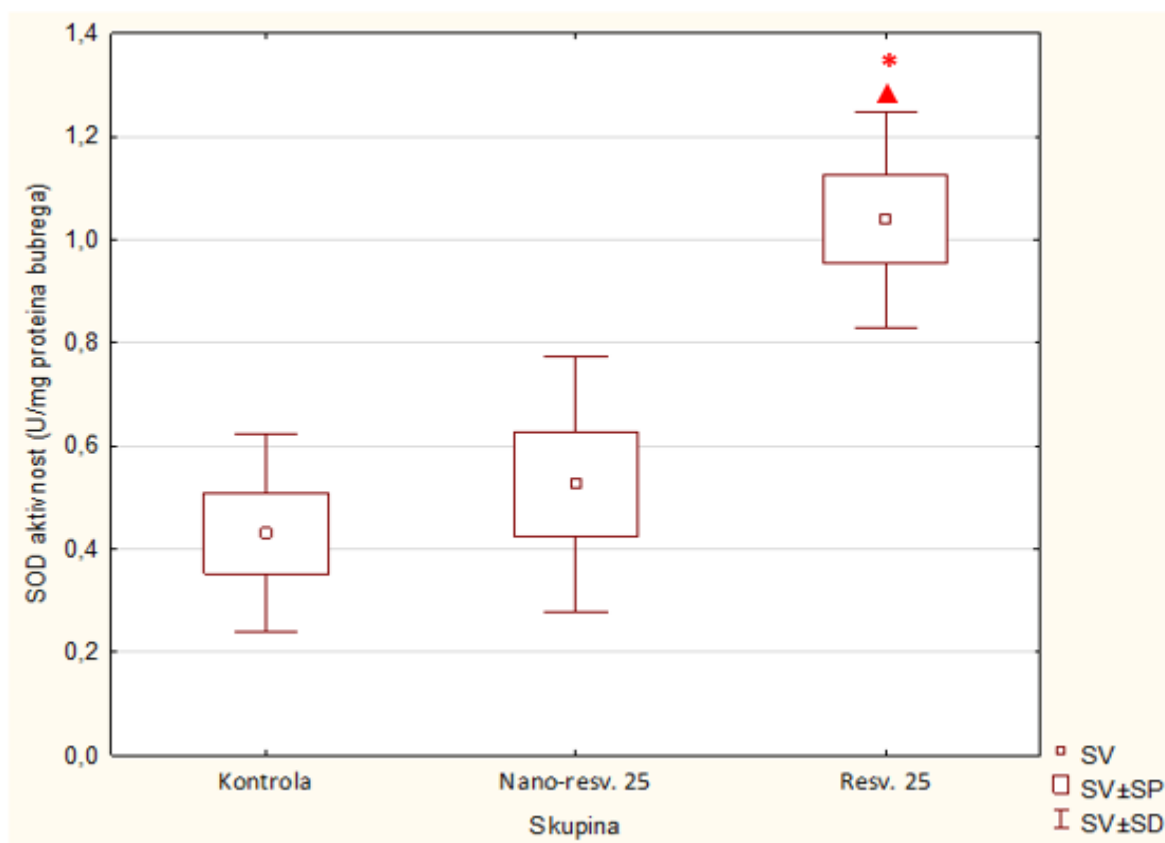
Slika 18.: Koncentracija CAT u uzorcima tkiva bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Kratice: **Nano-resv. 25** – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.6.9 MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DISMUTAZE (SOD) U UZORCIMA TKIVA BUBREGA MIŠEVA

Rezultati mjerenja aktivnosti SOD prikazani su na Slici 19. Najveća aktivnost SOD bila je u skupini obrađenoj sa resveratrolom u dozi od 25 mg/kg. Statistička značajna razlika postoji između kontrolne skupine i skupine obrađene s resveratrolom ($P \leq 0,05$) te skupine obrađene s nanokristalima resveratrola u odnosu na skupinu obrađenu resveratrolom ($P \leq 0,05$).



Slika 19.: Aktivnost SOD u uzorcima tkiva bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

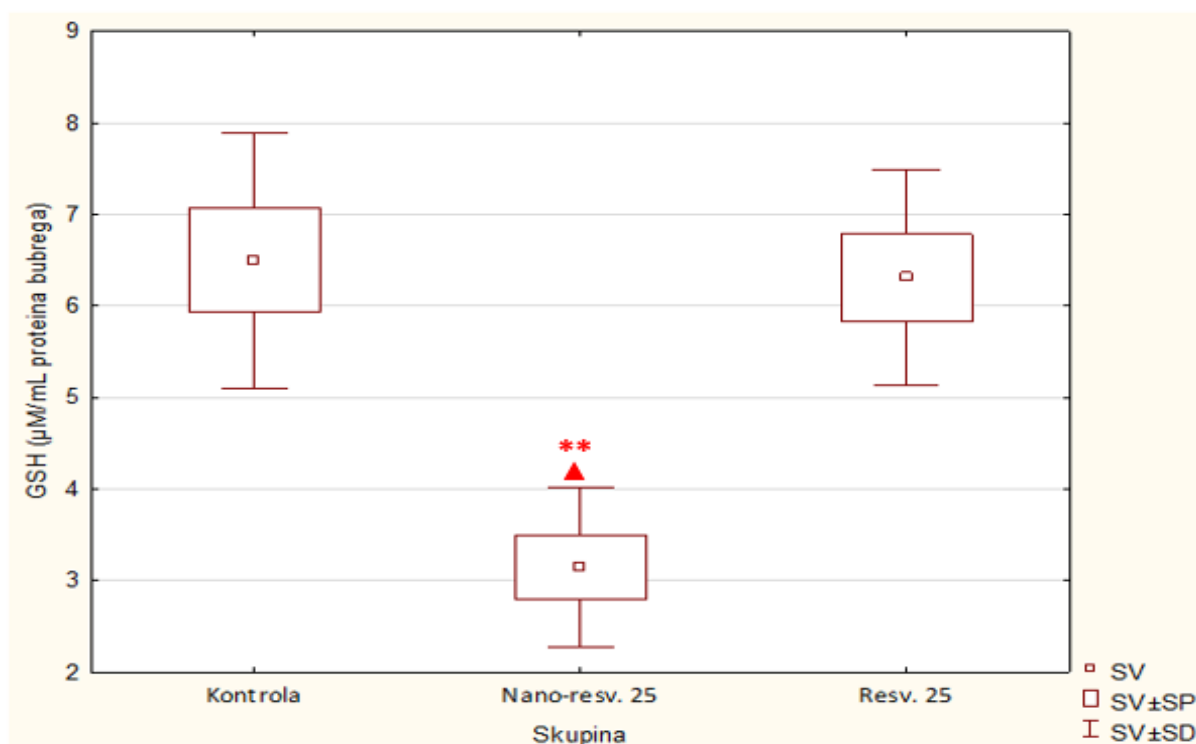
Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Statistički značajno različito: Resv. 25 vs Kontrola (* $P \leq 0,05$); Nano-resv. 25 vs Resv. 25 (\blacktriangle $P \leq 0,05$).

Kratice: Nano-resv. 25 – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; Resv. 25 – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD – standardna devijacija.

4.6.10 MJERENJE RAZINE UKUPNOG GLUTATIONA (GSH) U UZORCIMA TKIVA BUBREGA MIŠEVA

Rezultati određivanja koncentracije ukupnog glutationa u uzorcima tkiva bubrega prikazani su na Slici 20. Najmanja koncentracija GSH prisutna je u skupini obrađenoj s nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg. Statistički značajna razlika u koncentraciji GSH postoji između kontrolne skupine i skupine obrađene s nanokristalima resveratrola ($P \leq 0,01$) i skupine obrađene s resveratrolom u odnosu na skupinu obrađenu s nanokristalima resveratrola ($P \leq 0,05$).



Slika 20.: Koncentracija GSH u uzorcima tkiva bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

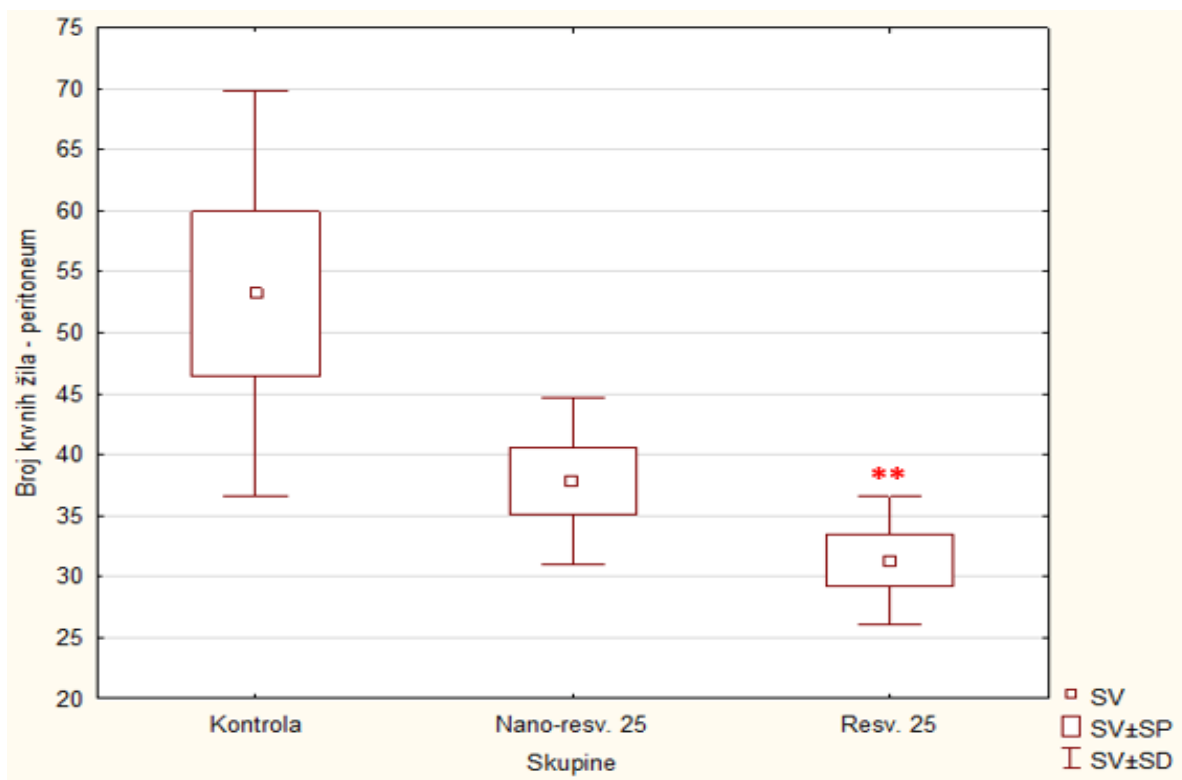
Statistički značajno različito: Nano-resv. 25 vs Kontrola (** $P \leq 0,01$); Nano-resv. 25 vs Resv. 25 (▲ $P \leq 0,05$).

Kratice: Nano-resv. 25 – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; Resv. 25 – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD – standardna devijacija.

4.7 UČINAK NANOKRISTALA RESVERATROLA I RESVERATROLA NA ANGIOGENEZU

4.7.1 KVANTITATIVNO MJERENJE PROŽILJENOSTI PERITONEALNE OVOJNICE

Mikroskopska analiza kvantitativnog mjerenja prožiljenosti peritonealne ovojnice koja je provedena određivanjem prosječne gustoće prožiljenosti peritonealne ovojnice u područjima najintenzivnije prokrvljenosti na ukupnom povećanju mikroskopa od 400x pokazala je statistički značajno smanjenje broja krvnih žila kod skupine obrađene s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ($P \leq 0,01$) (Slika 21.). Na Slici 22. prikazan je histološki preparat peritonealne ovojnice miša nositelja EAT-a nakon obrade resveratrolom u dozi od 25 mg/kg i nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg.

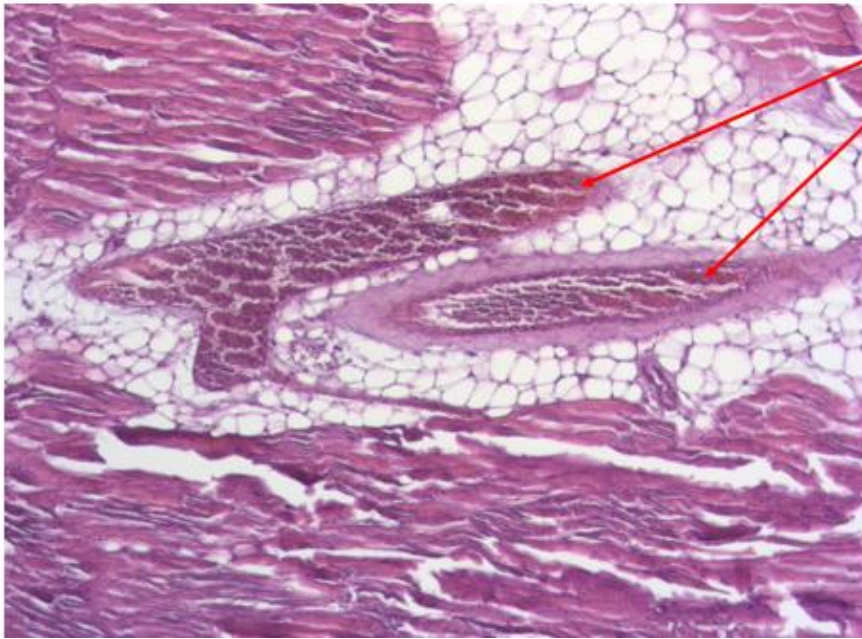


Slika 21.: Kvantitativno mjerenje prožiljenosti peritonealne ovojnice u miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Statistički značajno različito: Resv. 25 vs Kontrola (** $P \leq 0,01$)

Kratice: **Nano-resv. 25** – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

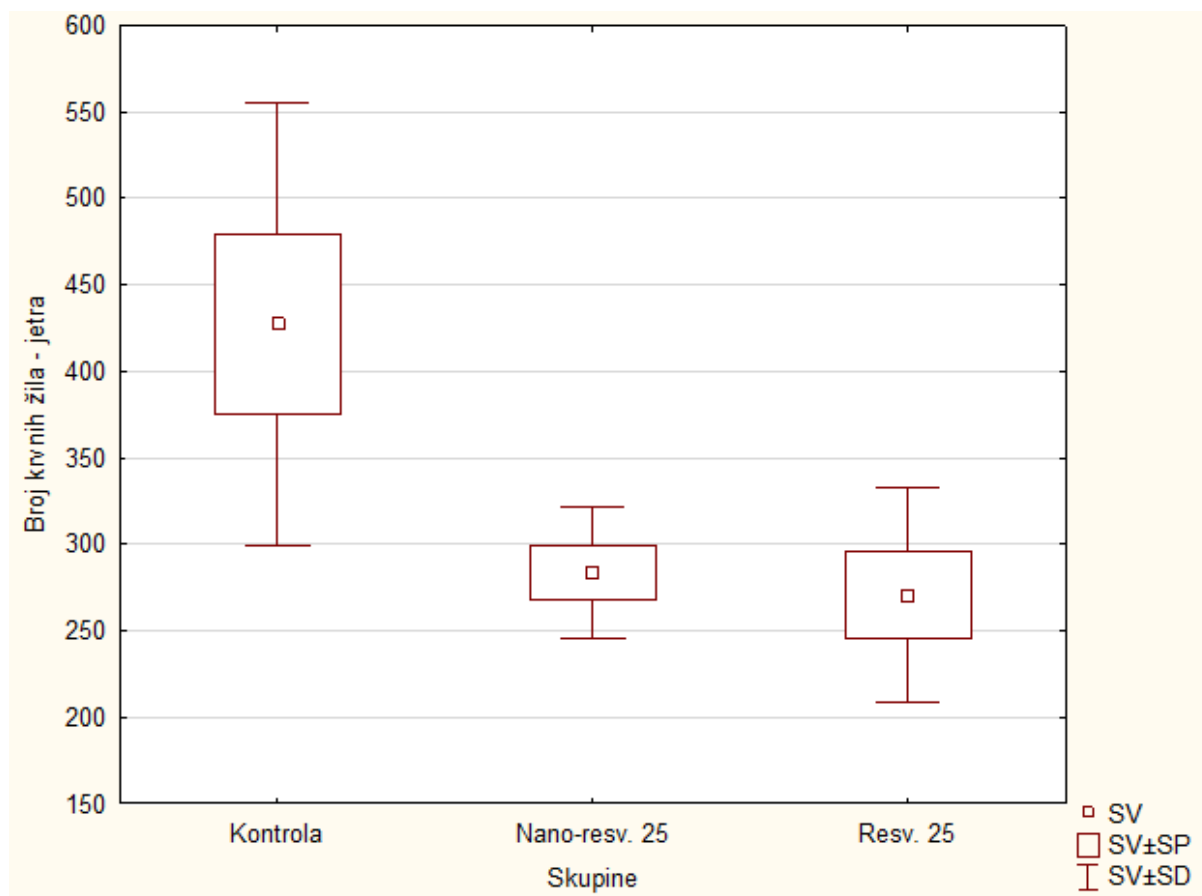


Krvne žile po
peritoneumu

Slika 22.: Histološki preparat peritonealne ovojnice miša nositelja EAT-a nakon obrade s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg i nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg.

4.7.2 KVANTITATIVNO MJERENJE PROŽILJENOSTI JETRE

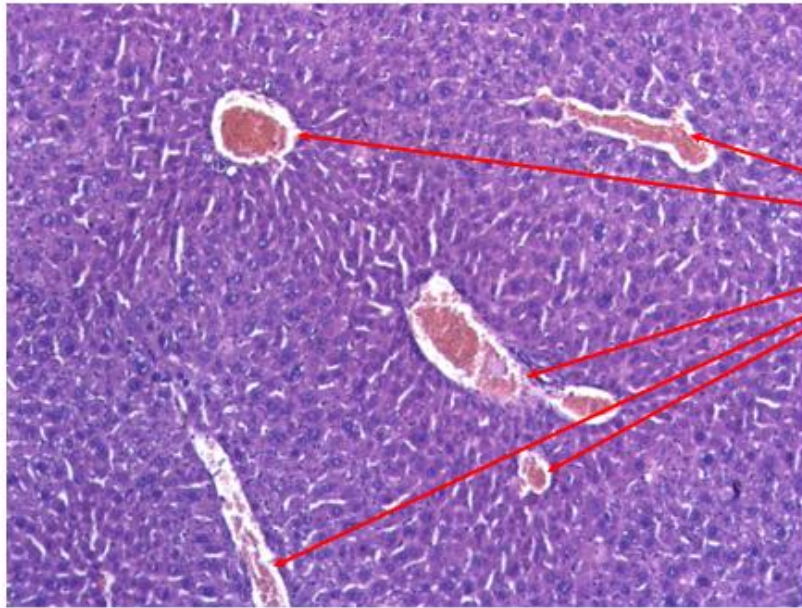
Mikroskopska analiza kvantitativnog mjerenja prožiljenosti jetre prikazana je na Slici 23. Iz dobivenih rezultata nije vidljiva statistička značajnost u broju krvnih žila između ispitivanih skupina. Na slici 24. prikazan je histološki preparat jetre miša nositelja EAT-a nakon obrade resveratrolom u dozi od 25 mg/kg i nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg.



Slika 23.: Kvantitativno mjerenje prožiljenosti jetre u miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Kratice: **Nano-resv. 25** – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

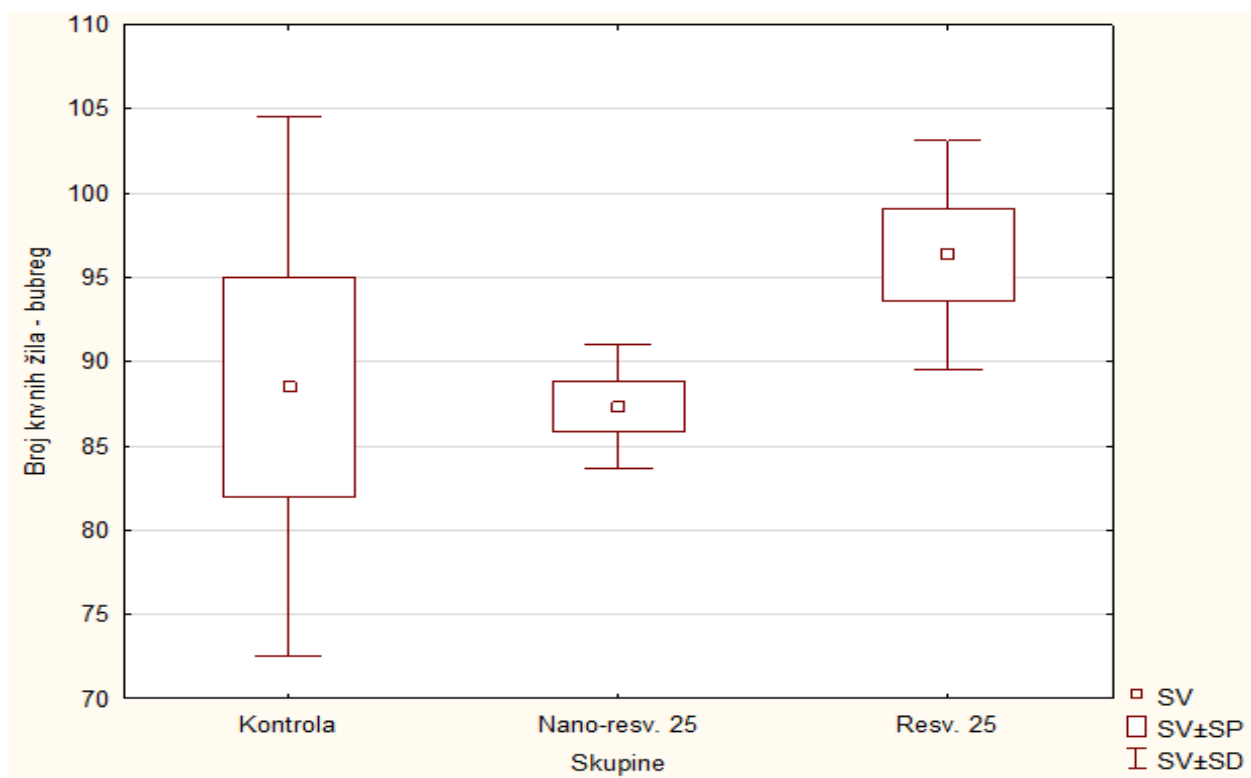


Krvne žile u jetri

Slika 24.: Histološki preparat jetre miša nositelja EAT-a nakon obrade s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg i nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg.

4.7.3 KVANTITATIVNO MJERENJE PROŽILJENOSTI BUBREGA

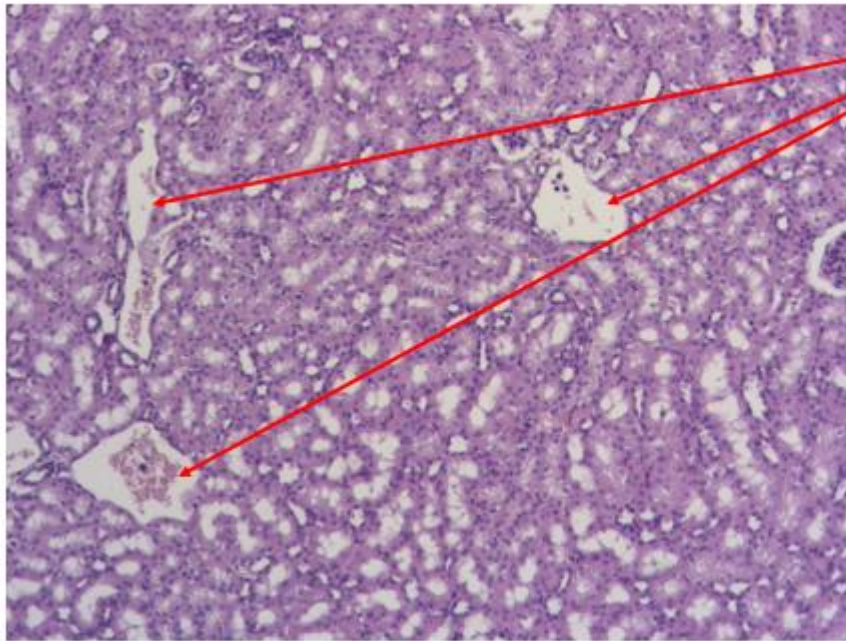
Mikroskopska analiza kvantitativnog mjerenja prožiljenosti bubrega prikazana je na Slici 25. Iz dobivenih rezultata nije vidljiva statistička značajnost u broju krvnih žila bubrega između ispitivanih skupina. Na slici 26. prikazan je histološki preparat bubrega miša nositelja EAT-a nakon obrade resveratrolom u dozi od 25 mg/kg i nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg.



Slika 25.: Kvantitativno mjerenje prožiljenosti bubrega u miševa nositelja EAT-a obradenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Kratice: **Nano-resv. 25** – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



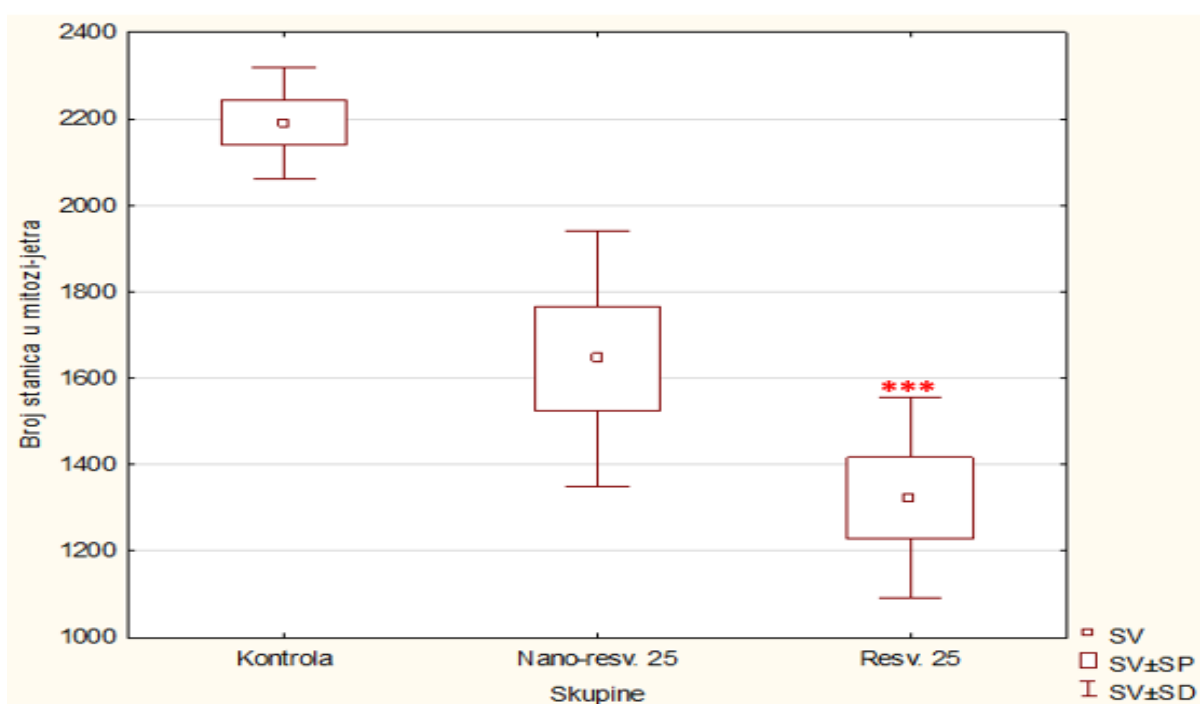
Krvne žile u
bubregu

Slika 26.: Histološki preparat bubrega miša nositelja EAT-a nakon obrade s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg i nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg.

4.8 UČINAK NANOKRISTALA RESVERATROLA I RESVERATROLA NA MITOZU I NEKROZU

4.8.1 KVANTITATIVNO MJERENJE STANICA U MITOZI U UZORCIMA JETRE

Mikroskopska analiza kvantitativnog mjerenja stanica u mitozu u jetri pokazala je statistički značajno smanjenje broja stanica u mitozu kod skupine obrađene s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ($P \leq 0,001$) (Slika 27.).



Slika 27.: Kvantitativno mjerenje stanica u mitozu u jetri miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

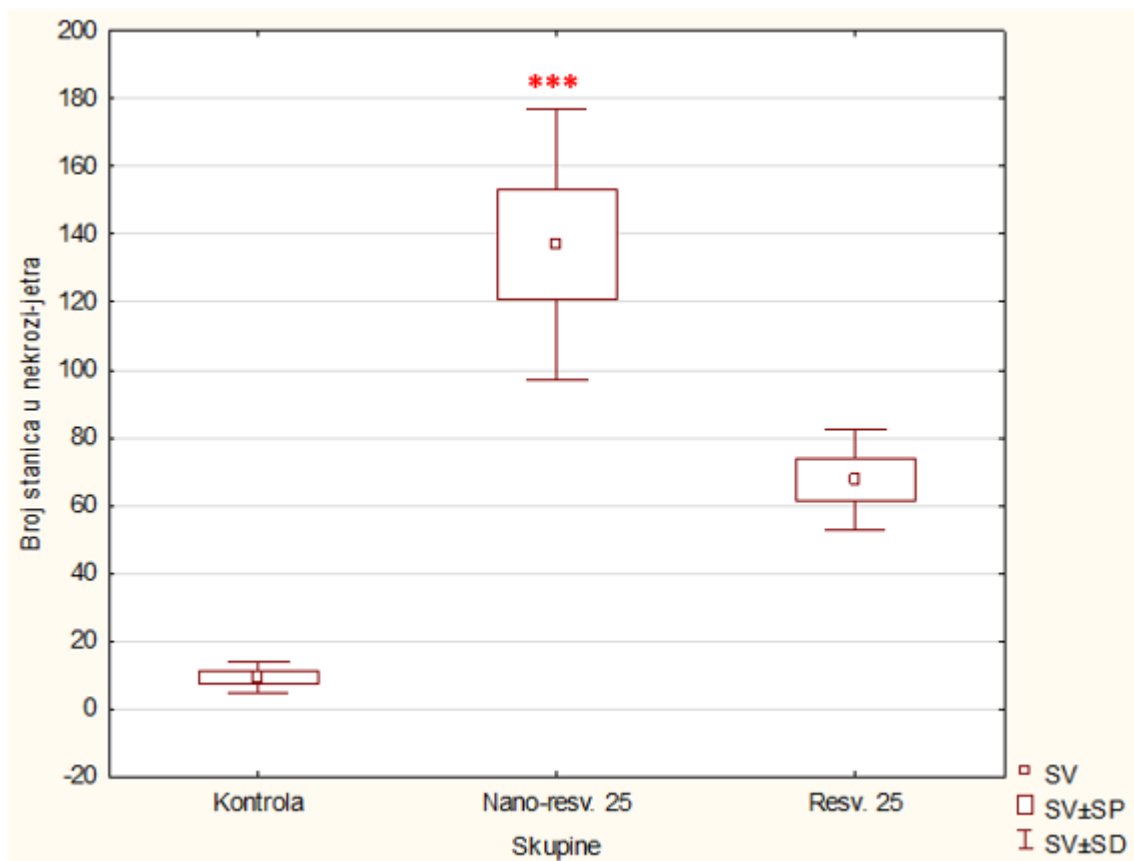
Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Statistički značajno različito: Resv. 25 vs Kontrola (***) $P \leq 0,001$).

Kratice: Nano-resv. 25 – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; Resv. 25 – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD – standardna devijacija.

4.8.2 KVANTITATIVNO MJERENJE STANICA U NEKROZI U UZORCIMA JETRE

Mikroskopska analiza kvantitativnog mjerenja stanica u nekrozi u jetri pokazala je statistički značajno povećanje broja stanica u nekrozi kod skupine obrađene s nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ($P \leq 0,001$) (Slika 28.).



Slika 28.: Kvantitativno mjerenje stanica u nekrozi u jetri miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

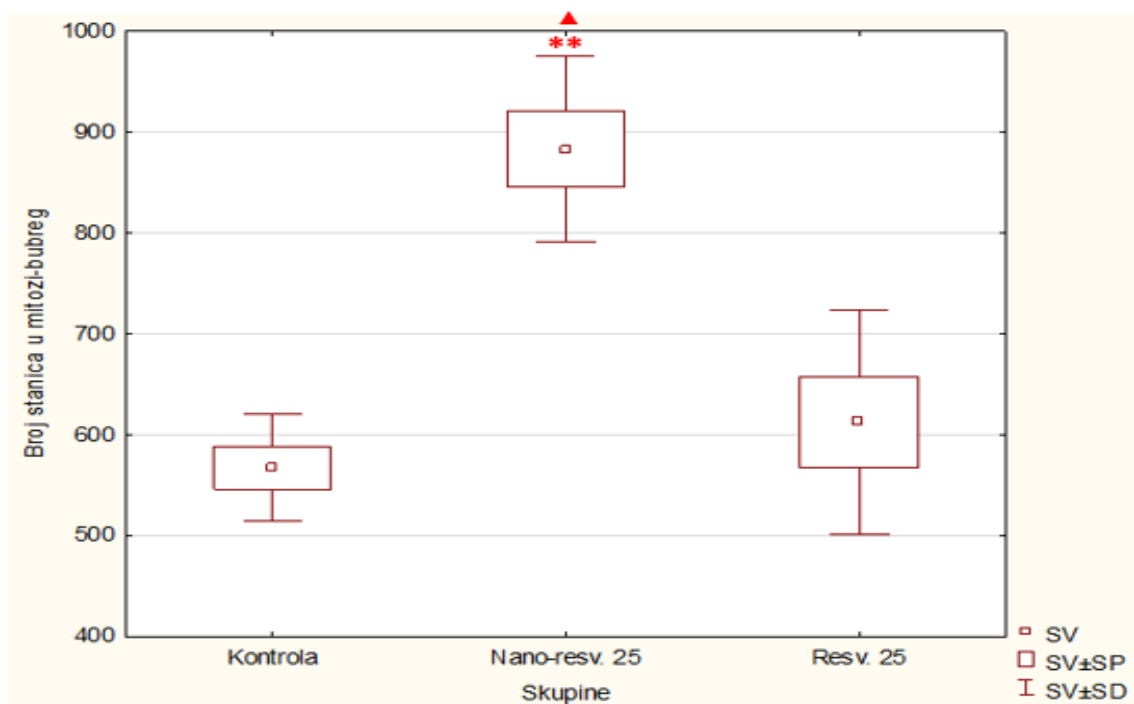
Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Statistički značajno različito: Nano-resv. 25 vs Kontrola (** $P \leq 0,001$).

Kratice: **Nano-resv. 25** – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.8.3 KVANTITATIVNO MJERENJE STANICA U MITOZI U UZORCIMA BUBREGA

Mikroskopska analiza kvantitativnog mjerenja stanica u mitozu u bubregu pokazala je statistički značajno povećanje broja stanica u mitozu kod skupine obrađene s nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ($P \leq 0,01$) i u odnosu na skupinu obrađenu s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg ($P \leq 0,05$) (Slika 28.).



Slika 29.: Kvantitativno mjerenje stanica u mitozu u bubregu miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

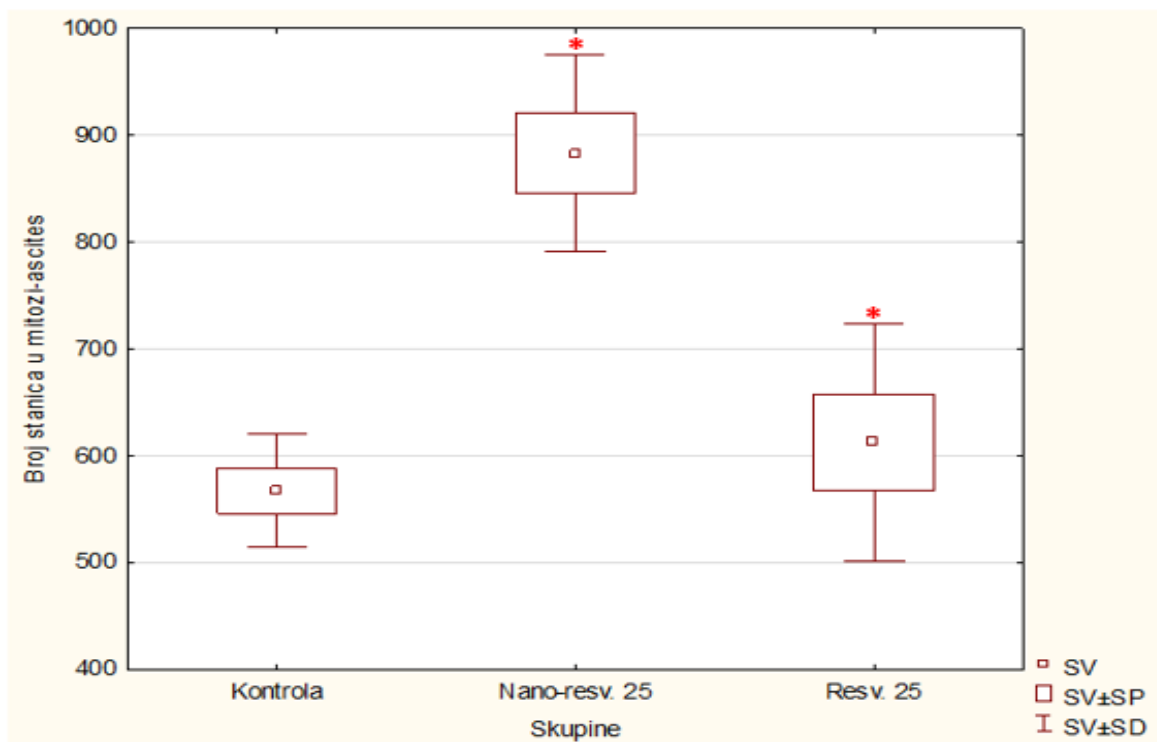
Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Statistički značajno različito: Nano-resv. 25 vs Kontrola (** $P \leq 0,01$); Nano-resv. 25 vs Resv. 25 (▲ $P \leq 0,05$).

Kratice: **Nano-resv. 25** – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.8.4 KVANTITATIVNO MJERENJE STANICA U MITOZI U UZORCIMA ASCITESA

Mikroskopska analiza kvantitativnog mjerenja stanica u mitozu u ascitesu pokazala je statistički značajno povećanje broja stanica u mitozu kod skupine obrađene s nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ($P \leq 0,05$) i kod skupine obrađene s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ($P \leq 0,05$) (Slika 30.)



Slika 30.: Kvantitativno mjerenje stanica u mitozu u ascitesu miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

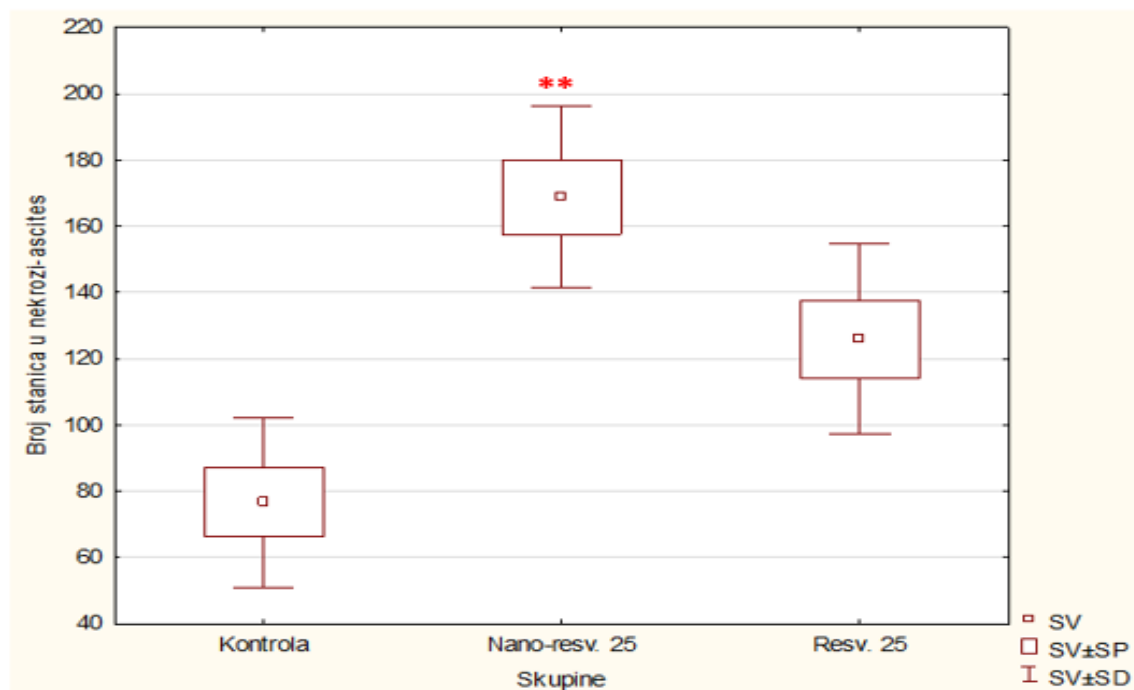
Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Statistički značajno različito: Nano-resv. 25 vs Kontrola ($* P \leq 0,05$); Resv. 25 vs Kontrola ($* P \leq 0,05$).

Kratice: **Nano-resv. 25** – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

4.8.5 KVANTITATIVNO MJERENJE STANICA U NEKROZI U UZORCIMA ASCITESA

Mikroskopska analiza kvantitativnog mjerenja stanica u nekrozi u ascitesu pokazala je statistički značajno povećanje broja stanica u nekrozi kod skupine obrađene s nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ($P \leq 0,01$) (Slika 31.).



Slika 31.: Kvantitativno mjerenje stanica u nekrozi u ascitesu miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg

Miševi (N=6) su nakon unosa EAT stanica ($2,5 \times 10^6$) obrađeni *ip* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Statistički značajno različito: Nano-resv. 25 vs Kontrola (** $P \leq 0,01$).

Kratice: **Nano-resv. 25** – nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg; **Resv. 25** – resveratrol u dozi od 25 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

5. RASPRAVA

Zloćudni tumori su drugi uzrok smrtnosti po učestalosti, odmah nakon bolesti srca i krvnih žila. Prema podacima Državnoga registra za rak, godišnje se u Hrvatskoj dijagnosticira oko 24 000 novih slučajeva zloćudnih bolesti, odnosno, 65 novih slučajeva dnevno. Sa porastom učestalosti zloćudnih bolesti raste i njihova smrtnost. Tumori koji dovode do stvaranja peritonealne karcinomatose te posljedičnog stvaranja ascitesa izazivaju izrazito brzu smrt. S obzirom na neučinkovitost klasične terapije koja izaziva posljedičnu toksičnost, nužno je pronaći nove oblike terapija i protutumorskih lijekova. Jedan od oblika nespecifične terapije je modulacija imunskog sustava prirodnim pripravcima kao što su polifenolne/flavonoidne sastavnice, uključujući resveratrol. Resveratrol (3,4', 5-trihidroksi-trans-stilben), prirodni stilben i ne-flavonoidni polifenol, je fitoestrogen koji posjeduje antioksidacijska, protuupalna, kardioprotektivna i protutumorska svojstva.

Učinke nanokristala resveratrola i otopine resveratrola na Ehrlichov ascitesni tumor istražili smo tako što smo u miševu intraperitonealno (*ip*) injicirali $2,5 \times 10^6$ EAT stanica što označava 0. dan pokusa. Obradu životinja s EAT tumorom po skupinama započeli smo idućeg dana (1. dan pokusa) *ip* injiciranjem resveratrola u dozi od 25 mg/kg i nanokristala resveratrola u dozi od 25 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Kontrolna skupina obrađena je *ip* s fiziološkom otopinom. Analizirali smo sljedeće odrednice za tumor, jetru i bubreg: promjena tjelesne mase tumora miševa, inhibicija rasta tumora, volumen peritonealne tekućine, ukupni broj stanica u peritonealnoj tekućini, promjena mase unutarnjih organa, parametre oksidacijskog stresa za uzorke tkiva jetre i bubrega; proteine, MDA, CAT, SOD, GSH, kvantitativno mjerenje prožiljenosti peritonealne ovojnice, jetre i bubrega.

EAT tumor je pogodan model za istraživanje ascitesnog oblika tumora, poput tumora jajnika i drugih oblika tumora u trbušnoj šupljini te tijekom bijega pojedinih stanica u trbušnu šupljinu tijekom operacijskih zahvata, što vodi nastanku ascitesa, peritonealne angiogeneze i brze smrti domaćina. EAT je heterogeni, slabo diferencirani, brzorastući zloćudni tumor koji sadrži populacije stanica različite osjetljivosti, a izvorno se javlja kao spontani karcinom mliječne žlijezde u miša. Ovaj tumorski model pogodan je za proučavanje protutumorskih, antiangiogenih i protuupalnih učinaka prirodnih komponenti. Odmah nakon intraperitonealne (*ip*) inokulacije EAT stanica, dolazi do brzog povećanja količine ascitesa i broja stanica, angiogenetski je ovisan, s vrlo agresivnim ponašanjem i može rasti u gotovo svim sojevima miševa (Oršolić i sur. 2016). EAT izaziva lokalnu upalnu reakciju, povećanu propusnost krvožilnog sustava te

stvaranjem edema, što vodi staničnoj migraciji i progresivnim stvaranjem ascitesne tekućine neophodne za rast tumora kao nutritivnog izvora za tumorske stanice i peritonealne makrofage (Oršolić i sur. 2016). Stoga, čini se da je rast EAT usko povezan s aktivnošću imunskog sustava, što ga čini zanimljivim modelom za analizu međudjelovanja imunskog sustava, angiogeneze i razvoja tumora. Nadalje u jetri miševa, nositelja EAT, dolazi do znatnog povećanja lipidne peroksidacije te do smanjenja količine antioksidacijskih enzima; ove značajke čine ga pogodnim modelom za istraživanje antioksidacijske učinkovitosti prirodnih sastavnica.

Učinke resveratrola na rast tumora potvrdili smo praćenjem promjena tjelesne mase tijekom perioda obrade kako bi dobili uvid izravnog učinka resveratrola na brzinu rasta tumora, odnosno, ascitesa kod pojedine skupine s obzirom na način obrade; čisti resveratrol u dozi od 25 mg/kg ili nanokristali resveratrola u dozi od 25 mg/kg. Resveratrol i nanokristali resveratrola pokazali su visoki inhibicijski učinak na rast stanica EAT (47% - 60%). Protutumorski učinak resveratrola smo potvrdili i smanjenjem volumena ascitesa u peritonealnoj šupljini (Slika 7.) kao i reduciranim brojem stanica u peritonealnoj tekućini (Slika 8.). Rezultati određivanja ukupnog broja stanica u peritonealnoj tekućini ukazuju da je srednja vrijednost broja stanica u obrađenim skupinama statistički značajno manja ($P \leq 0,01$) u odnosu na kontrolu, gdje se posebno ističe skupina obrađena s nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg. Ovi rezultati dokazuju da se primjenom odgovarajućih načina dostave resveratrola, posebice u nano obliku i njegovoj dužoj biodostupnosti povećava njegova lokalna razina što može spriječiti angiogenezu i rast tumora (Slika 8.).

Reaktivne vrste kisika (ROS) nastaju u tijelu kao nusprodukti nekoliko staničnih metaboličkih reakcija; sastoje se od radikalnih i neradikalnih kisikovih vrsta nastalih djelomičnom redukcijom kisika. Niska razina ROS-a nužna je za stanične procese poput unutarstanične signalizacije, staničnog napredovanja i obrane stanica. Suprotno tome, visoka razina ROS-a ili nesposobnost antioksidacijskog sustava da regulira razinu ROS-a učinkovito rezultira oksidacijskim stresom. Oksidacijski stres rezultira izravnim ili neizravnim oštećenjem nukleinskih kiselina, proteina i lipida posredovanih ROS-om. Kako bi spriječilo nakupljanje ROS-a, tijelo proizvodi molekule, odnosno antioksidanse, koji neutraliziraju ROS spriječavajući njihov štetni učinak na tkiva i organe. Antioksidacijski sustav sastoji se od enzimskih obrambenih svojstava, poput superoksid dismutaze (SOD), glutation peroksidaze (GSH) i katalaze (CAT), kao i neenzimske obrane askorbinske kiseline (vitamin C), α -

tokoferola (vitamin E), i β -karotena. Ravnoteža i učinkovitost ovog sustava ključna je za zdravlje organizma.

Brojni antioksidansi su nazočni u hrani te pokazuju veliki protutumorski učinak koji se temelji na više različitih mehanizama, primjerice njihovim antioksidacijskim svojstvima, inhibiciji prijenosa signalnih molekula, inhibiciji prooksidativnih enzima (lipooksigenaza, cikloooksigenaza, ksantin oksidaza), poticanju procesa apoptoze/nekroze, modulaciji aktivnosti onkogeni, promjeni redoks stanja stanica tumora, inhibiciji angiogeneze te enzima telomeraza, topoizomeraza, metaloproteinaza, ornitin dekarboksilaza, sinteze poliamina, kao i brojnih kinaza (protein tirozin kinaza, cAMP-ovisnih protein kinaza, fosfoinozitol 3 kinaza, ciklin-ovisnih kinaza, mitogen aktiviranih protein kinaza) uključenih u proliferaciju stanica.

Prema Dayemu i sur. (2016) polifenoli imaju posebne aktivnosti koje su korisne za ljudsko zdravlje, kao što su antioksidativno, antiinfektivno, antitumorsko, neuroprotektivno i protuupalno djelovanje. Za njihovu široku aktivnost zaslužno je nekoliko mehanizama, uključujući međureakciju, kao i modulaciju, širokog spektra proteina, enzima i membranskih receptora, regulaciju ekspresije gena, indukciju apoptoze, vazodilataciju i modulaciju staničnih signala. Naročito se moćna antikancerозна aktivnost polifenola može pripisati njihovom ciljanju antioksidativnih, protuupalnih i antiestrogenih mehanizama.

Analiza razine lipidne peroksidacije u uzorcima tkiva jetre i bubrega pokazala je na snižene razine MDA u oba tkiva čime potvrđujemo antioksidacijski potencijal resveratrola. Razina MDA u uzorcima tkiva jetre snižena je kod skupine obrađene s nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg u odnosu na skupinu obrađenu s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg ($P \leq 0,05$) (Slika 12.), dok je razina MDA u uzorcima tkiva bubrega snižena u odnosu na kontrolu, međutim, nije pokazana statistički značajna razlika između ispitivanih skupina.

Analizom oksido-redukcijskog statusa vidljivo je da resveratrol nije imao utjecaja na količinu glutationa (GSH) u uzorcima tkiva jetre tijekom 14 dana obrade (Slika 15.), dok je u uzorcima tkiva bubrega primijećena znatno manja količina GSH kod skupine obrađene s nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ($P \leq 0,01$) (Slika 20.) i skupinu obrađenu s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg ($P \leq 0,05$) (Slika 20.). Budući da je razina GSH u uzorcima tkiva bubrega kod obje obrađene skupine bila smanjena u odnosu na kontrolu, ali i razina lipidne peroksidacije, smatramo da su nazočnost nanokristala i bolja biodostupnost izazvale prilagodbu stanica bubrega na okolišne uvjete bogate antioksidansima; točnije uvjete u kojima nije potrebna dodatna sinteza GSH. Analiza CAT aktivnosti u uzorcima tkiva jetre je

povećana, pri čemu je statistički značajno povećanje vidljivo samo kod skupine obrađene resveratrolom u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P \leq 0,01$) (Slika 13.). Analiza u uzorcima tkiva bubrega ne pokazuje značajne promjene CAT aktivnosti između obrađenih skupina. SOD enzimski aktivnost povećana je u uzorcima tkiva jetre kod skupine obrađene s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg, dok je kod uzoraka tkiva bubrega SOD enzimski aktivnost povećana kod svih obrađenih skupina u odnosu na kontrolu, pri čemu je statistički značajno povećanje vidljivo samo kod skupine obrađene s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolu ($P \leq 0,05$) (Slika 19.) i u odnosu na skupinu obrađenu s nanokristalima resveratrola u dozi od 25 mg/kg ($P \leq 0,05$) (Slika 19.). Uočeno je povećanje CAT aktivnosti u uzorcima tkiva jetre i SOD aktivnosti u uzorcima tkiva jetre i bubrega u odnosu na kontrolu. Smatramo da povišene aktivnosti SOD i CAT ukazuju na povećanu sposobnost resveratrola i njegovih nanokristala u jačanju enzimski antioksidacijske aktivnosti u stanicama bubrega i jetre. Za razliku od zdravih stanica, povećanje SOD aktivnosti u tumorskim stanicama uz smanjenu razinu GSH može biti pokazatelj usporavanja rasta tumorskih stanica zbog povećane proizvodnje vodikovog peroksida i njegovog toksičnog učinka na tumorske stanice (Wang i sur., 2005).

Histološke analize prožiljenosti pokazale su znatno smanjen broj krvnih žila u uzorcima tkiva jetre, bubrega i peritonealne ovojnice, pri čemu je statistički značajno smanjenje broja krvnih žila u skupini obrađenoj s resveratrolom u dozi od 25 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu u sva tri uzorka ($P \leq 0,05$; 0,01; 0,001). (Slike 21.-26.). Smanjeni broj krvnih žila zasigurno je mehanizam očuvanja fiziološke funkcije bubrega i jetre od brojnih patoloških poremećaja koji vode povećanju broja krvnih žila, posebice kroničnih upalnih bolesti. Točnije, fiziološki prevladavaju angiostatski mehanizmi i u odraslom organizmu nema rasta krvnih žila, osim u iznimnim situacijama, kao što su cijeljenje rane, formiranje žutog tijela i folikula jajnika, te rast endometrija. Patološka angiogeneza nastaje kao posljedica gubitka ravnoteže između čimbenika koji stimuliraju i inhibiraju angiogenezu. Zbog toga dolazi do prekomjernog rasta krvnih žila tijekom patoloških procesa kao što su nastanak solidnih i krvnih tumora, kardiovaskularnih bolesti (ateroskleroza), kroničnih upalnih bolesti (reumatoidni artritis, Chronova bolest), dijabetesa (dijabetička retinopatija), psorijaze, endometrioze i pretilosti. Nedostatan rast krvnih žila sastavni je dio patoloških zbivanja kao što su ishemijska bolest srca, cerebrovaskularni inzult, sklerodermija i infertilitet (Feldman i sur., 2003).

Angiogeneza je proces u kojem krvne žile nastaju pupanjem iz već postojećih (Awada i sur., 2005). To je kompleksni biološki proces, koji zahtjeva preciznu koordinaciju između pro-

i antiangiogenih čimbenika rasta (Oršolić i sur., 2016). Angiogeni čimbenici združeni s tumorom mogu se razvrstati u dvije skupine: a) one koje proizvode tumorske stanice i b) one koji potječu od upalnih stanica (npr. makrofaga) koje infiltriraju tumore (Jiang i sur., 2015). Stvoreni sustav krvnog i limfnog protoka ubrzava rast tumora, struje obaju tjelesnih tekućina omogućuju ili olakšavaju otkinutim djelićima tumorskog tkiva ili pak embolima tumorskih stanica odvod u sustavnu cirkulaciju i limfotok, te se vjeruje da su najčešće (zbog tanke stijenke) u području venula i malih limfnih žila. Stoga se intenzitet angiogeneze (gustoća krvnih žila u tumoru) može upotrijebiti kao čimbenik prognoze u smislu procjene malignosti i metastazibilnosti tumora (Juretić, 2000).

Navedeni rezultati smanjenja peritonealne angiogeneze (Slika 21.) odnosno mikrožilne gustoće (MVD) pokazuju da resveratrol posjeduje snažan antiangiogeni potencijal u *in vivo* uvjetima te da bi dugotrajnija obrada s resveratrolom mogla polučiti bolji protutumorski i antiangiogeni učinak. MVD jest zlatni morfološki standard za procjenu neovaskularizacije tumora jer MVD broj odražava antiangiogena svojstva tumora i predstavnik je prosječne interkapilarne udaljenosti kao važnog parametra angiogene terapije; smanjenje interkapilarne udaljenosti može biti ograničavajući čimbenik u brzini rasta tumora (Rak i sur., 1995).

Temeljem navedenog naši rezultati mikroskopske analize broja krvnih žila u peritonealnoj ovojnici potvrđuju veliki antiangiogeni učinak resveratrola što potvrđuje i njegovu inhibiciju rasta tumora (Slika 9.). Zasižno tome pridonosi i antioksidacijska (Slike 11.-20.) i antiupalna (Slike 21.-26.) aktivnost resveratrola, posebice inhibicija prooksidacijskih enzima uključujući COX-2 koji je usko povezan s inhibicijom angiogeneze (Oršolić i sur., 2016). Inhibiciju rasta tumora potvrđuje i van Ginkel i sur. (2007) gdje je resveratrol smanjio vitalnost tumorskih stanica *in vitro* za 75% do 90%, što je posljedica inhibicije stanične proliferacije i indukcije apoptoze.

S obzirom da je primjena nanokristala kao i drugih oblika nanočestica u porastu, posebice u terapiji tumora zbog njihovih značajki, posebice njihovih specifičnih kemijskih i fizičkih karakteristika u veličini, obliku i velikom udjelu površine u odnosu na volumen, postaju atraktivni za uporabu u različitim medicinskim i biološkim uvjetima (Hollis, 2014; Dong, 2015; Hasani-Sadrabadi, 2016). Međutim, do danas, postoji samo nekoliko istraživanja koja izravno ili neizravno ukazuju na toksične učinke tih nanomaterijala, a trenutno nedostaju jasne smjernice za kvantificiranje tih učinaka. Opasnosti od ovih čestica, kao i njihove koristi, traže

dodatna istraživanja, kako bi se odredila sigurna doza primjene nanokristala te smanjili mogući rizici posebice na jetru i bubrege koji su u izravnom doticaju s nanokristalima gdje je zapaženo njihovo nakupljanje.

Trenutne spoznaje o ponašanju nanokristala *in vivo* temelje se na farmakokinetičkim i biodistribucijskim podacima dobivenim praćenjem razina lijeka, što je nedostavno za jasan uvid u ponašanje nanokristala. Metode koje su dobar pokazatelj toksičnosti uključuju proliferacijsku analizu, test apoptoze, test nekroze, test oksidacijskog stresa i analizu oštećenja DNA te histopatološka oštećenja tkiva.

Naši rezultati analize apoptoze/nekroze u bubregu i jetri pokazuju povećan broj nekroze u obrađenim uzorcima s nanokristalima resveratrola u odnosu na kontrolu, ali i znatno jači proces proliferacije stanica bubrega (Slike 27, 28, 29). Poznato je da nanokristali u cirkulaciji mogu biti uhvaćeni od strane stanica, primjerice, kristalni materijali pronađeni su u slezeni nakon intravenske primjene (Rabinow, 2007) ili primjena protoretrovirusnih nanokristala u makrofagima pokazala je da je 68% unešenih nanokristala ostalo netaknuto u makrofagima 24 sata nakon preuzimanja (Kadiu, 2011). Umjesto razgradnje u makrofagima, nanokristali prolaze kroz endocitno recikliranje i mogu se osloboditi sa sličnom veličinom i oblikom kao originalni nanokristali. Osim makrofaga, cjelovite nanokristale mogu zahvatiti i stanice raka (Chen i Li, 2015).

Temeljem navedenog, moguće je da je došlo do nakupljanja nanokristala resveratrola od strane makrofaga u bubregu i jetri kao i u drugim stanicama tkiva. Nakupljanje nanokristala može potaknuti oštećenje tkiva te povećati fagocitozu oštećenih stanica od strane makrofaga (posebice makrofaga bubrega i Kupfferovih stanica, koje pripadaju retikuloendotelnom sustavu) te potaknuti njihovu ulogu u remodeliranju tkiva i ubrzanju procesa regeneracije. Ovaj proces ubrzane regeneracije možemo pripisati antioksidacijskom učinku resveratrola i njegovih nanokristala. Međutim nazočnost nanokristala zasigurno može voditi i upali. Povećani broj stanica u nekrozi, vodi upali koja može potaknuti proliferaciju stanica što je zasigurno prisutno kod stanica tumora (Slike 30, 31). Čini se da ovaj proces zahtjeva dodatne metode i dodatne pokazatelje različitih procesa tijekom remodeliranja tkiva te praćenje tijekom dužeg vremena da bi potvrdili svoje pretpostavke.

Naši rezultati su u skladu s *in vivo* podacima primjene nanočestica zlata koje je prouzročilo apoptozu i akutnu upalu u jetri, bioakumulaciju u organima i sposobnost prodora u područjima glave i repa sperme (Wiwanitkit i sur., 2009). Uočeno je da se čestice nakupljaju u jetri i slezeni do 7 dana nakon injiciranja. Ove nanočestice izazivaju apoptozu i upalu u jetri. Istraživanje je

također pokazalo prisutnost nanočestica zlata obloženih PEG-om u makrofagima slezene i lizosomima jetre (Cho, 2009). Rahman (2009) u svom *in vivo* istraživanju sa nanočesticama srebra pokazao je dodatna oštećenja u mozgu kao uništenja krvno-moždane barijere, oštećenje astrocита, oksidacijski stres izazvan slobodnim radikalima, promjenu ekspresije gena i oštećenje neurona.

Temeljem naših podataka kao i podataka drugih autora zasigurno primjena nanokristala može biti i korisna, ali i izazvati oštećenja pojedinih tkiva i organa što ovisi o njihovom nakupljanju, topivosti, pH, mjestu injiciranja i dozi.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata možemo zaključiti kako slijedi:

1. Resveratrol i nanokristali resveratrola imaju inhibicijski učinak na rast stanica tumora; ukupni broj stanica u peritonealnoj tekućini i volumena ascitesa su znatno smanjeni u odnosu na kontrolu.
2. Smanjena razina MDA i povećana razina GSH u jetri i bubregu ukazuje na antioksidacijski i zaštitni učinak resveratrola.
3. Broj krvnih žila u jetri i bubregu je smanjen u odnosu na kontrolu što ukazuje na zaštitnu ulogu resveratrola i nanokristala resveratrola u očuvanju fiziološke funkcije bubrega i jetre.
4. Mikroskopska analiza broja krvnih žila u peritonealnoj ovojnici potvrđuje veliki antiangiogeni potencijal resveratrola i njegovih nanokristala što posljedično vodi inhibiciji rasta tumora.
5. Antioksidacijske i antiupalne značajke resveratrola i nanokristala resveratrola zasigurno pridonose smanjenom broju krvožilja u peritonealnoj ovojnici.
6. Sažimajući podatke možemo zaključiti da primjena nanokristala može biti i korisna, ali i izazvati oštećenja pojedinih tkiva i organa što ovisi o njihovom nakupljanju, topljivosti, pH, mjestu injiciranja i dozi.

7. LITERATURA:

1. Abdal Dayem, A., Choi, H., Yang, G.-M., Kim, K., Saha, S., & Cho, S.-G. (2016). The Anti-Cancer Effect of Polyphenols against Breast Cancer and Cancer Stem Cells: Molecular Mechanisms. *Nutrients*, 8(9), 581.
2. Aebi H. (1984): Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
3. Aggarwal B.B., Bhardwaj A., Aggarwal R.S., Seeram N.P., Shishodia S., Takada Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.*, 24:2783–2840.
4. Ali, H.S. (2011). Hydrocortisone nanosuspensions for ophthalmic delivery: a comparative study between microfluidic nanoprecipitation and wet milling. *J. Control. Release* 149, 175–181.
5. Al-Kassas, R., Bansal, M., Shaw, J. (2017). Nanosizing techniques for improving bioavailability of drugs. *J. Control. Release* 260, 202–212.
6. Amioka T, Kitadai Y, Tanaka S. (2002). Vascular endothelial growth factor-C expression predicts lymph node metastasis of human gastric carcinomas invading the submucosa. *Eur J Cancer.*, 38:1413–19.
7. Awada A, de Castro G., Jr. (2005). An integrated approach for tailored treatment in breast cancer. *Ann Oncol.*, 16:203–8.
8. Baba, K. (2011). A method for enhancing the ocular penetration of eye drops using nanoparticles of hydrolyzable dye. *J. Control. Release* 153, 278–287.
9. Babu, N.J., Nangia, A. (2011). Solubility advantage of amorphous drugs and pharmaceutical cocrystals. *Cryst. Growth Des.* 11, 2662–2679.
10. Baker, G.L. (2008). Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C60 fullerene nanoparticles and microparticles. *Toxicol. Sci.* 101(1), 122–131.
11. Bilensoy, E., Hincal, A.T. (2009). Recent advances and future directions in amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 6, 1161–1173.
12. Bishayee A. (2009). Cancer prevention and treatment with resveratrol: From rodent studies to clinical trials. *Cancer Prev. Res.*, 2:409–418.
13. Blagden, N., de Matas, M., Gavan, P.T., York, P. (2007). Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59, 617–630.

14. Borrello IM, Sotomayor EM. (2002). Cancer vaccines for hematologic malignancies. *Cancer Control.*, 9:138-151.
15. Brooks PC. (1996). Cell adhesion molecules in angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.*, 15:187–94.
16. Brouwers, J., Tack, J., Augustijns, P. (2007). In vitro behavior of a phosphate ester prodrug of amprenavir in human intestinal fluids and in the Caco-2 system: illustration of intraluminal supersaturation. *Int. J. Pharm.*, 336, 302–309.
17. Bujnakova, Z., Balaz, P., Makreski, P., Jovanovski, G., Caplovicova, M., Caplovic, L., Shpotyuk, O., Ingram, A., Lee, T.-C., Cheng, J.-J., Sedlak, J., Turianicova, E., Zorkovska, A. (2015). Arsenic sulfide nanoparticles prepared by milling: properties, free-volume characterization, and anti-cancer effects. *J. Mater. Sci.*, 50, 1973–1985.
18. Buzea, C., Pacheco, I.I., Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR7–MR71.
19. Capecchi MR (2005). Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet*, 6(6):507-12.
20. Carter L.G., D’Orazio J.A., Pearson K.J. (2014). Resveratrol and cancer: Focus on in vivo evidence. *Endocr. Relat. Cancer.*, 21:R209–R225.
21. Chauhan, H., Kuldipkumar, A., Barder, T., Medek, A., Gu, C.-H., Atef, E. (2014). Correlation of inhibitory effects of polymers on indomethacin precipitation in solution and amorphous solid crystallization based on molecular interaction. *Pharm. Res.*, 31, 500–515.
22. Chen, Y. and Li, T. (2015). Cellular uptake mechanism of paclitaxel nanocrystals determined by confocal imaging and kinetic measurement. *AAPS J.*, 17, 1126–1134.
23. Chin, W.W.L., Parmentier, J., Widzinski, M., Tan, E.H., Gokhale, R. (2014). A brief literature and patent review of nanosuspensions to a final drug product. *J. Pharm. Sci.*, 103, 2980–2999.
24. Cho, W.-S. (2009). Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 236(1), 16–24.
25. Colin D., Lancon A., Delmas D., Lizard G., Abrossinow J., Kahn E., Jannin B., Latruffe N. (2008). Antiproliferative activities of resveratrol and related compounds in human hepatocyte derived HepG2 cells are associated with

- biochemical cell disturbance revealed by fluorescence analyses. *Biochimie.*, 90:1674–1684.
26. Costabile, G. (2015). Toward repositioning niclosamide for antivirulence therapy of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections: development of inhalable formulations through nanosuspension technology. *Mol. Pharm.*, 12, 2604–2617.
 27. Cucciolla V., Borriello A., Oliva A., Galletti P., Zappia V., Della Ragione F. (2007). Resveratrol: From basic science to the clinic. *Cell Cycle.*, 6:2495–2510.
 28. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science.*, 265:1582–4.
 29. Darville, N. (2014). Intramuscular administration of paliperidone palmitate extended-release injectable microsuspension induces a subclinical inflammatory reaction modulating the pharmacokinetics in rats. *J. Pharm. Sci.*, 103, 2072–2087.
 30. Denekamp J. (1993). Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br J Radiol.*, 66:181–96.
 31. DeVita VT Jr., Young RC, Canellos GP (1975). Combination versus single agent chemotherapy: a review of the basis for selection of drug treatment of cancer. *Cancer.*, 35:98–110.
 32. Dong, D. (2015). Elucidating the in vivo fate of nanocrystals using a physiologically based pharmacokinetic model: a case study with the anticancer agent SNX-2112. *Int. J. Nanomedicine.*, 10, 2521–2535.
 33. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.*, 21:137–148.
 34. Dvorak HF. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clinl Oncol.*, 20:4368–80.
 35. Englert C, Hou X, Maheswaran, S. (1995). WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *EMBO J*, 14(19):4662-75.
 36. Evans DB. (2005). Preoperative chemoradiation for pancreatic cancer. *Semin Oncol.*, 32:25–9.
 37. Felmeden DC, Blann AD, Lip GYH. (2003). Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *Eur Heart J.*, 24: 586–603.

38. Flohé L., Ötting F. (1971): Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology* 105: 70–76.
39. Folkman J, Shing Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem.*, 267:10931–4.
40. Folkman J. (1971). Tumor angiogenesis therapeutic implications. *N Engl J Med.*, 285:1182–6.
41. Folkman J. (1996). Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci Am.*, 275:150–4.
42. Fuhrmann, K. (2013). Modular design of redox-responsive stabilizers for nanocrystals. *ACS Nano* 7, 8243–8250.
43. Gao, L. (2013). Application of drug nanocrystal technologies on oral drug delivery of poorly soluble drugs. *Pharm. Res.*, 30, 307–324.
44. Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 652–674.
45. Hasani-Sadrabadi, M.M. (2016). Microfluidic manipulation of core/shell nanoparticles for oral delivery of chemotherapeutics: a new treatment approach for colorectal cancer. *Adv. Mater.*, 28, 4134–4141.
46. Hoevel T, Macek R, Mundigl O, Swisshelm K, Kubbies M. (2002). Expression and targeting of the tight junction protein CLDN1 in CLDN1-negative human breast tumor cells. *J Cell Physiol.*, 191:60–8.
47. Hollis, C.P. (2014).: In vivo investigation of hybrid Paclitaxel nanocrystals with dual fluorescent probes for cancer theranostics. *Pharm. Res.* 31, 1450–1459.
48. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. (1995). Dormancy of micrometastases: balance proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.*, 1:149–53.
49. Homayouni, A., Sadeghi, F., Varshosaz, J., Garekani, H.A., Nokhodchi, A. (2014). Comparing various techniques to produce micro/nanoparticles for enhancing the dissolution of celecoxib containing PVP. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 88, 261–274.
50. Hong W.K., Sporn M.B. (1997). Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science.*, 278:1073–1077.
51. Huttunen, K.M., Raunio, H., Rautio, J. (2011). Prodrugs – from serendipity to rational design. *Pharmacol. Rev.*, 63, 750–771.
52. Jalšenjak I., Jalšenjak V., Filipović-Grčić J., (1998). *Farmaceutika.*, Zagreb: Školska Knjiga.

53. Jayakumar T., Thomas P. A., Geraldine P. (2007): Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Experimental Gerontology* 42: 183-191.
54. Jeandet P., Douillet-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M. (2002). Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food Chem.*, 50:2731–2741.
55. Juhnke, M., Martin, D., John, E. (2012). Generation of wear during the production of drug nanosuspensions by wet media milling. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 81, 214–222.
56. Juretić, A. (2000). Metastaziranje i angiogeneza. U: Šamija M. i sur. *Onkologija. Medicinska naklada, Zagreb*, str. 43 -44.
57. Kadiu, I. (2011). Macrophage endocytic trafficking of antiretroviral nanoparticles. *Nanomedicine.*, 6, 975–994.
58. Kang, S., Mauter, M.S., Elimelech, M. (2008). Physicochemical determinants of multiwalled carbon nanotube bacterial cytotoxicity. *Environ. Sci. Technol.*, 42(19), 7528–7534.
59. Keck, C.M., Müller, R.H. (2006). Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 62, 3–16.
60. Kim, S.C. (2001). In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *J. Control. Release*, 72(1), 191–202.
61. Kumar V., Sharma N., Maitra S.S. (2016). In vitro and in vivo toxicity assessment of nanoparticles.
62. Laaksonen, T., Liu, P., Rahikkala, A., Peltonen, L., Kauppinen, E.I., Hirvonen, J., Järvinen, K., Raula, J. (2011). Intact nanoparticulate indomethacin in fast-dissolving carrier particles by combined wet milling and aerosol flow reactor methods. *Pharm. Res.*, 28, 2403–2411.
63. Lai F, Pireddu R, Corrias F, Fadda AM, Valenti D, Pini E, Sinico C. (2013). Nanosuspension improves tretinoin photostability and delivery to the skin. *Int. J. Pharm.*, 458(1):104-109.
64. Li M., Kildegaard K.R., Chen Y., Rodriguez A., Borodina I., Nielsen J. (2015). De novo production of resveratrol from glucose or ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.*, 32:1–11.

65. Li, Y.-P. (2001). PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J. Control. Release*, 71(2), 203–211.
66. Liu, P., De Wolf, O., Laru, J., Heikkilä, T., van Veen, B., Kiesvaara, J., Hirvonen, J., Peltonen, L., Laaksonen, T., (2013). Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions. *AAPS PharmSciTech*, 14, 748–756.
67. Lovrić J., Hafner A., Radiković M., Juretić M., Dürriegl M., Perina Lakoš G., Pepić I., (2015). Nanokristali djelatne tvari: fiziko-kemijska, farmaceutsko-tehnološka, biofarmaceutska i terapijska svojstva. *Farmaceutski glasnik.*, 71, 7–8.
68. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
69. Lu, Y. (2015). Developing nanocrystals for cancer treatment. *Nanomedicine*, 10, 2537–2552.
70. Lu, Y. (2016). Injected nanocrystals for targeted drug delivery. *Acta Pharm. Sin. B*, 6, 106–113.
71. Madani, S.Y., Mandel, A., Seifalian, A.M. (2013). A concise review of carbon nanotube's toxicology. *Nano Rev. Exp.*, 4, 21521–21534.
72. Mah, P.T., Laaksonen, T., Rades, T., Peltonen, L., Strachan, C.J. (2015). Differential scanning calorimetry predicts the critical quality attributes of amorphous glibenclamide. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 80, 74–81.
73. Malamari M., Taylor KMG., Malamataris S., Douroumis D., Kachrimanis K. (2018). Pharmaceutical nanocrystals: production by wet milling and applications. *Drug Discov Today.*, 23(3):534-547.
74. Martin TA, Jiang WG. (2009). Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta.*, 1788:872–91.
75. Mellaerts, R., Mols, R., Kayaert, P., Annaert, P., Van Humbeeck, J., Van den Mooter, G., Martens, J.A., Augustijns, P. (2008). Ordered mesoporous silica induces pH-independent supersaturation of the basic low solubility compound itraconazole resulting in enhances transepithelial transport. *Int. J. Pharm.*, 357, 169–179.
76. Merisko-Liversidge, E. (2003). Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 18, 113–120.

77. Mondal A., Bennett L.L. (2016). Resveratrol enhances the efficacy of sorafenib mediated apoptosis in human breast cancer MCF7 cells through ROS, cell cycle inhibition, caspase 3 and PARP cleavage. *Biomed. Pharmacother.*, 84:1906–1914.
78. Möschwitzer, J. (2013). Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. *Int. J. Pharm.*, 453, 142–156.
79. Muller, R.H. (2011). State of the art of nanocrystals – special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78, 1–9.
80. Nakagawa S, Miyoshi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Sekimoto M. (2011). Expression of CLDN1 in colorectal cancer: a novel marker for prognosis. *Int J Oncol.*, 39:791–6.
81. Newman D.J., Cragg G.M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, 79:629–661.
82. Nygaard, U. C, Hansen, J. S, Samuelsen, M., Alberg, T., Marioara, C. D., Løvik, M. (2009). Single-walled and multi-walled carbon nanotubes promote allergic immune responses in mice. *Toxicol. Sci.*, 109(1), 113–23.
83. Ono M, Torisu H, Fukushi J, Nishie A, Kuwano M. (1999). Biological implications of macrophage infiltration in human tumor angiogenesis. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 43(Suppl):S69–71.
84. Oršolić N, Kunštić M, Kukulj M, Gračan R, Nemrava J (2016) Oxidative stress, polarization of macrophages and tumour angiogenesis: Efficacy of caffeic acid, *Chem Biol Interact*, 256:111–24.
85. Parangi S, O'Reilly M, Christofori G. (1996). Angiogenesis therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93:2002–7.
86. Porter, C.J.H., Trevaskis, N.L., Charman, W.N. (2007). Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat. Rev.*, 6, 231–248.
87. Rabinow, B. (2007). Itraconazole IV nanosuspension enhances efficacy through altered pharmacokinetics in the rat. *Int. J. Pharm.*, 339, 251–260.
88. Rahim, H., Sadiq, A., Khan, S., Khan, M.A., Shah, S.M.H., Hussain, Z., Ullah, R., Shahat, A.A., Ibrahim, K. (2017). Aceclofenac nanocrystals with enhanced

- in vitro, in vivo performance: formulation optimization, characterization, analgesic and acute toxicity studies. *Durg Des. Dev. Ther.* 11, 2443–2452.
89. Rahman, M. (2009). Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. *Toxicol. Lett.*, 187(1), 15–21.
90. Rak J, Filmus J, Kerbel RS (1996) Reciprocal paracrine interactions between tumor cells and endothelial cells: the »angiogenesis progression« hypothesis, *Eur J Cancer* 32A:2438–50.
91. Romero, G. B., Keck, C. M., & Müller, R. H. (2016). Simple low-cost miniaturization approach for pharmaceutical nanocrystals production. *International Journal of Pharmaceutics*, 501(1-2), 236–244.
92. Sahu, B.P., Das, M.K. (2014). Preparation and in vitro/in vivo evaluation of felodipine nanosuspension. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 39, 183–193.
93. Sarkar S., Goldgar S., Byler S., Rosenthal S., Heerboth S. (2013). Demethylation and re-expression of epigenetically silenced tumor suppressor genes: Sensitization of cancer cells by combination therapy. *Epigenomics.*, 5:87–94.
94. Seedher, N., Kanojia, M. (2009). Co-solvent solubilization of some poorly-soluble antidiabetic drugs. *Pharm. Dev. Technol.*, 14, 185–192.
95. Serajuddin, A.T. (2007). Salt formation to improve drug solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59, 603–616.
96. Shakeel, F., Faisal, M.S. (2010). Nanoemulsion: a promising tool for solubility and dissolution enhancement of celecoxib. *Pharm. Dev. Technol.*, 15, 53–56.
97. Shanmugam M.K., Kannaiyan R., Sethi G. (2011). Targeting cell signaling and apoptotic pathways by dietary agents: Role in the prevention and treatment of cancer. *Nutr. Cancer.*, 63:161–173.
98. Shanmugam M.K., Nguyen A.H., Kumar A.P., Tan B.K., Sethi G. (2012). Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: Potential role in prevention and therapy of cancer. *Cancer Lett.*, 320:158–170.
99. Sharma, O.P. (2016).: Nanocrystal for ocular drug delivery: hope or hype. *Drug Deliv. Transl. Res.*, 6, 399–413.
100. Sharma, P., Denny, W.A., Garg, S. (2009). Effect of wet milling process on the solid state of indomethacin and simvastatin. *Int. J. Pharm.*, 380, 40–48.

101. Shegokar, R., Müller, R.H. (2010). Nanocrystals: industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int. J. Pharm.*, 399, 129–139.
102. Sheng, J.J., Sirois, P.J., Dressman, J.B., Amidon, G.L. (2007). Particle diffusional layer thickness in a USP dissolution apparatus II: a combined function of particle size and paddle speed. *J. Pharm. Sci.*, 97, 4815–4829.
103. Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg D.M. (1997). Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.*, 30:91–113.
104. Soliman, K.A., Ibrahim, H.K., Ghorab, M.M. (2017). Effects of different combinations of nanocrystallization technologies on avanafil nanoparticles: in vitro, in vivo and stability evaluation. *Int. J. Pharm.*, 517, 148–156.
105. Stanley J. Oiseth, Mohamed S. Aziz (2017). Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *Cancer Metastasis Treat*, 3:250-61.
106. Sun, J., Wang, F., Sui, Y., She, Z., Zhai, W., Wang, C., Deng, Y. (2012). Effect of particle size on solubility, dissolution rate, and oral bioavailability: evaluation using coenzyme Q10 as naked nanocrystals. *Int. J. Nanomed.*, 7, 1733–1744.
107. Surwase, S.A., Itkonen, L., Aaltonen, J., Saville, D., Rades, T., Peltonen, L., Strachan, C.J. (2015). Polymer incorporation method affects the physical stability of amorphous indomethacin in aqueous suspension. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 96, 32–43.
108. Thakuria, R., Delori, A., Jones, W., Lipert, M.P., Roy, L., Rodriguez-Hornedo, N. (2013). Pharmaceutical cocrystals and poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.*, 453, 101–125.
109. Thi, T.D., Van Speybroeck, M., Barillaro, V., Martens, J., Annaert, P., Augustijns, P., Van Humbeeck, J., Vermant, J., Van den Mooter, G. (2009). Formulate-ability of ten compounds with different physicochemical profiles in SMEDDS. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 38, 479–488.
110. Tietze F. (1969): Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* 27 (3): 502-522

111. Tome-Carneiro J., Larrosa M., Gonzalez-Sarrias A., Tomas-Barberan F.A., Garcia-Conesa M.T., Espin J.C. (2013). Resveratrol and clinical trials: The crossroad from in vitro studies to human evidence. *Curr. Pharm. Des.*, 19:6064–6093.
112. Tuomela, A., Laaksonen, T., Laru, J., Antikainen, O., Kiesvaara, J., Ilkka, J., Oksala, O., Rönkkö, S., Järvinen, K., Hirvonen, J., Peltonen, L. (2015). Solid formulations by a nanocrystal approach: critical process parameters regarding scale-ability of nanocrystals for tableting applications. *Int. J. Pharm.*, 485, 77–86.
113. Tuomela, A., Liu, P., Puranen, J., Rönkkö, S., Laaksonen, T., Kalesnykas, G., Oksala, O., Ilkka, J., Laru, J., Järvinen, K., Hirvonen, J., Peltonen, L. (2014). Brinzolamide nanocrystal formulations for ophthalmic delivery: reduction of elevated intraocular pressure in vivo. *Int. J. Pharm.*, 467, 34–41.
114. Ueda, K. (2015). In situ molecular elucidation of drug supersaturation achieved by nano-sizing and amorphization of poorly water-soluble drug. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 77, 79–89.
115. Valo, H., Kovalainen, M., Laaksonen, P., Häkkinen, M., Auriola, S., Peltonen, L., Linder, M., Järvinen, K., Hirvonen, J., Laaksonen, T. (2011). Immobilization of protein-coated drug nanoparticles in nanofibrillar cellulose matrices – enhanced stability and release. *J. Control. Release*, 156, 390–397.
116. Van Ginkel, P. R., Sareen, D., Subramanian, L., Walker, Q., Darjatmoko, S. R., Lindstrom, M. J., Polans, A. S. (2007). Resveratrol Inhibits Tumor Growth of Human Neuroblastoma and Mediates Apoptosis by Directly Targeting Mitochondria. *Clinical Cancer Research*, 13(17), 5162–5169.
117. Vidlarova, L. (2016). Nanocrystals for dermal penetration enhancement – effect of concentration and underlying mechanisms using curcumin as model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 104, 216–225.
118. Wang Y., Halls C., Zhang J., Matsuno M., Zhang Y., Yu O. (2011). Stepwise increase of resveratrol biosynthesis in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering. *Metab. Eng.*, 13:455–463.
119. Wang, M., Rutledge, G.C., Myerson, A.S., Trout, B.L. (2012). Production and characterization of carbamazepine nanocrystals by

- electrospraying for continuous pharmaceutical manufacturing. *J. Pharm. Sci.*, 101, 1178–1188.
120. Wiwanitkit, V., Sereemasapun, A., Rojanathanes, R. (2009). Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report. *Fertil. Steril.*, 91(1), e7–e8.
121. Zhang, J. (2011). Formation, characterization, and fate of inhaled drug nanoparticles. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 63, 441–455.
122. Zhu, M.-T. (2008). Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology*, 247(2), 102–111.
123. Zilberberg, J., Feinman, R., & Korngold, R. (2015). Strategies for the Identification of T Cell-Recognized Tumor Antigens in Hematological Malignancies for Improved Graft-versus-Tumor Responses after Allogeneic Blood and Marrow Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21(6), 1000–1007.
124. Zong, L., Li, X., Wang, H., Cao, Y., Yin, L., Li, M., Wei, Z., Chen, D., Pu, X., Han, J. (2017). Formulation and characterization of biocompatible and stable I.V. itraconazole nanosuspensions stabilized by a new stabilizer polyethylene glycol-poly(β -Benzyl-L-aspartate) (PEG-PBLA). *Int. J. Pharm.*, 531, 108–117.

ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Matea Đermanović

Obrazovanje:

- 2009.-2013.- Srednja škola, Prirodoslovno – matematička Gimnazija, Županja
- 2014. - 2017. Odjel za biologiju u Osijeku , Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, preddiplomski studij Biologije
- 2017.-2019. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu – Biološki odsjek, diplomski studij Eksperimentalna biologija, smjer: Fiziologija i imunobiologija

Laboratorijska stručna praksa:

- 2018. – Klinika za tumore, Služba za patologiju Kliničkog bolničkog centra "Sestre milosrdnice" u Zagrebu

Tjedan mozga:

2015., 2016., 2017.- Radionice za djecu na Odijelu za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Radno iskustvo:

- 2017. – Savjetnica za Nuxe kozmetiku
- 2018. – Rad na recepciji u Biotening centru zdravlja i osobne moći