

# Učinak resveratrola i njegovih nanokristala na angiogenezu, oksidacijski stres i rast solidnog tumora

---

**Tomašević, Matea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:217:130578>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-06**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Matea Tomašević

**Učinak resveratrola i njegovih nanokristala na angiogenezu,  
oksidacijski stres i rast solidnog tumora**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić te neposrednim vodstvom Dyane Odeh, spec. techn. aliment. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

# ZAHVALE

*Veliko hvala mojoj cijenjenoj mentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na predloženoj temi, stručnom vodstvu i savjetima tijekom izrade ovog rada, a posebno hvala neposrednoj voditeljici Dyani Odeh, spec. techn. aliment. na pristupačnosti, strpljenju i svakom savjetu.*

*Zahvaljujem se i dragoj dr. sc. Snježani Ramić na izdvojenom vremenu te nesebičnoj pomoći tijekom izrade dijela rada u Klinici za tumore.*

*Hvala svim kolegama s fakulteta i prijateljima koji su upotpunili moje studentske dane na najbolji mogući način, a posebno mojoj Julijani bez čije bi podrške i bezuvjetnog prijateljstva sve bilo teže.*

*Najveća zahvalnost ide mojim roditeljima, baki i sestri čije su me molitve i podrška pratile kroz cijelo moje obrazovanje.*

*Na kraju, posebna zahvala ide mom Mariju bez čije nesebične ljubavi, podrške, razumijevanja i vjere u mene ništa ne bi bilo isto.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

### UČINAK RESVERATROLA I NJEGOVIH NANOKRISTALA NA ANGIOGENEZU, OKSIDACIJSKI STRES I RAST SOLIDNOG TUMORA

Matea Tomašević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti učinak resveratrola i njegovih nanokristala u dozi od 50 mg/kg na rast brzo rastućeg Ehrlichovog solidnog tumora (EAT) ovisnog o angiogenezi, oksidacijski stres i potencijalnu toksičnost nastalu nakupljanjem nanokristala u jetri i bubregu miševa te polarizaciju makrofaga. Tumor je izazvan injiciranjem  $1 \times 10^6$  stanica EAT subkutano (*sc*) u bedro miševa soja Swiss albino. Obrada životinja s EAT započeta je prvi dan pokusa intratumoralnim (*it*) injiciranjem resveratrola ili nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan tijekom 14 dana. Dobiveni rezultati pokazuju da *it* primjena resveratrola ili nanokristala resveratrola posjeduje izrazito anti-angiogenetsko i inhibicijsko djelovanje na rast EAT u solidnom obliku. Smanjena mikrožilna gustoća u tkivu jetre i bubrega potvrđuje anti-angiogeni potencijal resveratrola *in vivo*. Možemo zaključiti da resveratrol i njegovi nanokristali primijenjeni *it* uspješno inhibiraju rast i angiogenezu solidnog oblika Ehrlichovog ascitesnog tumora te zaštitno djeluju na jetru i bubreg kroz antioksidacijsku i protuupalnu aktivnost.

(87 stranica, 25 slika, 7 tablica, 122 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

**Ključne riječi:** solidni tumor, resveratrol, nanokristali, angiogeneza, oksidacijski stres

**Mentor:** Prof. dr. sc. Nada Oršolić

**Neposredni voditelj:** Dyana Odeh, spec. techn. aliment.

**Ocjenjivači:** Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Izv. Prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Izv. Prof. Dr. sc. Sandra Radić Brkanac

**Rad prihvaćen:** 11. ožujka 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Graduation Thesis

Faculty of Science

Department of Biology

### EFFECT OF RESVERATROL AND ITS NANOCRYSTALS ON ANGIOGENESIS, OXIDATIVE STRESS AND PROLIFERATION OF SOLID TUMOR

Matea Tomašević

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The aim of this study was to investigate the effect of resveratrol and its nanocrystals at concentration of 50 mg/kg on the growth of angiogenetically-dependent, fast-growing Ehrlich solid tumor (EAT), oxidative stress and potential toxicity caused by accumulation of nanocrystals in the liver and the kidney of mice and macrophage polarization. The tumor was induced by subcutaneous (*sc*) injection of  $1 \times 10^6$  EAT cells into the thigh of Swiss albino mice. Treatment of animals with EAT started on day 1 of the experiment by intratumoral (*it*) injection of resveratrol or resveratrol nanocrystals at a dose of 50 mg/kg every other day for 14 days. The obtained results indicate that *it* administration of resveratrol or resveratrol nanocrystals has an anti-angiogenic and inhibitory effect on EAT growth in solid form. Reduced microvessel density in the liver and kidney tissue confirms the anti-angiogenic potential of resveratrol *in vivo*. Summarizing the results, we can conclude that resveratrol and its nanocrystals applied *it* successfully inhibit the growth and angiogenesis of a solid form of Ehrlich ascites tumor and have a protective effect on the liver and kidney through antioxidant and anti-inflammatory activity.

(87 pages, 25 figures, 7 tables, 122 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

**Keywords:** solid tumor, resveratrol, nanocrystals, angiogenesis, oxidative stress

**Supervisor:** PhD Nada Oršolić, Full Professor

**Assistant Supervisor:** Dyana Odeh, spec. techn. aliment.

**Reviewes:** PhD Nada Oršolić, Full Professor

PhD Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

PhD Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.

**Thesis accepted:** 11<sup>th</sup> of March, 2020

# SADRŽAJ

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....                                     | <b>1</b>  |
| <b>1.1. TUMOR</b> .....                                  | <b>3</b>  |
| 1.1.1. Općenito o tumoru.....                            | 3         |
| 1.1.2. Osnovne karakteristike i podjela tumora.....      | 3         |
| 1.1.3. Karcinogeneza.....                                | 6         |
| 1.1.4. Molekularna biologija tumora.....                 | 11        |
| 1.1.5. Imunologija tumora .....                          | 13        |
| <b>1.2. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDACIJSKI STRES</b> ..... | <b>15</b> |
| 1.2.1. Učinak oksidacijskog stresa na rast tumora.....   | 15        |
| 1.2.2. Antioksidacijski mehanizmi obrane .....           | 16        |
| <b>1.3. RESVERATROL</b> .....                            | <b>17</b> |
| 1.3.1. Antioksidacijsko djelovanje resveratrola.....     | 18        |
| 1.3.2. Antikancerogeno djelovanje resveratrola .....     | 19        |
| 1.3.3. Prepreke u kliničkoj upotrebi resveratrola.....   | 20        |
| <b>1.4. NANOTEHNOLOGIJA</b> .....                        | <b>21</b> |
| 1.4.1. Nanočestice resveratrola.....                     | 24        |
| 1.4.2. Toksičnost nanočestica .....                      | 25        |
| <b>1.5. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....                      | <b>26</b> |
| <b>2. MATERIJALI I METODE</b> .....                      | <b>27</b> |
| <b>2.1. MATERIJALI</b> .....                             | <b>27</b> |
| 2.1.1. Pokusne životinje .....                           | 27        |
| 2.1.2. Tumorske stanice.....                             | 27        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.1.3. Kemijski spojevi.....  | 28        |
| 2.1.4. Laboratorijska oprema.....   | 29        |
| <b>2.2. METODE</b> .....  | <b>29</b> |
| 2.2.1. Obrada životinja .....   | 29        |
| 2.2.2. Praćenje promjene tjelesne mase .....  | 30        |
| 2.2.3. Mjerenje volumena tumora.....  | 30        |
| 2.2.4. Određivanje parametara oksidacijskog stresa.....                               | 31        |
| 2.2.5. Analiza biokemijskih parametara.....   | 37        |
| 2.2.6. Mjerenje dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griess-u .....             | 38        |
| 2.2.7. Određivanje aktivnosti arginaze 1 .....  | 39        |
| 2.2.8. Histološke metode .....  | 40        |
| 2.2.9. Statistička obrada podataka .....  | 41        |
| <b>3. REZULTATI</b> .....   | <b>42</b> |
| <b>3.1. PROMJENA VOLUMENA TUMORA</b> .....  | <b>42</b> |
| <b>3.2. INHIBICIJA RASTA TUMORA</b> .....   | <b>44</b> |
| <b>3.3. PROMJENA TJELESNE MASE</b> .....  | <b>45</b> |
| <b>3.4. PROMJENA MASE UNUTARNJIH ORGANA</b> .....                                     | <b>46</b> |
| <b>3.5. PARAMETARI OKSIDACIJSKOG STRESA</b> .....                                     | <b>47</b> |
| 3.5.1. Ukupna koncentracija proteina u uzorcima tkiva jetre miševa .....              | 47        |
| 3.5.2. Mjerenje razine lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima tkiva jetre miševa..... | 48        |
| 3.5.3. Enzimski aktivnosti katalaze u uzorcima tkiva jetre miševa .....               | 49        |
| 3.5.4. Razina ukupnog glutationa u uzorcima tkiva jetre miševa .....                  | 50        |
| 3.5.5. Enzimski aktivnost superoksid dismutaze u uzorcima tkiva jetre miševa .....    | 50        |
| 3.5.6. Ukupna koncentracija proteina u uzorcima tkiva bubrega miševa .....            | 52        |
| 3.5.7. Razina lipidne peroksidacije u uzorcima tkiva bubrega miševa .....             | 53        |



|   |           |
|---|-----------|
| 3.5.8. Enzimski aktivnost katalaze u uzorcima tkiva bubrega miševa .....  | 54        |
| 3.5.9. Razina ukupnog glutationa u uzorcima tkiva bubrega miševa .....  | 55        |
| 3.5.10. Enzimski aktivnost superoksid dismutaze u uzorcima tkiva bubrega miševa .....                                   | 56        |
| <b>3.6. BIOKEMIJSKI PARAMETRI U SERUMU .....</b>  | <b>57</b> |
| <b>3.7. AKTIVNOST DUŠIKOVOG OKSIDA U UZORCIMA TKIVA BUBREGA MIŠEVA MJERENIH INDIREKTNOM METODOM PREMA GRIESS-U.....</b> | <b>60</b> |
| <b>3.8. ENZIMSKI AKTIVNOST ARGINAZE 1.....</b>  | <b>61</b> |
| <b>3.9. UČINAK NANOKRISTALA RESVERATROLA I RESVERATROLA NA ANGIOGENEZU.....</b>   | <b>62</b> |
| 3.9.1. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti tumora .....  | 62        |
| 3.9.2. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti jetre .....   | 64        |
| 3.9.3. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti bubrega.....  | 65        |
| <b>4. RASPRAVA .....</b>  | <b>66</b> |
| <b>5. ZAKLJUČAK .....</b>   | <b>76</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>  | <b>77</b> |

# 1.UVOD

Tumor predstavlja jednu od sve više prijetećih bolesti koja danas pogađa ljude svih dobnih skupina. Nakon kardiovaskularnih bolesti predstavlja drugi glavni uzrok smrtnosti svjetskog stanovništva (Oliveira i sur., 2007). Definira se kao višestupanjski proces tijekom kojeg stanice podliježu brojnim metaboličkim promjenama i promjenama u ponašanju koje ih vode ka proliferaciji na prekomjeren i nepravilan način, bijegu od nadzora imunološkog sustava te prodiranju u udaljena tkiva što u konačnici dovodi do formiranja metastaza (Merlo i sur., 2006). Tumorski mikrookoliš odgovoran je za pokretanje patološke angiogeneze okarakterizirane abnormalnom tumorskom vaskulaturom i izmijenjenim biološkim procesima u različitim fazama tumorske progresije (Hameed i sur., 2018). U ovakvim procesima često dolazi do poremećaja ravnoteže između slobodnih radikala nastalih kao normalan produkt staničnih procesa i reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) čije pretjerano nakupljanje i nemogućnost adekvatnog eliminiranja vrlo lako može izazvati oštećenja stanične strukture i funkcije te u konačnici inducirati nastanak somatskih mutacija i neoplastične transformacije (Reuter i sur., 2010).

Spojevi koji moduliraju ove onkogene procese smatraju se potencijalnim antikancerogenim spojevima, a posebnu pozornost znanstvene i zdravstvene zajednice privlače određeni spojevi iz prirode zbog svojih mogućih učinaka na bolesti uzrokovane upalom, uključujući i tumor. Njihovo bi korištenje u konačnici zaživjelo u kliničkoj primjeni te bi uvelike zamijenilo konvencionalne načine liječenja tumora kod kojih je često prisutan razvoj rezistencije na samu primjenu terapije (Ko i sur., 2017). Jedan od takvih spojeva je resveratrol (trans-3,4',5-trihidroksistilben), fitoaleksin i fitoestrogen iz porodice polifenola koji se u biljkama stvara kao odgovor na stresne uvjete. Nalazi se u brojnim namirnicama koje čovjek konzumira kao što su grožđe, kikiriki i bobice, a dokazano je kako posjeduje mnogostruka korisna svojstva: usporava starenje, djeluje protuupalno, antioksidativno te antikancerogeno. Nakon što je zabilježen njegov inhibički učinak na svaku od faza procesa karcinogeneze, brojna istraživanja koristeći *in vivo* i *in vitro* modele, prikazala su uključenost resveratrola u moduliranju signalnih puteva povezanih sa staničnim rastom i dijeljenjem, upalom, apoptozom, angiogenezom, invazijom i metastaziranjem (Whitlock i Baek, 2012; Carter i sur., 2014). Ipak, najveći problem za kliničku

primjenu ovog spoja predstavlja njegov brzi metabolizam koji je uzrok njegove ograničene *in vivo* bioraspoloživosti. Istraživači i farmaceutske kompanije stoga predlažu mogućnosti za poboljšanje njegove bioraspoloživosti, a jedna od njih je isporuka u obliku nanokristala (Singh i sur., 2015).

Primjena nanotehnologije u medicini ima nekoliko ključnih prednosti u odnosu na primjenu konvencionalnih terapija, a to je ciljana isporuka lijeka, bolja akumulacija, topljivost i stabilnost te poboljšana farmakokinetička svojstva lijeka. Davanje lijekova u obliku nanočestica ima potencijalno anti-angiogenetsko djelovanje i može se koristiti u dokidanju supresivnog učinka tumorskog mikrookoliša na imunosti sustav, a upravo istovremeno ciljanje i regulacija tumorskih stanica i njihovog pripadajućeg mikrookoliša nudi dodatno poboljšanje terapijskih ishoda (Hameed i sur., 2018).

Učinak resveratrola i njegovih nanokristala ispitat će se na solidnom obliku Erlichovog ascitesnog tumora (EAT), slabo diferenciranom i brzorastućem zloćudnom tumoru izvorno nastalom u miša, spontano iz mliječne žlijezde, a koji pokazuje sličnosti s humanim tumorima najosjetljivijima na kemoterapiju (tumor dojke) (Ozaslan i sur., 2011). Iako mehanizmi koji su osnova korisnih učinaka resveratrola nisu u potpunosti razjašnjeni, smatra se da su povezani s njegovom antioksidativnom aktivnošću za koju je dokazano da štiti tkivo jetre i bubrega od oštećenja uzrokovanih oksidacijskim stresom (Faghihzadeh i sur., 2015).

# 1.1. TUMOR

## 1.1.1. Općenito o tumoru

Prema definiciji tumor predstavlja abnormalnu nakupinu tkiva čiji rast nadmašuje rast normalnog tkiva te nije u skladu s njegovim rastom, a nastavlja nekontrolirano rasti i nakon uklanjanja stimulansa koji je izazvao rast. Prije se pod pojmom „tumor“ podrazumijevala oteklina ili otok koji nastaje u procesu upale, a danas se ovaj naziv upotrebljava u onkološkoj terminologiji gdje se još koriste sinonimi neoplazma (grč. *neos*-nov, *plasia*-rast) i neoplazija (lat. *neoplasia*,-ae, *f.*,- novotvorevina) koji označavaju patološku novotvorevinu ili novoizraslinu nastalu kao posljedica djelovanja različitih unutrašnjih i vanjskih čimbenika na organizam.

Tumor se najčešće sastoji od više staničnih tipova, a inicijalni rast i razvoj tumora ovisi o populaciji jednog tipa neoplastično izmijenjenih stanica koje potječu od jedne progenitorske stanice. Drugim riječima, za nastanak tumora dovoljna je jedna stanica čiji je rast i razvoj poremećen (unicelularno ili monoklonalno podrijetlo). Važno je napomenuti da tumorske stanice ne rastu brže od normalnih stanica nego je njihov rast samo nekontroliran. U osnovi, opće je prihvaćena definicija tumora da je to abnormalno, atipično, autonomno, progresivno i nesvrhisodno bujanje tkiva koje nema nikakvu fiziološku funkciju, a nastaje kada se naruše kontrolni regulatorni mehanizmi staničnog rasta i diobe.

## 1.1.2. Osnovne karakteristike i podjela tumora

Tumorske stanice se po mnogo čemu razlikuju od normalnih stanica. Prije svega su slabo ili nikako diferencirane te ih karakterizira abnormalna morfologija uz posjedovanje abnormalnih membrana i proteina. Morfološki je tumorska stanica okarakterizirana velikom istaknutom jezgrom nepravilne veličine i oblika te oskudnom vakuoliziranom citoplazmom koja je intenzivno obojena ili pak blijeda. Promjene stanične jezgre igraju veliku ulogu u određivanju zloćudnosti tumora, a tiču se same površine, volumena, oblika, gustoće, omjera jezgre i citoplazme kao i strukture te homogenosti. Ultrastrukturne karakteristike povezane su sa segmentacijom jezgre, invaginacijama, kromatinskim promjenama te stvaranjem inkluzija. Povećan broj mitozna očituje se u pojavi atipičnih oblika s oštećenjima u diobenom vretenu što

rezultira nesimetričnim strukturama i atipičnim kromosomskim formama. Isto tako, površina tumorskih stanica izražava antigene specifične za tumor, a koji se pojavljuju s onkogenom transformacijom koja je posljedica promjene genetskog programa stanice. Raspodjela staničnih receptora je također promijenjena što modificira obrazac stanične aglutinacije, a izgubivši kontaktnu inhibiciju tumorske stanice stječu metaboličku autonomiju pri čemu se favorizira njihova proliferacija i invazivni rast (Baba i Côté, 2007).

#### *Nekontrolirana proliferacija i rast*

Tumorska stanica ima karakteristike koje joj omogućuju abnormalnu proliferaciju te preživljenje znatno veće od prosječnog životnog vijeka stanice. Dosadašnja istraživanja utvrdila su zajedničke karakteristike takvih stanica, a koje su prisutne kod različitih tipova tumora. Zaštitne karakteristike tumorskih stanica uključuju neprestanu proliferativnu signalizaciju uz replikativnu besmrtnost, kontaktnu inhibiciju, povećanu invazivnu sposobnost, otpornost na staničnu smrt, induciranje angiogeneze te sposobnost metastaziranja. Daljnja istraživanja pridodala su u ove zaštitne tumorske karakteristike i izmijenjeni metabolizam, izbjegavanje imunološkog sustava domaćina, genomsku nestabilnost te upalu promoviranu tumorom (engl. *tumor-promoted inflammation*). Sve ove značajke zajedno su dio pokretačkog programa koji omogućuje stanicama tumora uspješno širenje i nekontrolirani rast (Barradas-Bautista i sur., 2018).

#### *Tumorski mikrookoliš*

Tumor ima sposobnost formiranja složene i heterogene sredine koja se sastoji od različitih tipova stanica koje proliferiraju, kao što su stanice tumora i stromalne stanice te izvanstanični matriks. Stroma normalnih tkiva djeluje kao potporna struktura organima. U tumorima se ova komponenta sastoji od vezivnog tkiva, krvnih i vjerojatno limfnih žila te je nužna za održavanje složenog tumorskog mikrookoliša i opskrbu tumora nutrijentima i ostalim bitnim tumorskim sastavnicama. Uvjeti unutar tumorskog mikrookoliša su vrlo specifični te ih karakterizira niski pH, niski nivo glukoze te "abnormalna" svojstva okolnih stanica kao rezultat blizine tumora, a koja pogoduju bržem daljnjem napredovanju tumorskih stanica. Tumorski mikrookoliš (engl. *tumor environment*) formiran je i kontroliran od strane samog tumora, ali se također sastoji i od tumorske strome, krvnih žila, upalnih stanica i drugih pripadajućih stanica kao što su fibroblasti povezani s tumorom te vaskularne i limfatičke endotelne stanice. Definira

se kao heterogena mješavina različitih tipova stanica (tumorskih i stanica domaćina) koje su stekle neka od najvažnijih tumorskih obilježja i imaju sposobnost induciranja angiogeneze, hipoksije, proliferacije uz inhibiciju apoptoze te sposobnost bijega od imunološkog sustava popraćenog invazivnim rastom i metastaziranjem (Casey i sur., 2015).

Osim već spomenute potporne strome, tumor se sastoji i od parenhima koji je građen od promijenjenih (neoplastičnih) stanica po kojem tumor dobiva ime i prema kojemu se određuje njegovo biološko ponašanje. Tumori se prema svom biološkom ponašanju dijele u tri glavne skupine: dobroćudne, zloćudne i granične tumore. Dobroćudni ili benigni tumori ostaju ograničeni na mjestu na kojem su nastali, rastu ekspanzivno te se ne šire na udaljena mjesta u organizmu. Zloćudni ili maligni tumori pak mogu prodrijeti u okolna normalna tkiva i proširiti se organizmom putem cirkulacijskog ili limfnog sustava. Njihova bitna karakteristika je probijanje bazalne membrane te se samo maligni tumori pravilno nazivaju rakom ili karcinomom pri čemu ih njihova sposobnost invazije i metastaziranja čini vrlo opasnima. Granični, semimaligni ili atipično proliferirajući tumor ima niski maligni potencijal i ponekad ga je teško razlikovati od zloćudnog tumora niskog histološkog gradusa.

I benigni i maligni tumori klasificiraju se prema vrsti stanice iz koje nastaju. Većina malignih tumora spada u jednu od tri glavne skupine: karcinomi, sarkomi i leukemije ili limfomi. Karcinomi, koji uključuju otprilike 90% svih poznatih ljudskih malignih tumora, su maligni tumori epitelnih stanica. Sarkomi su solidni tumori vezivnog tkiva koji uključuju kosti, mišiće, hrskavicu i fibrozno tkivo te je njihova pojavnost kod ljudi niska. Leukemije i limfomi, koji predstavljaju otprilike 8% ljudskih malignih oboljenja, nastaju iz krvotvornih ili imunoloških stanica. Tumori se dalje klasificiraju prema tkivu iz kojeg su originalno nastali (npr. karcinom pluća ili dojke) i vrsti zahvaćenih stanica (npr. fibrosarkomi nastaju iz fibroblasta, a eritroidne leukemije iz prekursora eritrocita) (Cooper, 2000).

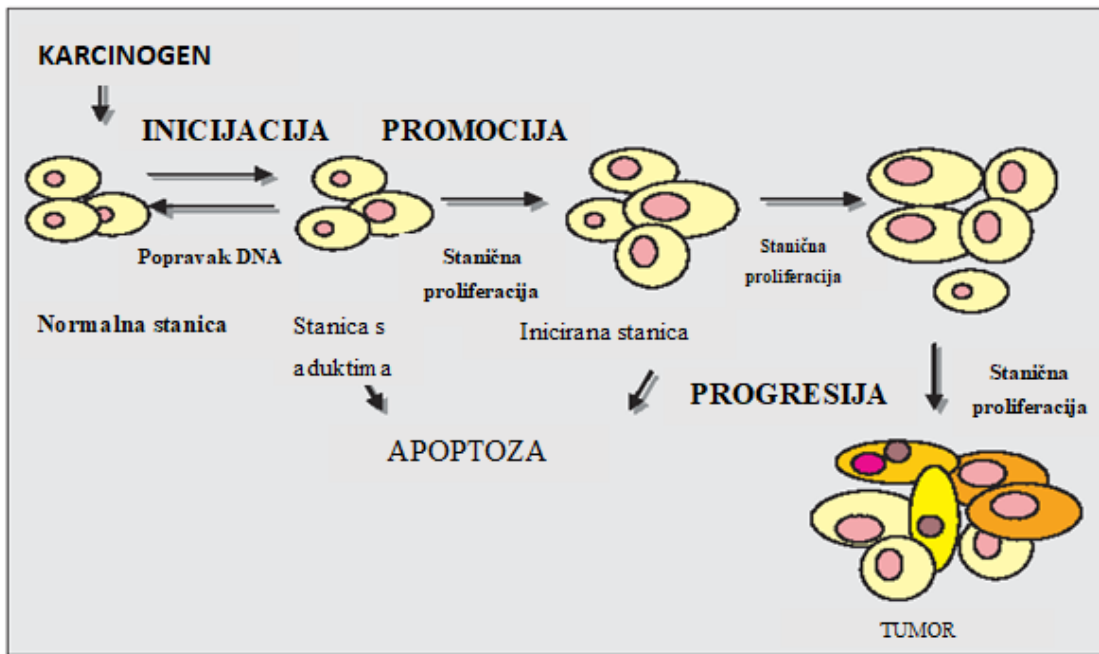
### 1.1.3. Karcinogeneza

Iako je većina tumora povezana sa starijom životom dobi, nijedna dobna skupina nije isključena za ovu bolest. Razvoj tumora kreće iz naših vlastitih stanica, a većem riziku mogu doprinijeti unutarnji i vanjski čimbenici koji utječu na svakodnevni život. Dok tumor kao takav nije zarazan, neke infekcije (npr. infekcija HPV virusom) mogu biti poticaj za nastanak tumora. Isto tako, okolišni zagađivači poput kemikalija, otpadnih voda te neki terapijski lijekovi i mutagena sredstva, uključujući ionizirajuće zračenje, mogu povećati učestalost pojave tumora. Pojava oko 50% svih poznatih vrsta tumora pripisuje se načinu života uključujući prehrambene navike, konzumiranje duhana i alkohola te izloženost industrijskim toksinima (Devi, 2004). Bez obzira na uzrok, razvoj tumora je proces u više faza koji uključuje oštećenje u genetskom materijalu stanice, prvenstveno u genima koji reguliraju normalan rast i diobu stanica, a obično je potrebno duže latentno razdoblje prije nego se tumor pojavi.

Pretvorba normalnih stanica u maligne stanice tumora događa se u procesu koji nazivamo karcinogeneza. Karcinogeneza je višestupanjski proces u kojem promjene u tkivnoj arhitekturi i stvaranje preneoplastičnih čvorova prethode pojavi tumora, a proizlaze iz akumulacije učestalih modifikacija u genetičkim mehanizmima koji kontroliraju staničnu proliferaciju i životni vijek te odnose sa susjednim stanicama. Ove promjene povezane su s promjenama u staničnom fenotipu koje uključuju epitelno mezenhimalnu tranziciju (EMT) i staničnu migraciju što rezultira područjima lokalne hipoksije koja promoviraju preživljenje i rast tkivnih matičnih stanica kao i nastanak novog krvožilja. Dok su rast i preživljavanje normalnih stanica pod djelomičnom kontrolom čimbenika rasta i hormona, promjene u signalnim putevima koje su posljedica mutacija i/ili epigenetskih promjena čine stanice otpornima i neovisnima o tim putevima (Feitelson i sur., 2015). Takve promjene potiču preživljenje i rast kako konstitutivno stimuliranim signalnim putevima koji favoriziraju proliferaciju tako i inhibicijom i/ili nadjačavanjem apoptotskih puteva (Hanahan i Weinberg, 2011).

Istraživanja provedena pomoću životinjskih modela, *in vitro* istraživanja i epidemioloških testova pokazala su da je karcinogeneza složen proces koji se može podijeliti u tri različite faze, a to su inicijacija, promocija i progresija (Slika 1). Inicijacija je brz i ireverzibilan fenomen, a njezin neophodan dio je stanična proliferacija; ako se stanična dioba događa prije nego što

sustavi za popravak DNA mogu djelovati, ozljeda ostaje trajna i nepovratna. Ova faza predstavlja aditivni proces budući da neoplazični razvoj ovisi o dozi kancerogenog spoja; povećavanje doze povećava učestalost i raznovrsnost nastalih neoplazija te smanjuje latentno razdoblje njihove pojavnosti. Promocija je pak reverzibilna faza gdje nakon prestanka djelovanja promotora može doći do regresije u proliferaciji stanica i to vjerojatno procesom apoptoze. Promotor mora biti prisutan tjednima, mjesecima i godinama kako bi bio učinkovit, a njegova učinkovitost ovisi o njegovoj koncentraciji u ciljnom tkivu. Promotorski spojevi ne stupaju izravno u međureakciju s DNA. Takva sredstva povećavaju proliferaciju stanica u osjetljivim tkivima, potiču gensku ekspresiju i ulazak u stanični ciklus. Fazu progresije karakteriziraju ireverzibilnost, genetska nestabilnost, brži rast, invazija, sposobnost metastaziranja te promjene u biokemijskim, metaboličkim i morfološkim karakteristikama stanica (Oliveira i sur., 2007). U toj fazi zbivaju se sukcesivne promjene neoplazme koje dovode do stvaranja sve većeg broja populacija malignih stanica. Molekularni mehanizmi progresije tumora nisu u potpunosti objašnjeni, ali se smatra da uključuju mutacije i kromosomske aberacije (Devi, 2004).



**Slika 1.** Faze karcinogeneze (Preuzeto i prilagođeno prema Sutandyo, 2010).



#### 1.1.3.1. Rast tumora

Stanice tumora mogu rasti samo ako im njihov okoliš pruža okruženje koje može pogodovati njihovom rastu i invaziji te im omogućiti bijeg s izvornog (primarni tumor) na udaljeno mjesto uz izbjegavanje domaćinove imunološki kontrolirane cirkulacije. Stoga se bilo kakva složena međureakcija događa na granici između samog tumora i njegovog mikrookoliša te strome zbog primjerice kronične infekcije, upale ili bilo kakvog karcinogenog stimulansa favorizira napredovanje karcinogeneze u smjeru širenja tzv. tumorskog čvora. Bitan čimbenik koji pogoduje tumorskoj proliferaciji i zaštiti od imunološkog uništenja je uspostava odgovarajuće krvne opskrbe putem angiogeneze (Goubran i sur., 2014). Heterogenost tumorskih stanica je važna karakteristika progresije tumora, a ona uključuje varijante antigenih i proteinskih produkata, sposobnost stvaranja čimbenika angiogeneze, razvoj metastatskih sposobnosti te promijenjeni metabolizam (Malarkey i sur., 2013).

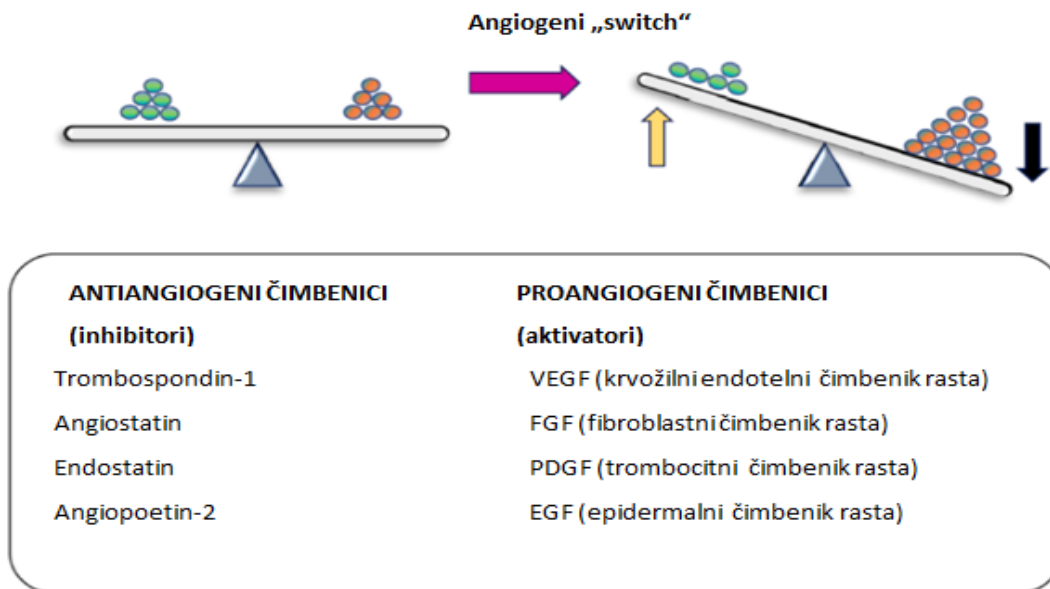
#### 1.1.3.2. Tumorska angiogeneza

Tumorske stanice kao i ostale stanice u organizmu zahtijevaju odgovarajuću prehrambenu podršku, izmjenu plinova te izvor raznih metabolita za rast i razvoj. Taj se doprinos osigurava velikim dijelom putem cirkulacije kroz krvne žile koje također služe kao ulaz i izlaz imunoloških i ostalih cirkulirajućih stanica porijeklom iz koštane srži. Velika potreba tumorskih stanica za hranom i kisikom stoga uzrokuje pojavu visoke stope angiogeneze u samom tumoru (Gao i sur., 2014).

Angiogeneza se definira kao proces koji uključuje formiranje novih krvnih žila iz postojećih žila. Predstavlja vrlo reguliran proces koji se normalno odvija tijekom ljudskog rasta i razvoja, reprodukcije i zacijeljivanja rana te je uspostavljanje funkcionalnog krvožilja općenito važno za održavanje tkivne homeostaze (Nussenbaum i Herman, 2010). Krvne žile predstavljaju složenu mrežu koja ponajprije ovisi o ravnoteži čimbenika rasta i raznih krvožilnih i nekrvožilnih staničnih komponenata. Važno je uzeti u obzir činjenicu da u tumorskom tkivu dolazi do narušavanja ravnoteže ovih komponenti što doprinosi razvijanju strukturalno i funkcionalno drugačijeg tumorskog krvožilja koje ima ključnu ulogu u tumorskoj progresiji, invazivnom rastu i metastaziranju (Dimova i sur., 2014). Tumorski angiogeni fenotip (tzv. angiogeni "switch") smatra se bitnom karakteristikom malignog procesa pri čemu proangiogeni

mehanizmi nadvladavaju ili zaobilaze negativne regulatore angiogeneze, odnosno dolazi do narušavanja homeostatske ravnoteže proangiogenih i anti-angiogenih čimbenika (Slika 2). Općenito, povećana vaskularizacija tumora i tumorska ekspresija proangiogenih čimbenika povezuje se s uznapredovalim stadijem tumora te lošijom prognozom (Hicklin i Ellis, 2005).

Proces tumorske angiogeneze započinje otpuštanjem molekula od strane tumorskih stanica koje šalju signale okolnom normalnom tkivu domaćina, aktivirajući određene gene za stvaranje proteina koji potiču rast novih krvnih žila. Ključni događaji cjelokupnog procesa su vazodilatacija kao odgovor na prisustvo dušik-oksida (NO) uz pojačanu propusnost krvnih žila zbog djelovanja krvožilnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF), proteolitička razgradnja bazalne membrane roditeljskih krvnih žila uz pomoć matriks metaloproteinaza (MMP), migracija i invazija endotelnih stanica prema angiogenom stimulatoru, njihova proliferacija i sazrijevanje koje uključuje inhibiciju rasta i remodeliranje te mobilizacija periendotelnih stanica potrebnih za stabilnost novostvorenih žila (Yadav i sur., 2015).



**Slika 2.** Regulacija angiogeneze – anti-angiogeni (žuta strelica) i proangiogeni čimbenici (crna strelica) (Preuzeto i prilagođeno prema Hida i sur., 2018).

### 1.1.3.3. Invazivni rast i metastaziranje

Kod određivanja prognoze oboljelih od tumora od primarne je važnosti slijed događaja koji vode napredovanju tumorske invazije i metastaziranju, odnosno procesu širenja tumorskih stanica iz primarnog mjesta nastanka (primarni tumor) na tkiva i organe drugdje u organizmu (sekundarni tumor) koje se u većini slučajeva smatra glavnim uzrokom visoke stope smrtnosti kod oboljelih. Okidač za tumorsko metastaziranje je prekomjerna ekspresija angiogenih čimbenika u tumorskom mikrookolišu koja doprinosi lakšem izlasku tumorskih stanica putem krvnih i limfnih žila (Fukumura i sur., 2018).

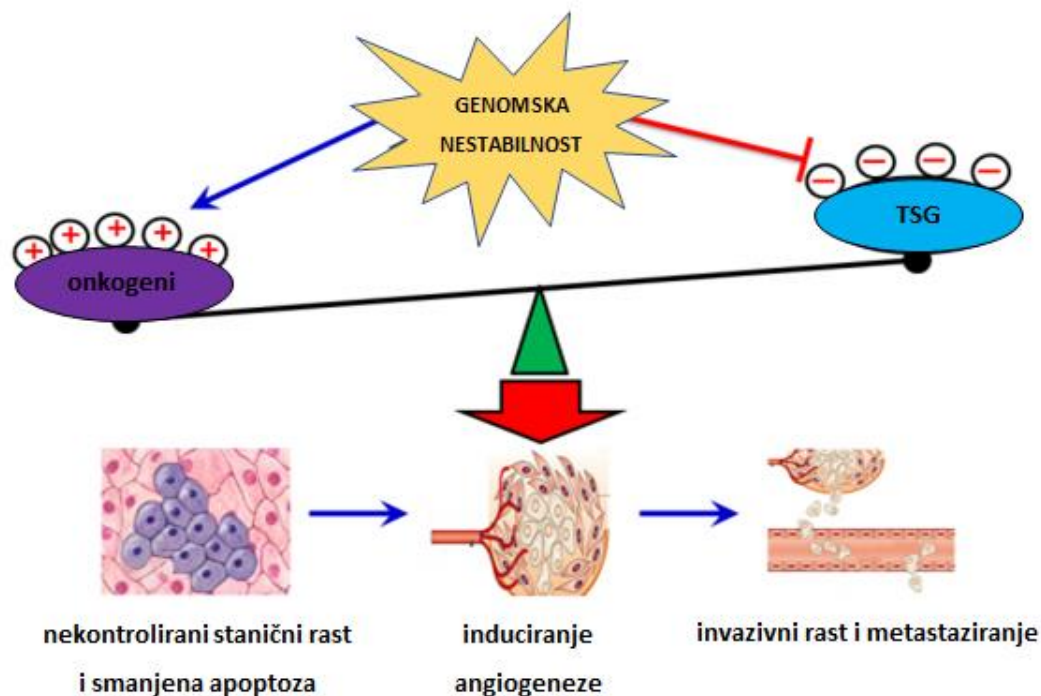
Tijek metastaziranja tumora uključuje niz stadija koji dovode do stvaranja sekundarnih tumora. Metastatska kaskada ovisi prvenstveno o gubitku adhezije među stanicama što rezultira disocijacijom stanica od primarnog tumora, a potom i sposobnošću stanice da postigne pokretni fenotip kroz promjene u međureakciji stanice - matriks. Jednom kada tumorske stanice steknu sposobnost prodiranja u okolna tkiva, pokreće se proces invazije tijekom kojeg pokretne stanice prolaze kroz bazalnu membranu i izvanstanični matriks. U procesu intravazacije, stanice prodiru u limfni ili krvožilni cirkulaciju, a zatim u procesu ekstravazacije putuju kroz krvožilni sustav invadirajući krvožilnu bazalnu membranu i izvanstanični matriks kako bi u konačnici stigle do novog mjesta, nastavile proliferaciju te započele stvaranje sekundarnog tumora (Bielenberg i Zetter, 2015).

#### 1.1.4. Molekularna biologija tumora

Transformacija normalnih stanica u maligne zahtijeva uzastopno stjecanje mutacija koje nastaju kao posljedica oštećenja genoma koja mogu biti rezultat endogenih procesa kao što su pogreške u replikaciji DNA, intrinzične kemijske nestabilnosti pojedinih DNA baza ili napad slobodnih radikala koji nastaju tijekom metabolizma. Također, ona može biti i rezultat međureakcije s egzogenim sredstvima kao što su ionizirajuće zračenje, UV zračenje i kemijski karcinogeni. Stanice su razvile mehanizme popravka oštećenja, ali budući da su pogreške u takvim mehanizmima moguće, mogu se javiti stalne promjene u genomu koje nazivamo mutacijama. Za pretvaranje oštećenja u nasljedne promjene DNA (mutacije) nužni događaji su replikacija DNA i naknadna podjela stanica. Stoga je proliferacija ključan čimbenik u stvaranju mutacija i širenju klonova stanica. Zbog ravnoteže i višestrukih provjera koje postoje u matičnim stanicama kako bi se ograničila neprimjerena proliferacija, maligne ljudske stanice moraju akumulirati višestruke mutacije u ključnim genima koje će omogućiti njihovu autonomnu replikaciju i invaziju (Bertram, 2000). Specifične promjene u slijedu tumorskog genoma dovode do nestabilnosti takvih gena, a i za epigenetičke mehanizme, kao što su metilacija DNA i histonska modifikacija se također pretpostavlja da promoviraju karcinogenezu mijenjanjem genske aktivnosti (Slika 3).

Geni povezani s tumorom svrstavaju se u dvije klase koje imaju suprotne učinke na normalnu proliferaciju stanica te suprotne načine promjena u tumorskim stanicama. Prva klasa tzv. "tumor-supresorskih gena" obično potiskuje stanični rast te je inaktivna u tumoru dok onkogeni, koji normalno stimuliraju rast stanica, u tumoru imaju hiperaktivno djelovanje (Weir i sur., 2004). Onkogeni su izmijenjeni normalni geni (protoonkogeni) koji nadziru i prvenstveno potiču stanični rast. Njihove mutacije izravno i trajno mijenjaju molekularne puteve nadzora staničnog rasta i diobe (npr. unutarstanični prijenos signala). Aktivacija, odnosno pretvorba protoonkogeni u onkogen, općenito uključuje stjecanje funkcionalne mutacije uslijed točkastih promjena (npr. zbog djelovanja kemijskih karcinogena), genetskih amplifikacija (npr. povećan broj kopija inače normalnog gena) ili translokacija (gen seli na drugo mjesto koje je pod kontrolom novog promotora). Tumor - supresorski geni smatraju se drugom vrstom presudnih gena koji sudjeluju u popravku oštećenja DNA, inhibiciji stanične diobe, indukciji apoptoze i supresiji formiranja metastaza te gubitak njihove funkcije rezultira nastankom i napredovanjem tumora. Prethodna

istraživanja pokazala su da je kod većine jedna kopija tumor-supresorskih gena dovoljna za kontrolu proliferacije stanica te stoga za razvoj tumora oba alela ovih gena moraju biti trajno inaktivirana ili izgubljena (Wang i sur., 2018). Inaktivacija tumor - supresorskih gena često je posljedica gubitka heterozigotnosti povezane s mutacijom, točkastim mutacijama i djelovanjem epigenetičkih mehanizama (Weir i sur., 2004).

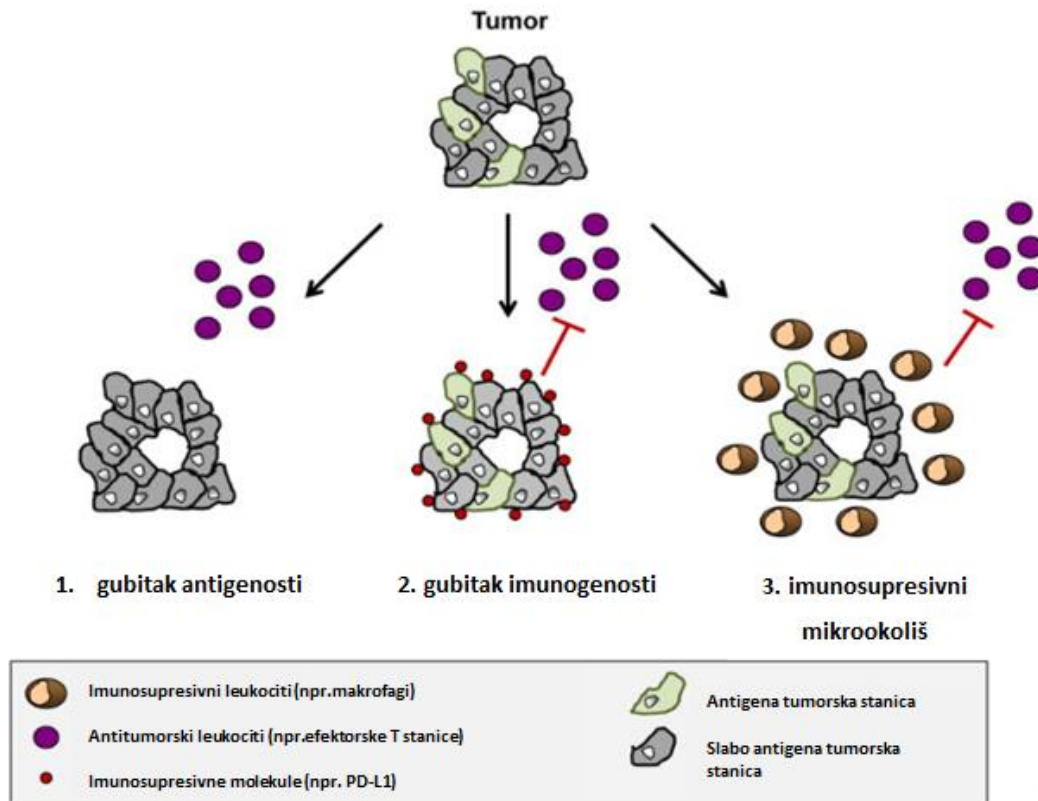


**Slika 3.** Onkogeni, tumor - supresorski geni (TSG) i tumor. Genomska nestabilnost uzrokovana različitim čimbenicima kao što su primjerice virusi, citotoksični lijekovi i ionizirajuće zračenje pokreće mutacije u onkogenima ili tumor-supresorskim genima te doprinosi razvoju malignosti nestabilnog genoma. Pored mutacija, druge genetičke promjene odgovorne za aktivaciju onkogeni uključuju amplifikaciju (egfr, mdm2, myc), translokaciju (bcr/abl), prekomjernu ekspresiju proteina (MDM2, Ras) i povećanu proteinsku stabilnost (Ras). Promjene koje dovode do inaktivacije TSG uključuju mutacije gubitka funkcije (Rb, p53) i delecije (p53, DCC). Epigenetske promjene poput metilacije promotora također mogu dovesti do inaktivacije TSG (IL-2R $\gamma$ ) (Preuzeto i prilagođeno prema Nag i sur., 2015).

### 1.1.5. Imunologija tumora

Imunosni odgovor, uključujući prepoznavanje antigena specifičnih za tumor, posebno je zanimljivo područje tumorske imunologije. Urođeni i stečeni imunološki sustav funkcionira na način da prepoznaje "vlastito" i "tuđe", a genskom rekombinacijom praktički nema ograničenja u broju antigena koje može prepoznati. Mutacijski događaji, translokacije i ostale genske abnormalnosti unutar tumora dovele su do nastanka koncepta da ne samo da je imunološki sustav sposoban identificirati tuđe već i da može prepoznati "izmijenjeno vlastito" u okruženju razvoja tumora (Dunn i sur., 2004). Naime, pokazano je da imunološki sustav može prepoznati antigene promjene u stanicama tumora te razviti protutijela protiv takvih staničnih antigena koje obično nazivamo tumor - pridruženim antigenima (engl. *tumor - associated antigens*, TAA) (Zhang i sur., 2014). Činjenica da su primarna i stečena imunodeficijencija (npr. HIV infekcija) kod miševa i ljudi povezana s većom osjetljivošću na razvoj tumora, potvrdila je postojanje imunološkog nadzora (engl. *immune surveillance*) unatoč kojem tumor nastavlja rasti i u organizmima s intaktnim imunološkim sustavom.

Proces pomoću kojeg imunološki sustav eliminira i oblikuje malignu bolest naziva se imunomodulacija, a sastoji se od tri faze (Fouad i Aanei, 2017). Prva faza eliminacije predstavlja zaštitni znak koncepta imunološkog nadzora tumora pri čemu je ključno kooperativno djelovanje urođenog i stečenog imunološkog odgovora. Urođeni imunološki odgovor prepoznaje tumorske stanice i ograničeno ih ubija dok stečeni imunološki odgovor kao najjače oružje koristi sazrijevanje i migraciju antigen predočnih stanica te stvaranje T limfocita specifičnih za tumorski antigen uz aktivaciju citotoksičnih mehanizama (Dunn i sur., 2002). Nakon toga slijedi najdulja faza, faza ravnoteže koja uključuje oblikovanje tumorskih stanica i odabir onih sa smanjenom imunogenošću, a pojavljuju se i nove varijante s različitim mutacijama koje povećavaju otpornost na imunološki pritisak. Unatoč stanicama tumora koje prolaze kroz pritisak imunološkog nadzora, pojavljuju se tumorski klonovi koji podliježu bijegu od imunološkog nadzora što je posljednja faza tumorske imunomodulacije (Slika 4). Tijekom faze bijega, varijante tumora koje mogu izbjeći otkrivanje i eliminaciju od strane imunološkog sustava putem genetičkih i epigenetičkih mehanizama nekontrolirano rastu i u konačnici formiraju klinički detektibilan tumor (Fouad i Aanei, 2017).



**Slika 4.** Klinički detektibilni tumori moraju razviti mehanizme za izbjegavanje imunološke eliminacije. Tijekom tog procesa nastale transformirane stanice mogu biti odabrane na temelju gubitka antigenosti (1.) i/ili gubitka imunogenosti (2.). Gubitak antigenosti postiže se nakupljanjem oštećenja u procesu obrade i predočavanja antigena ili gubitkom imunogenih tumorskih antigena što dovodi do nedostatka imunogenih peptida predstavljenih u peptid / MHC kompleksu. Iako je gubitak antigenosti povezan i s gubitkom imunogenosti, maligne stanice mogu steći dodatna imunosupresivna svojstva poput ekspresije PD-L1 ili izlučivanja supresivnih citokina (npr. IL-10, TGF- $\beta$ ) što dodatno smanjuje njihovu imunogenost. Tumori također mogu izbjeći imunološki sustav uspostavljanjem imunosupresivnog mikrookoliša (3.). Maligna transformacija inducirana promjenama u onkogenima i tumor-supresorskim genima može dovesti do pokretanja imunološkog odgovora koji suprimira antitumorsku imunost (Preuzeto i prilagođeno prema Beatty i Gladney, 2015).

## 1.2. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDACIJSKI STRES

Oksidacijski stres je definiran kao neravnoteža između proizvodnje slobodnih radikala i reaktivnih metabolita, tzv. oksidansa ili reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i njihovog uklanjanja putem zaštitnih antioksidacijskih mehanizama. Takva neravnoteža dovodi do oštećenja važnih biomolekula i stanica s potencijalnim učinkom na cjelokupan organizam (Durackova, 2010).

ROS i ostale vrste slobodnih radikala stvaraju se u organizmu najvećim dijelom tijekom normalnog metabolizma, ali i u reakciji s vanjskim toksičnim spojevima i to u mitohondrijima. Nastaju kao nusproizvodi staničnog aerobnog metabolizma te kod izloženosti organizma stresu, UV svjetlu ili X-zrakama (Mittler i sur., 2011). Isto tako igraju važnu ulogu u staničnoj signalizaciji, regulaciji djelovanja citokina, čimbenika rasta i hormona, transkripciji, transportu iona, neuromodulaciji, imunomodulaciji i apoptozi (Gloire i sur., 2006). Slobodni radikali su okarakterizirani kao kemijski reaktivne molekule budući da njihova reaktivnost proizlazi iz toga što sadrže jedan ili više nesparenih elektrona, a najznačajniji za nastanak oksidacijskog stresa su superoksidni anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksilni radikal ( $HO^{\cdot}$ ) te vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) (Birben i sur., 2012). Zbog takvih posebnih kemijskih svojstava, ROS može inicirati lipidnu peroksidaciju, oštećenja DNA te neselektivno oksidirati gotovo sve molekule bioloških membrana i tkiva što rezultira ozljedom (Birben i sur., 2012). Proteini, lipidi i nukleinske kiseline su posebno značajne mete oksidacijskog stresa, a modifikacija ovih biomolekula povećava rizik od mutageneze.

### 1.2.1. Učinak oksidacijskog stresa na rast tumora

Kada se slobodni radikali povećano stvaraju tijekom dužeg perioda što je posebno karakteristično prilikom izlaganja organizma raznim stresnim okolišnim situacijama, može doći do značajnijeg oštećenja stanične strukture i funkcije te induciranja somatskih mutacija i neoplastične transformacije. Tako je pokazano da su tumorska inicijacija i progresija povezani s oksidacijskim stresom putem genomske nestabilnosti, povećane stanične proliferacije i povećanja oštećenja DNA kroz nakupljanje mutacija (Visconti i Grieco, 2009).



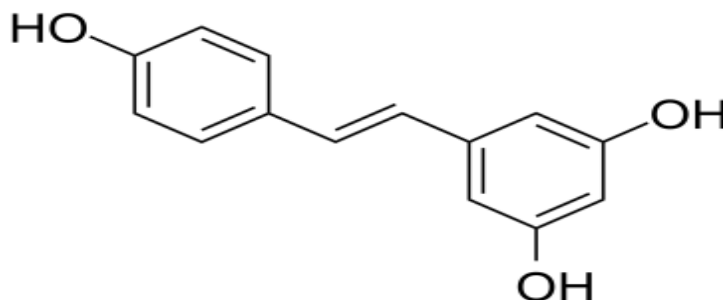
Nakon maligne transformacije mnoge tumorske stanice pokazuju kontinuirano povećanje unutarnjeg stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta što održava onkogeni fenotip i potiče tumorsku progresiju te su povišene razine ovih reaktivnih metabolita otkrivene u gotovo svim poznatim tumorima. Visoka razina ROS-a u tumorskim stanicama može biti rezultat povećane metaboličke aktivnosti, disfunkcije mitohondrija uslijed hipoksije, aktivnosti peroksisoma, opetovane signalizacije staničnih receptora, onkogene aktivnosti kao i pojačane aktivnosti oksidaza, ciklooksigenaza i lipooksigenaza uključenih u stvaranje većine poznatih slobodnih radikala te rezultat križnih veza s infiltrirajućim imunološkim stanicama (Liou i Storz, 2010).

### **1.2.2. Antioksidacijski mehanizmi obrane**

Stanice moraju održavati homeostazu ograničavanjem djelovanja slobodnih radikala, a to čine putem antioksidacijskih mehanizama za neutralizaciju ROS-a i ublažavanje oksidacijskog stresa (Gill i sur., 2016). One su sposobne sintetizirati vlastite obrambene molekule koje uključuju neproteinski glutation i antioksidacijske enzime poput superoksid dismutaze, katalaze, glutation reduktaze, glutation peroksidaze i glutation-S-transferaze. Ova linija obrane uklanja ROS i prije nego što može stići do ciljnih molekula u stanici i izazvati njihova oštećenja te na taj način služe kao biološki čuvari u zaštiti protiv oštećenja, mutacija i kromosomskih aberacija izazvanih slobodnim radikalima. I mnogi dijetalni sastojci poput zelenog povrća, voća, čaja, začina i nekih dodataka prehrani sadrže antioksidanse. Najznačajniji su vitamini A, C i E, beta-karoten, alfa-tokoferol, askorbinska kiselina, flavonoidi i likopeni koji djeluju kemopreventivno u uklanjanju slobodnih radikala i poboljšanju stanične obrane kroz svoja adaptogena svojstva (Devi, 2004). U posljednje vrijeme sve se više spominje važnost određenih polifenolnih spojeva koji pomažu u antioksidacijskim mehanizmima obrane, a jedan od najistraživanijih je resveratrol.

### 1.3. RESVERATROL

Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben) je prirodni polifenolni spoj ubrojen u skupinu tvari poznatih kao fitoaleksini koji su po svojoj prirodi sekundarni metaboliti male molekularne mase, a biljke ih stvaraju kao obrambeni odgovor na djelovanje mikroba, gljivične infekcije ili okolišni stres (Yu i sur., 2002). Pronađen je u mnogim biljnim vrstama uključujući grožđe, bobice i kikiriki, a u značajnim količinama prisutan je u vinu, posebice crnom. Njegova stilbenska strutura povezana je sa strukturom sintetskog estrogena dietilstilbestrola pa se zato ubraja i u fitoestrogene (Alarco´ n de la Lastra i Villegas, 2007). Prekursor resveratrola je fenilalanin, a ključni stanični enzim je stilben sintetaza koja usmjerava put sinteze prema resveratrolu umjesto prema flavonoidima pa se zato resveratrol može klasificirati kao stilben ili kao ne-flavonoidni polifenol (Lanz i sur., 1991). Ovaj spoj u prirodi postoji u *trans*- i *cis*-izomernoj formi, a smatra se kako je *trans* forma daleko prisutnija i biološki aktivnija (Slika 5).



**Slika 5.** Kemijska struktura resveratrola (3,4',5-trihidroksistilben u klasičnoj nomenklaturi), *trans*- izomerna forma (Preuzeto sa: <https://www.medchemexpress.com/Resveratrol.html>).

Baš kao i mnogi drugi biljni polifenoli, resveratrol se smatra preventivnom mikrokomponentom hrane poput primjerice flavonoida i epikatehina u zelenom čaju ili kakau (Kris-Etherton i Keen, 2002). Resveratrol posjeduje širok spektar bioloških svojstava, među kojima su najznačajnija antioksidacijsko, kardioprotektivno, neuroprotektivno, protuupalno i

antikancerogeno (Duarte i sur., 2015). Uz to, pokazano je kako sudjeluje u produljenju životnog vijeka te općenito usporavanju procesa starenja (Howitz i sur., 2003), a zbog svojih estrogen - mimetičkih svojstava može sudjelovati u zaštiti žena od osteoporoze (Bagchi i sur., 2001). Dosadašnja istraživanja pokazala su kako se kod glodavaca i kod ljudi *trans*-resveratrol nakon unosa oralnim putem brzo apsorbira i brzo metabolizira i to bez štetnih učinaka, a farmakokinetička i farmakodinamička istraživanja pokazala su da su glavni ciljni organi djelovanja resveratrola jetra i bubrezi (Vitrac i sur., 2003). Iako mehanizmi koji su osnova korisnih učinaka resveratrola nisu u potpunosti razjašnjeni, smatra se da su povezani s njegovom antioksidacijskom aktivnošću za koju je dokazano da štiti tkivo jetre i bubrega od oštećenja uzrokovanih oksidacijskim stresom (Faghihzadeh i sur., 2015).

### **1.3.1. Antioksidacijsko djelovanje resveratrola**

Antioksidacijsko djelovanje resveratrola rezultira iz njegove strukture te ovisi prvenstveno o rasporedu prisutnih funkcionalnih skupina. Zbog toga, konfiguracija, supstitucija i ukupan broj hidroksilnih skupina značajno utječu na glavne mehanizme njegove antioksidacijske aktivnosti (Stivala i sur., 2001). Antioksidacijska svojstva polifenola uglavnom ovise o redoks svojstvima hidroksilnih skupina u fenolnim dijelovima i potencijalu delokalizacije elektrona preko njihove kemijske strukture. U strukturi resveratrola postoje dva fenolna prstena: monofenol i difenol, dok se apstrakcija vodikovog atoma iz monofenolne hidroksilne skupine odvija prilično lako. Tri hidroksilne skupine koje resveratrol posjeduje imaju važnu ulogu u uklanjanju slobodnih radikala s obzirom da je pokazano kako se antioksidacijsko djelovanje povećava s brojem –OH skupina. Hidroksilne skupine pomažu resveratrolu i u keliranju metalnih iona što je također važno svojstvo u prevenciji nastanka ROS-a (Gülçin, 2010). Resveratrol se također može upotrijebiti za smanjenje ili sprečavanje oksidacije lipida u farmaceutskim proizvodima, sprečavanje stvaranja toksičnih oksidacijskih produkata te održavanje prehrabene kvalitete i produljenje roka trajanja lijekova (Bhullar i Hubbard, 2015).

Nedavna istraživanja otkrila su kako resveratrol djeluje povoljno na suzbijanje oksidacijskog stresa te ima hepatoprotektivni učinak protiv akutnog i kroničnog oštećenja jetre glodavaca. S obzirom da je dokazana uključenost oksidacijskog stresa u nastanku karcinoma

jetre, dijetalni antioksidans resveratrol mogao bi predstavljati potencijalno zaštitno sredstvo u borbi protiv istog (Sanchez-Perez i sur., 2005).

Do danas je utvrđena i zanimljiva korelacija između prooksidacijskih i citotoksičnih aktivnosti dijetalnih polifenola kao što je resveratrol. Budući da je svaki antioksidans ujedno i redoks sredstvo, resveratrol može postati prooksidans, ubrzavajući peroksidaciju lipida i / ili izazivajući oštećenja DNA u posebnim uvjetima. Na taj način predloženo je da takvo prooksidacijsko djelovanje predstavlja važan mehanizam u podlozi antikancerogenih i apoptotičkih svojstava resveratrola (De la Lastra i Villegas, 2007).

### **1.3.2. Antikancerogeno djelovanje resveratrola**

Unatoč obećavajućoj učinkovitosti resveratrola u sprječavanju rasta tumora u nekoliko istraživanja *in vitro*, točan mehanizam njegova antiproliferativnog djelovanja se još uvijek istražuje. To je tako prvenstveno zbog činjenice da maligne stanice pokazuju izrazitu deregulaciju signalnih puteva koja za posljedicu ima nekontroliranu proliferaciju stanica, inhibiciju programirane stanične smrti, pojačanu angiogenezu i nekontroliranu migraciju stanica. Dostupna literatura sugerira da resveratrol u tumoru djeluje putem više mehanizama, uključujući proapoptotske, antiproliferativne, protuupalne i anti-angiogenetske mehanizme pa kažemo da je njegovo antikancerogeno djelovanje pleiotropne prirode budući da su molekularne mete njegova djelovanja različite (Singh i sur., 2015).

Još 1997. godine Jang i sur. izvijestili su o sposobnosti resveratrola da inhibira karcinogenezu u svakoj njenoj fazi (inicijaciji, promociji, progresiji). Na molekularnoj razini resveratrol inhibira proliferaciju širokog spektra ljudskih tumorskih stanica i to primjerice kod limfoidnih i mijeloidnih karcinoma, multiplog mijeloma, karcinoma vrata maternice, dojke, jajnika, prostate, želuca, debelog crijeva, gušterače i štitnjače te melanoma (Aggarwal i sur., 2004). Antikancerogeno djelovanje resveratrola posredovano je putem pleiotropnih učinaka gdje resveratrol djeluje na nekoliko važnih signalnih puteva od kojih su najznačajniji NF- $\kappa$ B, p53, PI3K/Akt i MAPK signalni put što rezultira zaustavljanjem staničnog ciklusa, inhibicijom proliferacije tumorskih stanica, indukcijom apoptoze i diferencijacije, smanjenjem upale i angiogeneze te inhibicijom adhezije, invazivnog rasta i metastaziranja (Kundu i Surh, 2008).

Jedno od ohrabrujućih gledišta njegova antikancerogenog djelovanja i sukladno s tim razvoja lijeka protiv tumora je što ne izaziva toksične nuspojave u usporedbi s tradicionalnim kemoterapijskim liječenjem. U istraživanjima sa životinjama korišten je širok raspon doza resveratrola gdje je primjerice pokazano da kod štakora doza od 750 mg/kg tjelesne težine dnevno nema nikakvih toksičnih učinaka (Williams i sur., 2009). Mukherjee i sur. (2010) istražili su učinke resveratrola ovisne o dozi u odnosu na zdravstvene dobrobiti (istraživanja na životinjama i na ljudima) te sugerirali kako niže doze resveratrola mogu biti vrlo korisne u održavanju zdravlja čovjeka, dok su veće doze poželjne za ubijanje tumorskih stanica putem proapoptičkih mehanizama.

Zbog izrazito brzog metabolizma resveratrola u njegove metabolite, njegova neosporna djelotvornost utvrđena u nekoliko istraživanja *in vitro* i *in vivo* navodi neke istraživače da vjeruju kako metaboliti resveratrola imaju svoju biološku aktivnost koja se razlikuje od aktivnosti slobodnog resveratrola. Primjerice, postoji nekoliko pokazatelja kako metaboliti resveratrola, a posebice resveratrol 3-sulfat, također mogu imati značajne kemopreventivne učinke. Zbog toga se smatra kako su opaženi antiproliferativni učinci resveratrola posljedica kombinacije djelovanja resveratrola i upravo njegovih metabolita (Hoshino i sur., 2010).

### **1.3.3. Prepreke u kliničkoj upotrebi resveratrola**

Iako su *in vitro* i eksperimentalni podaci na životinjama izrazito obećavajući za sve navedene pozitivne učinke resveratrola, postoje neke prepreke koje ograničavaju njegovu kliničku upotrebu. Prije svega resveratrol pokazuje vrlo nisku topljivost u vodi (0,02–0,03 mg/mL) (Amri i sur., 2012). Također je vrlo osjetljiv na razgradnju izlaganjem kisiku, svjetlu, temperaturi i djelovanju oksidacijskih enzima gdje u takvim okolnostima može izomerizirati u manje biološki aktivnu *cis*- formu (Davidov-Pardo i McClements, 2015). Ipak, jedan od glavnih problema je njegova ograničena bioraspoloživost jer se metabolički eliminira iz tijela izuzetno brzo da je uopće teško održavati terapijski relevantnu razinu u krvotoku (Walle, 2011). Niska bioraspoloživost resveratrola je svakako čimbenik koji utječe na njegovu smanjenu učinkovitost. Iako istraživanja *in vitro* pokazuju visoku učinkovitost u biološki povoljnim učincima resveratrola u stanicama, poznato je kako je njegova raspodjela u tkivima vrlo niska. Stoga se

istraživanja *in vitro* moraju tumačiti s oprezom kada se pokušava ekstrapolirati učinak ovog spoja u istraživanjima *in vivo* (Gambini i sur., 2015).

Do danas su ostvareni veliki napori u usporavanju metabolizma resveratrola kako bi se omogućila veća izloženost stanicama i tkivu te u skladu s tim veća učinkovitost. U tom su smjeru predloženi brojni načini za poboljšanje biorasploživosti resveratrola koji uključuju kombinacije s prirodnim spojevima koji mogu inhibirati metabolizam resveratrola *in vivo*, upotrebu prirodnih ili sintetskih analoga resveratrola kao i primjenu njegovih konjugiranih metabolita te isporuku posredovanu nanočesticama (Ndiaye i sur., 2011).

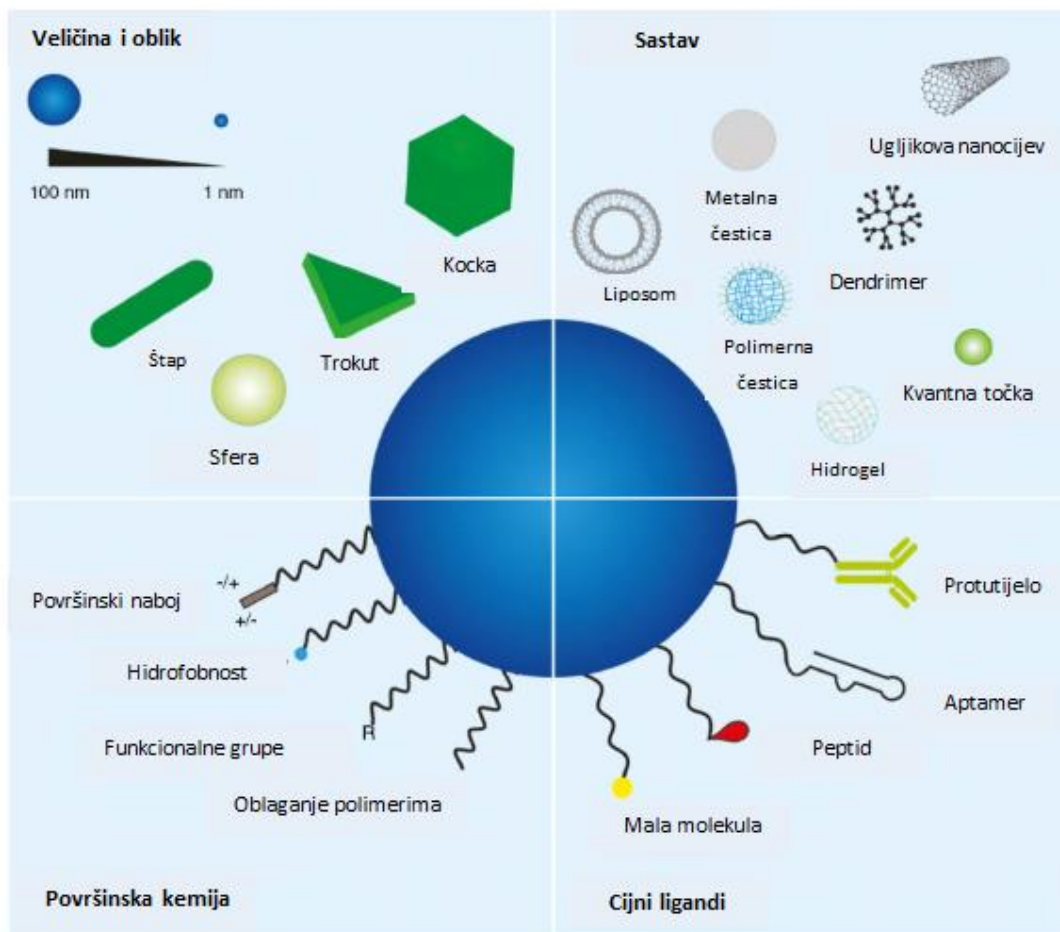
## 1.4. NANOTEHNOLOGIJA

Budući da konvencionalni pripravci poput otopina, suspenzija ili emulzija imaju ograničenja u vidu kliničkog korištenja koja uključuju primjenu visokih doza uz nisku biorasploživost, moguću netoleranciju i nestabilnost gdje su pokazane značajne promjene u razini lijeka u plazmi koje ne daju trajni učinak, postojala je potreba za novim rješenjima koja bi ispunila potrebe idealnog sustava isporuke lijeka. Jedno od rješenja krije se u nanotehnologiji, multidisciplinarnom znanstvenom području koje primjenjuje inženjerske i proizvodne principe na molekularnoj razini. Primjenom nanotehnologije u medicini stvorene su nanočestice koje oponašaju ili mijenjaju određene biološke procese (Singh i Lillard, 2009), a interes znanstvene i medicinske zajednice privukle su s obzirom na sposobnost unosa lijeka u optimalnom rasponu doziranja koja rezultira povećanom terapijskom učinkovitošću lijeka, smanjenjem nuspojava te povećanom neotpornošću pacijenta na primjenu istog (Alexis i sur., 2008).

Nanočestice su čvrste koloidne čestice čija veličina promjera varira od 10 do 1000 nm, no za nanomedicinsku primjenu preferencijalna veličina je  $< 200$  nm (Biswas i sur., 2014). Važnost čestica u ovom rasponu je u tome što mogu imati različita i poboljšana svojstva u usporedbi s istim materijalom u većoj veličini budući da je učinkovitost sustava za isporuku lijekova direktno ovisna o veličini čestica. Zbog svoje male veličine i velike površine, nanočestice lijeka pokazuju povećanu topljivost i time poboljšanu biorasploživost uz dodatnu sposobnost prelaska krvno moždane barijere, ulaska u plućni sustav i apsorbiranja kroz čvrste spojeve endotelnih stanica

kože (Kohane, 2007). Uz poboljšanu bioraspodjeljivost povećanjem topljivosti u vodi, ključne prednosti nanočestica su povećana akumulacija (produljenje vremena poluraspada) te usmjeravanje lijeka na određeno mjesto u tijelu (mjesto djelovanja). To sve rezultira istodobnim smanjenjem količine potrebnog lijeka i toksičnosti doze što omogućava sigurnu isporuku toksičnih terapijskih lijekova te zaštitu neciljanih stanica i tkiva od mogućih ozbiljnih nuspojava (Irving, 2007).

Idealan sustav za dostavu lijekova s nanočesticama (Slika 6) trebao bi moći prepoznati, vezati i dostaviti svoj teret (liječak) specifičnim patološkim tkivima te umanjiti ili izbjeći oštećenja na zdravim tkivima (Friedman i sur., 2013). Fizikalno - kemijska i biološka svojstva nanočestica stoga se mogu prilagoditi manipulacijom njihovih kemijskih svojstava, veličine, oblika, strukture, morfologije i površinskih svojstava gdje je strategija konjugacije molekule lijeka i modifikacije površine vrlo bitna za učinkovitu isporuku lijeka. Što se tiče konjugacije, molekule lijeka mogu se apsorbirati ili kovalentno vezati na površinu nanonosaa, a i unutarnja jezgra ima sposobnost ugradnje molekule lijeka. Najčešća strategija koja se koristi u modificiranju površine nanočestica je oblaganje specifičnim ciljnim ligandima koji mogu biti u obliku malih molekula, peptida, protutijela, dizajniranih proteina i aptamera nukleinskih kiselina, a isto tako se koriste hidrofilni i/ili hidrofobni polimeri poput polietilen glikola (PEG) i poli( $\epsilon$ -kaprolakton)-a (PCL). Mehanizmi ciljanja dalje omogućavaju aktivan ili pasivan prijenos nanočestica, gdje potonji promiče učinke povećane propusnosti i zadržavanja unutar ciljnog područja (Panzarini i sur., 2013; Xia, 2014).



**Slika 6.** Dizajn nanočestica za isporuku lijeka. Multifunkcionalne nanočestice mogu se dobiti iz materijala različitih sastava i funkcija, a za kombiniranje terapijskih sredstava sa česticama koriste se različite strategije (Preuzeto i prilagođeno prema Seleci i sur., 2016).

Manipulacijom molekularne veličine i površinskih svojstava istraživači su u mogućnosti isporučiti lijek s većom preciznošću i prodiranjem u teško dostupna tkiva uz manje učestalo doziranje (produženo otpuštanje) u dužem vremenskom razdoblju. Nanotehnologija se stoga pokazala korisnom kod liječenja tumora, AIDS-a i mnogih drugih bolesti, a također omogućava mogućnost napretka u dijagnostičkim testiranjima (Rizvi i Saleh, 2018). Kada govorimo o liječenju tumora, uspješna primjena nanomedicine ima nekoliko ključnih prednosti u odnosu na konvencionalne terapije, a to su ciljana i bolje regulirana isporuka lijeka, bolja akumulacija u samom tumoru te poboljšana farmakokinetička svojstva lijeka. Takva vrsta isporuke lijeka ima i



potencijalno anti-angiogenetsko djelovanje te može koristiti u dokidanju supresivnog tumorskog mikrookoliša na imunosne stanice, a upravo istovremeno ciljanje i regulacija tumorskih stanica i njihovog pripadajućeg mikrookoliša nudi dodatno poboljšanje terapijskih ishoda (Hameed i sur., 2018).

### **1.4.1. Nanočestice resveratrola**

Nanotehnologija predstavlja vrijedan pristup poboljšanju učinkovitosti konvencionalnih antikancerogenih sredstava kao i onih prirodnih sintetiziranih u biljkama, posebno slabo topljivih polifenola koji u svom slobodnom obliku zahtijevaju unos visokih koncentracija za induciranje *in vivo* terapijske aktivnosti (Siddiqui i sur., 2015 ; Bonferoni i sur., 2017). Uz svoju slabu topljivost u vodi, polifenol kao što je resveratrol ima vrlo brz metabolizam i prema tome nisku bioraspoloživost koja uvelike sprječava njegovu isporuku u optimalnim koncentracijama u ciljano tkivo. U tom smislu, enkapsulacija ili konjugacija sa strukturama nanometarske veličine omogućava zaštitu i održavanje strukturne cjelovitosti polifenolnih spojeva, kao i njihovu povećanu topljivost u vodi (Zu i sur., 2016 ; Juèere i sur., 2017). Uz nadogradnju fizikalno-kemijskih svojstava, specijalizirani nanonosai zaduženi za prijenos polifenolnih spojeva prema ciljanim stanicama pridonose povećanju njihove bioraspoloživosti i u konačnici biološke aktivnosti.

Do danas su mnoga istraživanja provedena na različitim staničnim linijama i tumorskim stanicama istaknula terapijski potencijal resveratrola u različitim nanoformulacijama, a rezultati većine njih doveli su do istih zaključaka. Naime, korištenjem različitih vrsta nanočestica postignuta je stabilizacija *trans* izomera zahvaljujući zaštiti resveratrola od UV zraka, poboljšana bioraspoloživost zbog povećane topljivosti u vodi te je postignuto zadovoljavajuće opterećenje nanočestica resveratrolom, a u skladu s time, poboljšane su antioksidacijske i antikancerogene aktivnosti zbog viših koncentracija resveratrola bliže terapijskih meta (Summerlin i sur., 2015). Ovome u prilog ide i činjenica da postoji sve više dokaza kako je resveratrol u formulaciji nanočestica zaštićen od metabolizma tijekom probavnog procesa što u konačnici povećava njegovu tkivnu apsorpciju u životinjskim modelima (Singh i Pai, 2014).

Od svih danas poznatih nanoformulacija, forma nanokristala predstavlja najjednostavniji sustav s puno manjim troškovima izrade kojeg karakterizira korištenje učinkovitije veličine čestica uz veći kapacitet unosa, manja pojavnost nuspojava te mogućnost unosa na više načina što ih čini više korištenim i svestranijim nanosustavom (Singh i sur., 2017). Točnije, 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. Iz tih razloga, u ovom istraživanju su korišteni upravo nanokristali resveratrola.

#### **1.4.2. Toksičnost nanočestica**

Fizičko - kemijska svojstva nanočestica utječu na njihovu međureakciju sa stanicama i, na taj način, na njihovu potencijalnu toksičnost. Nedavna istraživanja su započela s prepoznavanjem svojstava koja nanočestice čine otrovnijima od drugih. Teoretski gledano, veličina čestice vjerojatno će pridonijeti citotoksičnosti. S obzirom na istu masu, manje nanočestice imaju veće specifično površinsko područje (SSA) i na taj način više dostupne površine za međureakciju sa staničnim komponentama kao što su nukleinske kiseline, proteini, masne kiseline i ugljikohidrati. Manja veličina također omogućava jednostavniji ulazak u stanicu, uzrokujući stanično oštećenje. Za neke nanočestice utvrđeno je da je toksičnost funkcija veličine i SSA pri čemu su nanočestice toksičnije za ljudsko zdravlje u usporedbi s većim česticama iste kemijske tvari, a obično se sugerira kako je toksičnost obrnuto proporcionalna veličini nanočestica (Yang i Watts, 2005; Jiang i sur., 2008; Mostafalou i sur., 2013). Zbog male veličine, nanočestice mogu ući u stanice fagocitozom i drugim mehanizmima koji uključuju pasivni unos ili adhezivne međureakcije posredovane Van der Waalsovima silama, steričkim međureakcijama i elektrostatičkim nabojima (Geiser i sur., 2005; Peters i sur., 2006). Njihov unos se tako može dogoditi čak i ako nema specifičnih staničnih receptora i pridruženih substaničnih struktura. Ovisno o njihovoj unutarstaničnoj lokalizaciji, nanočestice mogu doprinijeti i nastanku oksidacijskog stresa ili oštećenju DNA, a pokazano je kako mogu sudjelovati u moduliranju imunskog odgovora (Zolnik i sur., 2010).

## **1.5. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja je istražiti učinak intratumoralno primijenjenog resveratrola i njegovih nanokristala u dozi od 50 mg/kg na rast angiogenetski-ovisnog, brzo rastućeg Ehrlichovog solidnog tumora, oksidacijski stres i potencijalnu toksičnost nastalu nakupljanjem nanokristala u jetri i bubregu miševa te polarizaciju makrofaga.

## **2. MATERIJALI I METODE**

### **2.1. MATERIJALI**

#### **2.1.1. Pokusne životinje**

Istraživanje je provedeno na visokosrodnim Swiss albino miševima iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Miševi su bili 2-3 mjeseca starosti, mase 20-25 g. Ukupno 30 mužjaka bilo je podijeljeno u 3 skupine po 10 životinja i to prema načinu obrade (otopina resveratrola i njegovih nanokristala). Hranjeni su standardnom hranom za laboratorijske životinje (4RF 21 Mucedola S.R.L., Italija) uz stalnu dostupnost vode. Uvjeti su bili standardni i uključivali su dnevni ritam od 12 sati svjetla i 12 sati mraka te temperaturu od 24 °C uz kontroliranu vlažnost zraka.

Istraživanje je provedeno u skladu s etičkim principima koji su važeći 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 Publ. (NIH) # 86–23 1985).

#### **2.1.2. Tumorske stanice**

Ehrlichov ascitesni tumor (EAT) izvorno se javlja u miša kao spontani karcinom mliječne žlijezde. To je po prirodi slabo diferencirani, heterogeni, brzorastući zloćudni tumor sačinjen od populacija stanica različite osjetljivosti. U ovom istraživanju miševima je subkutano (*sc*) u bedro bilo injicirano  $1 \times 10^6$  stanica EAT za formiranje solidnog EAT tumora.

## 2.1.3. Kemijski spojevi

### 2.1.3.1. Resveratrol

Otopina resveratrola pripravljena je otapanjem resveratrola (Evolva SA, Švicarska) u pročišćenoj vodi uz dodatak dimetil sulfoksida (DMSO) koristeći najmanju moguću količinu DMSO (16 mg/mL) u svrhu povećanja njegove topljivosti. Otopina resveratrola primijenjena je intratumoralno (*it*) u dozi od 50 mg/kg.

### 2.1.3.2. Nanokristali resveratrola

Nanokristali resveratrola pripremljeni su na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pomoću modificirane metode prema Romero i sur. (2016) koja predstavlja metodu mljevenja u minijaturnom mjerilu (engl. *top-down approach*).

Za dobivanje nanokristala pripravljena je 5%-na suspenzija resveratrola (w/w) i 1% stabilizatora Pluronic F127 proizvođača Sigma-Aldrich, SAD. Suspenzija je nadalje podvrgnuta mljevenju u minijaturnom mjerilu i to u okrugloj bočici dimenzija 12 × 35 mm koja sadržava pet cilindričnih magneta dimezija 10 x 6 mm. Kao medij za mljevenje suspenzije korištena je smjesa kuglica cirkonijevog oksida stabiliziranog itrijem različitih veličina (0,1 mm; 0,2 mm i 0,4 - 0,6 mm) pomiješanih u jednakim omjerima, a za postupak mljevenja korištena je mješalica Magnetic stirrer MIX 15 eco, Berlin, Njemačka. Pripremljena suspenzija nanokristala resveratrola primijenjena je *it* u dozi od 50 mg/kg.

## 2.1.4. Laboratorijska oprema

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

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

Mikrotitarski čitač Microplate reader Model 550 (proizvođač: Bio-Rad, SAD) i Ao Absorbance Microplate Reader (proizvođač: Azure Biosystems, SAD)

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

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

Homogenizator: Sonopuls mini (proizvođač: Bandelin, Njemačka)

VetScan® VS2 uređaj (Abaxis, UK)

## 2.2. METODE

### 2.2.1. Obrada životinja

Pokusne životinje su prije injiciranja stanica EAT i nakon početnog vaganja podijeljene u tri skupine po 10 životinja te je u njih subkutano (*sc*) injicirano  $1 \times 10^6$  stanica EAT što označava 0. dan pokusa. Obrada životinja s EAT tumorom po skupinama započeta je idućeg dana (1. dan pokusa) intratumoralnim (*it*) injiciranjem resveratrola u dozi od 50 mg/kg i nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Kontrolna skupina obrađena je *it* s fiziološkom otopinom (Tablica 1). Doza od 50 mg/kg izabrana je prema literaturnim podacima (Carter i sur., 2015; Kim i sur., 2017; Alobaedi i sur., 2017; Davatgaran-Taghipour i sur., 2017). Životinje su žrtvovane nakon 15 dana od njihove obrade. Životinje su adekvatno anestezirane i analgezirane intraperitonealnom (*ip*) primjenom kombinacije Narketana® (Vetoquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska) i Xylapana® (Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska). Nakon toga prikupljeni su uzorci krvi, organa (jetre, bubrega) i tkiva tumora za daljnju analizu.

**Tablica 1.** Pokusne skupine životinja i način obrade

| <b>Miševi nositelji EAT u solidnom obliku (1x10<sup>6</sup>, sc)</b> |   |
|--|---|
| <b>SKUPINA</b>   | <b>OBRADA</b>                                 |
| Kontrola   | Fiziološka otopina                            |
| Nanokristali resveratrola 50 mg/kg, <i>it</i>                        | 50 mg/kg suspenzija nanokristala resveratrola |
| Resveratrol 50 mg/kg, <i>it</i>                                      | 50 mg/kg otopina resveratrola (otapalo DMSO)  |

## 2.2.2. Praćenje promjene tjelesne mase

Prije početka izvođenja pokusa, kao i tijekom izvođenja pokusa, životinje su pojedinačno označene i izvagane te su na temelju toga razvrstane u skupine s približno sličnom tjelesnom masom ( $\pm 3$  g). 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 su izvršena pomoću digitalne vage.

### 2.2.2.1. Relativni indeks mase organa

Relativna masa organa (izražena u g/100 g) izračunata je prema sljedećoj formuli:

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

### 2.2.3. Mjerenje volumena tumora

Procjena rasta tumora i učinaka resveratrola kao i njegovih kristala na razini cjelokupnog organizma mjerena je kaliperom. Mjerenje volumena tumora provedeno je kaliperom gdje je:

$$\text{Volumen tumora} = \frac{\text{širina tumora}^2 \times \text{dužina tumora}}{2}$$

Iz dobivenih podataka izračunat je % inhibicije rasta tumora (%TVI) prema formuli:

%TVI

$$= \frac{(\text{sred. vrijed. vol. tumora u kontroli} - \text{sred. vrijed. vol. tumora u pokusnoj grupi}) \times 100}{\text{sred. vrijed. vol. tumora u kontroli}}$$

## 2.2.4. Određivanje parametara oksidacijskog stresa

### 2.2.4.1. Izolacija i priprema tkiva

Izolirana tkiva (bubrezi, jetra, tumor) pohranjena su na -80 °C do pripreme za analizu. Tjedan dana nakon pohrane, odvagano je između 75 - 100 mg svakog organa u Eppendorf epruvetu gdje je dodano fosfatnog pufera (PBS) u omjeru 1:10. Uzorci su potom homogenizirani ultrazvučnim homogenizatorom te su dobiveni homogenati centrifugirani na 15000 okretaja kroz 15 min na 4 °C. Nakon centrifugiranja odvojen je nadtalog te su tako pripremljeni uzorci bili pohranjeni na -20 °C do daljnjih analiza.

### 2.2.4.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u

Koncentracija proteina određena je metodom po Lowry-u. Uzorci tkiva jetre razrijeđeni su 40x, a tkiva bubrega 10x. U epruvetu je stavljeno 100 µL uzorka i 2 mL otopine D (Tablica 2) te je izvršena inkubacija od 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodano je 200 µL otopine E (Tablica 2) te su uzorci vorteksirani i stavljeni na inkubaciju u mraku u trajanju od 30 min. Na spektrofotometru izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 600 nm. Kao standard je korišten albumin goveđeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*, BSA) pomoću kojeg je priređena serija otopina proteina poznate koncentracije (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625 mg/mL). Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA određen je nagib pravca. Preko nagiba pravca izračunata je koncentracija proteina (izražena kao mg proteina/mL) u uzorcima prema formuli:

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



**Tablica 2.** Priprema otopina za određivanje proteina po Lowry-u

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

#### 2.2.4.3. Mjerenje razine lipidne peroksidacije

Modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar i sur. (2007) određena je razina lipidne peroksidacije u tkivima jetre i bubrega. U metodi se mjeri koncentracija jednog od glavnih produkata lipidne peroksidacije - malondialdehid (MDA) koji u organizmu nastaje kada reaktivni kisikovi spojevi razgrađuju višestruko nezasićene masne kiseline. 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)<sub>2</sub> kompleks. Reakcija se odvija pri visokoj temperaturi (95 °C) i u kiselim uvjetima pri čemu nastaje crveni fluorescentni kompleks MDA-(TBA)<sub>2</sub> čija se koncentracija mjeri spektrofotometrijski 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 1,6 mL prethodno pripremljenog reagensa A (Tablica 3). Stalak s epruvetama je zatim bio umotan u aluminijsku foliju i stavljen u vodenu kupelj 60 min na 95 °C. Nakon provedene inkubacije, stalak s epruvetama je stavljen na led 10

min kako bi se uzorci naglo ohladili te potom centrifugirali na 15000 rpm 5 min pri 4 °C. Na taj način su se folikule koje su nastale miješanjem uzorka i reagensa A slegnule na dno. Supernatant je odvojen u kivetu i spektrofotometrijski je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 532 nm. Ukupna koncentracija MDA (izražena kao nmol MDA/mg proteina) izračunata je pomoću ekstinkcijskog koeficijenta za MDA ( $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) prema sljedećoj formuli:

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

**Tablica 3.** Priprema otopina za određivanje MDA

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

#### 2.2.4.4. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze

Spektrofotometrijskom metodom po Aebiju (1984) aktivnost katalaze (CAT) određuje se kao količina potrošenog vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ). Za određivanje katalaze korištena su razrjeđenja tkiva jetre i bubrega od 40x. U kivetu volumena 1 mL dodano je 20  $\mu$ L uzorka i 980  $\mu$ L prethodno pripremljenog 10 mM  $H_2O_2$  (113  $\mu$ L 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:

$$CAT = \frac{A_{uzorka}}{\varepsilon (H_2O_2) \times l} \times \text{razrjeđenje}$$

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

#### 2.2.4.5. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa

Prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze (1969) određena je količina ukupnog glutationa u uzorcima tkiva jetre i bubrega. Princip metode zasniva se na tome da sulfhidrilna grupa GSH reagira sa tiolnim reagensom 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) pri čemu nastaje žuto obojeni kromofor (5-tionitrobenzojeva kiselina (TNB)). Porast apsorbancije mjeri se pri valnoj duljini od 412 nm. Osim nastalog 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 proporcionalna koncentraciji GSH u uzorku. U ovoj metodi sav oksidirani GSH (disulfid GSSG) brzo se reducira do GSH. Konačan rezultat odgovara ukupnoj koncentraciji oksidiranog i reduciranog GSH u uzorku.

Mjerenje koncentracije ukupnog GSH provedeno je u mikrotitarskoj pločici korištenjem razrjeđenja 40x za uzorke jetre i 10x za uzorke bubrega. U svaku pojedinu jažicu dodano je 20  $\mu$ L uzorka, 40  $\mu$ L 0,035 M HCl i 40  $\mu$ L 10 mM DTNB (Tablica 4). Pločica se zatim inkubira 10 min na sobnoj temperaturi te se izmjeri apsorbancija na valnoj duljini od 415 nm. Nakon toga dodano je 100  $\mu$ L reakcijske smjese B te se apsorbancija mjeri tijekom 5 min. Za sve standarde

nacrtani su pravci kao promjena apsorbancije u vremenu. Nagibi pravca su očitani te je nacrtan pravac kao ovisnost nagiba pravca o koncentraciji GSH. Taj dobiveni pravac korišten je za dobivanje koncentracije ukupnog GSH (izražena kao  $\mu\text{M}$  GSH po mL proteina) prema formuli:

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

**Tablica 4.** Priprema otopina za određivanje koncentracije ukupnog glutaciona

| Otopine                             | Način pripreme   |
|-------------------------------------|--|
| <b>0,035 M HCl</b>                  | 7 mL 0,1 M HCl + 193 mL dH <sub>2</sub> O  |
| <b>0,5 M (50 mM) pufer PBS</b>      | 17 mL 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (3 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O do 17 mL dH <sub>2</sub> O) + 183 mL 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O (65,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O do 183 mL dH <sub>2</sub> O) |
| <b>0,5 M EDTA</b>                   | 37,2 g EDTA u 200 mL dH <sub>2</sub> O   |
| <b>0,5 M pufer PBS s 0,5 M EDTA</b> | 200 mL 0,5 M PBS + 200 mL 0,5 M EDTA   |
| <b>Reakc. smjesa A (10 mM DTNB)</b> | 20 mg DTNB + do 5 mL 0,5 M pufer PBS s 0,5 M EDTA  |
| <b>Reakc. smjesa B</b>              | 9980 $\mu\text{L}$ 0,8 mM NADPH* + 20 $\mu\text{L}$ glutation reduktaze<br>* 0,8 mM NADPH (6,67 mg NADPH + do 10 mL 0,5 M pufer PBS s 0,5 M EDTA)  |

#### 2.2.4.6. Određivanje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze

Prema metodi koju su opisali Flohé i Otting (1984) određena je aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u uzorcima. Metoda se temelji na inhibiciji redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza (XOD). SOD je metaloenzim koji katalizira dismutaciju dvaju superoksidnih radikala ( $O_2^-$ ) u  $H_2O_2$  i  $O_2$ .

U metodi su korištene dvije slijepa probe. Prva slijepa proba sadržavala je samo 1,45 mL reakcijske otopine A (Tablica 5). Druga slijepa proba koristila se za podešavanje enzimske aktivnosti XOD, a ta aktivnost treba biti oko 0,025 U/min. Druga slijepa proba se sastojala od 1,45 mL reakcijske otopine A, 25  $\mu$ L PBS i reakcijske otopine B u početnom volumenu od 25  $\mu$ L (Tablica 5). Spektrofotometrijski je izmjerena apsorbancija slijepih probi kao i uzoraka na valnoj duljini od 550 nm tijekom 3 min. Uzorci su analizirani nakon što se postigla optimalna aktivnost SOD. U svaku reakcijsku smjesu, umjesto pufera, dodano je 25  $\mu$ L uzorka i odgovarajući volumen XOD te je spektrofotometrijski izmjerena apsorbancija. Za određivanje aktivnosti SOD prvo je izračunat postotak inhibicije aktivnosti XOD prema formuli:

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

Iz % inhibicije izračunata je 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) izračunata je 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 5.** Priprema otopina za određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

| Otopine                     | Način pripreme  |
|-----------------------------|---|
| 50 mM PBS                   | 17 mL (1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u 50 mL $\text{dH}_2\text{O}$ ) i 183 mL (5,678 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ u 200 mL $\text{dH}_2\text{O}$ ), namjestiti pH na 7,8 te nadopuniti do 800 mL $\text{dH}_2\text{O}$ |
| 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA     | 3,72 mg EDTA u 100 mL 50 mM PBS   |
| <b>Reakcijska otopina A</b> | citokrom c 0,05 mM (29 mg citokroma c u 190 mL 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA) i ksantin 1 mM (3 mg ksantina u 19,74 mL 1 mM NaOH)   |
| <b>Reakcijska otopina B</b> | 40 $\mu\text{L}$ ksantin oksidaze i 960 $\mu\text{L}$ $\text{dH}_2\text{O}$   |

### 2.2.5. Analiza biokemijskih parametara

Za procjenu biokemijskih parametara krvi, uzorci krvi bili su prikupljeni u epruvete s vakuumom bez antikoagulansa te je serum bio korišten za daljnju biokemijsku analizu. Iz 100  $\mu\text{L}$  seruma svakog uzorka, određeni su sljedeći biokemijski parametri: albumin (ALB), alkalna fosfataza (ALP), alanin aminotransferaza (ALT), amilaza (AMY), ukupni proteini (engl. *total protein*, TP), globulin (GLOB), ukupni bilirubin (engl. *total bilirubin*, TBIL), dušik uree u krvi (engl. *blood urea nitrogen*, BUN), fosfati (PHOS), kreatinin (CRE), glukoza u krvi, natrij, kalij i kalcij. Za analizu je korišten VetScan® kit (engl. *Comprehensive Diagnostic Profile reagent rotor*) na VetScan® VS2 uređaju (Abaxis, UK).

## 2.2.6. Mjerenje dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griess-u

Ova metoda temelji se na reakciji diazotacije koju je prvi opisao Griess 1879. Poznato je da dušik oksid (NO) sintetiziraju različite stanice u različitim organima uključujući stanice glatkih mišića, neurone, trombocite, hepatocite, makrofage, fibroblaste i epitelne stanice te stoga kao takav ima vrlo važnu ulogu u organizmu. Sintetizira se iz L-arginina djelovanjem dušik oksid sintetaze, enzima koji postoji u tri izoforme, a u uvjetima *in vitro* brzo se metabolizira u stabilne nehlapljive produkte (nitrite:  $\text{NO}_2^-$  ili nitrate:  $\text{NO}_3^-$ ) (Rosselli i sur., 1998).

Sinteza dušikovog (II) oksida može se indirektno odrediti spektrofotometrijski pomoću Griessove metode mjereći akumulirane nitrite i nitrate u različitim biološkim uzorcima. Korišten je kit *Griess reagent system* proizvođača Promega (SAD) koji za analizu  $\text{NO}_2^-$  koristi 1% sulfanilamid pripremljen u 5% fosfornoj kiselini i 0,1% N-1-naftiletilediamin dihidroklorid (NED) otopljen u vodi. U mikrotitarsku ploču stavljeno je 50  $\mu\text{L}$  uzorka bubrega u triplikatu, 50  $\mu\text{L}$  otopine sulfanilamida te je izvršena inkubacija od 10 minuta na sobnoj temperaturi (zaštićeno od svjetla). Nakon prve inkubacije dodano je 50  $\mu\text{L}$  otopine NED i ponovljena je inkubacija od 10 minuta na sobnoj temperaturi (zaštićeno od svjetla). Nakon druge inkubacije pojavljuje se ružičasto obojenje uzorka zbog nastalog azo spoja te je spektrofotometrijski izmjerena apsorbancija pri 540 nm na uređaju Ao Absorbance Microplate Reader (proizvođač: Azure Biosystems, SAD). Kao standard korišten je 0,1 M natrijev nitrit otopljen u vodi u koncentracijama od 0 do 100  $\mu\text{M}$ . Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji nitrita određen je nagib pravca. Preko nagiba pravca izračunata je koncentracija  $\text{NO}_2^-$  u uzorcima koja je izražena kao  $\mu\text{M}$ .

### 2.2.7. Određivanje aktivnosti arginaze 1

Mjerenje razine aktivnosti arginaze iz uzorka bubrega razrijeđenih 40x provodilo se pomoću ELISA kita (Sigma-Aldrich) za arginazu koji se temelji na konverziji L-arginina do uree i ornitina. Nastala urea specifično reagira sa supstratom pri čemu nastaje obojenje koje je proporcionalno aktivnosti arginaze. Jedna jedinica arginaze predstavlja količinu enzima dovoljnu za konverziju 1  $\mu\text{M}$  L-arginina do ornitina i uree u minuti pri pH od 9,5 i temperaturi od 37 °C. Standardna radna otopina uree pripremljena je dodavanjem 24  $\mu\text{L}$  uree standarda (50 mg/dL) i 176  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O kako bi se dobila 1 mM standardna radna otopina uree. U mikrotitarsku pločicu dodano je 40  $\mu\text{L}$  uzorka u duplikatu s time da je dodano isto toliko uzoraka u duplikatu kao slijepa proba. Isti volumen je dodan u jažice za standardnu radnu otopinu uree i dH<sub>2</sub>O. Nakon toga je dodano u svim uzorcima, osim uzoraka slijepe probe, 5x razrijeđenog supstratnog pufera dobivenog miješanjem 8  $\mu\text{L}$  arginin pufera sa 2  $\mu\text{L}$  otopine Mn, nakon čega je slijedila inkubacija od 2 sata pri 37 °C. Prije isteka dvosatne inkubacije, pripremljen je urea reagens dobiven miješanjem već gotovih reagensa A i reagensa B (100  $\mu\text{L}$  reagensa A i 100  $\mu\text{L}$  reagensa B pripremljenih u kitu). Po isteku inkubacije, kako bi se zaustavila reakcija dodano je 200  $\mu\text{L}$  urea reagensa u svaku jažicu uključujući i uzorke slijepe probe. Potom je dodano 10  $\mu\text{L}$  5x razrijeđenog supstratnog pufera u uzorke slijepe probe, te je provedena inkubacija od 60 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije izmjerena je apsorbancija na 430 nm na uređaju Ao Absorbance Microplate Reader (proizvođač: Azure Biosystems, SAD).

Aktivnost arginaze određena je pomoću sljedeće formule:

$$\text{Aktivnost arginaze} = \left( \frac{A_{uzorka} - A_{prazne\ jažice}}{A_{standarda} - A_{vode}} \right) \times \left( \frac{1\text{ mM} \times 50 \times 10^3}{V \times T} \right)$$

gdje je:

T – reakcijsko vrijeme u minutama

V – volumen uzorka u jažici ( $\mu\text{L}$ )

1 mM – koncentracija standarda uree

50 – reakcijski volumen ( $\mu\text{L}$ )

10<sup>3</sup> – konverzijski faktor pretvorbe mM u  $\mu\text{M}$



## 2.2.8. Histološke metode

### 2.2.8.1. Postupak prožimanja tkiva parafinom

Prilikom uzimanja biološkog materijala pohranilo se tkivo za daljnju obradu. Tkivo je izrezano na komadiće veličine 2 x 1 x 0,5 cm te je prošlo proces fiksacije u posudama s puferiranim, neutralnim 10% formalinom kroz 24 - 48 sati. Uzorci tkiva su zatim stavljeni i zatvoreni u plastične kazete te uklopljeni u parafin u uređaju za prožimanje tkiva parafinom. Postupak prožimanja tkiva parafinom traje oko 22 sata u seriji od uzlaznog niza alkohola (70% alkohol – 96% alkohol – apsolutni alkohol), ksilena do parafina u uvjetima sobne temperature. Tkiva prožeta parafinom premještaju se u kalupe te se zaliju tekućim parafinom temperature 56-58 °C. Na taj način dobiveni parafinski blokovi zatim se hlade na -20 °C kako bi se mogli što tanje narezati.

### 2.2.8.2. Imunohistokemijsko bojanje

Dobiveni parafinski blokovi sačinjeni od uzoraka tumorskog tkiva, bubrega, jetre izrezani su na debljinu od 2 - 3 µm. Iz svakog parafinskog bloka izrezano je više rezova od čega je jedan obojan hematoksilin-eozinom za patohistološku analizu, dok su ostali ostavljeni za imunohistokemijsku analizu. Rezovi su stavljeni na površinu vode zagrijanu na temperaturi od 55 °C kako bi poprimili zadovoljavajući oblik za postavljanje na silanizirana predmetna stakalca. Na taj način pripremljena stakalca sa uzorcima tkiva osušena su u termostatu pri 60 °C oko 40 minuta.

Pripremljene uzorke potrebno je prije deparafinirati i rehidrirati. To se provodi u nizu ksilena i silaznih alkohola (apsolutni alkohol – 96% alkohol – 70% alkohol) do destilirane vode. U biološkom materijalu fiksiranom formalinom dolazi do stvaranja molekularnih međureakcija pa je tkiva prije imunohistokemijske reakcije potrebno obraditi 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 procesa termičke obrade, stakla su ostavljena u puferu na sobnoj temperaturi oko 20 minuta kako bi se ohladila te su isprana destiliranom vodom.

Imunohistokemijsko bojanje 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 komplet EnVision™ FLEX/HRP kit (K8010, Dako, Danska) koji sadrži sve potrebne reagens. Desestominutnom inkubacijom s kromogenom DAB omogućena je vizualizacija specifične imunohistokemijske reakcije te kontrastno obojenje hematoksilinom kako bi bile vidljive sve histološke strukture. Zadnji korak je dehidriranje stakalaca u uzlaznom nizu alkohola (70% alkohol – 96% alkohol – apsolutni alkohol), razbistravanje u ksilenu te pokrivanje pokrovnicom.

#### 2.2.8.3. Mikroskopiranje

Nakon pripreme i bojanja uzoraka, idući korak je mikroskopiranje. Na jetri, bubregu i tkivu tumora krvne žile su izbrojane žile u 10 vidnih polja najvećeg povećanja.

### 2.2.9. Statistička obrada podataka

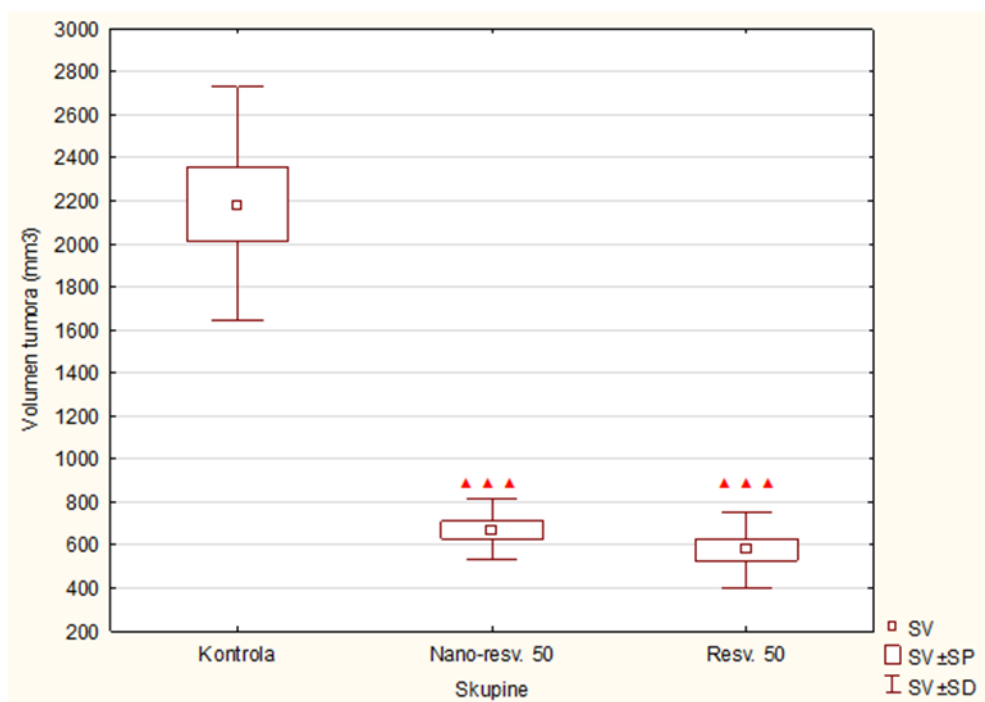
Statistička analiza je provedena pomoću STATISTICA 13 programa (StatSoft, Tulsa, OK, USA), a statistička točnost određena je s  $P < 0,05$ . Svi rezultati izraženi su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (SV  $\pm$  SP). Podaci su analizirani pomoću Kruskal-Wallis ANOVA-a testa. Daljnja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

Za pripremu podataka i izračun koncentracija, korišten je računalni program Microsoft Excel 2003.

## **3. REZULTATI**

### **3.1. PROMJENA VOLUMENA TUMORA**

Pokusne životinje koje su bile injicirane stanicama EAT obrađene su intratumorlanim (*it*) injiciranjem resveratrola i nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana, te su rezultati analize volumena tumora pokazali da postoji statistički značajno smanjenje volumena tumora kod obrađenih skupina (Slika 7). Statistički značajno smanjenje postoji u skupini obrađenoj nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P \leq 0,001$ ) i u skupini obrađenoj resveratrolom u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P \leq 0,001$ ).



**Slika 7.** Ukupni volumen tumora u miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg.

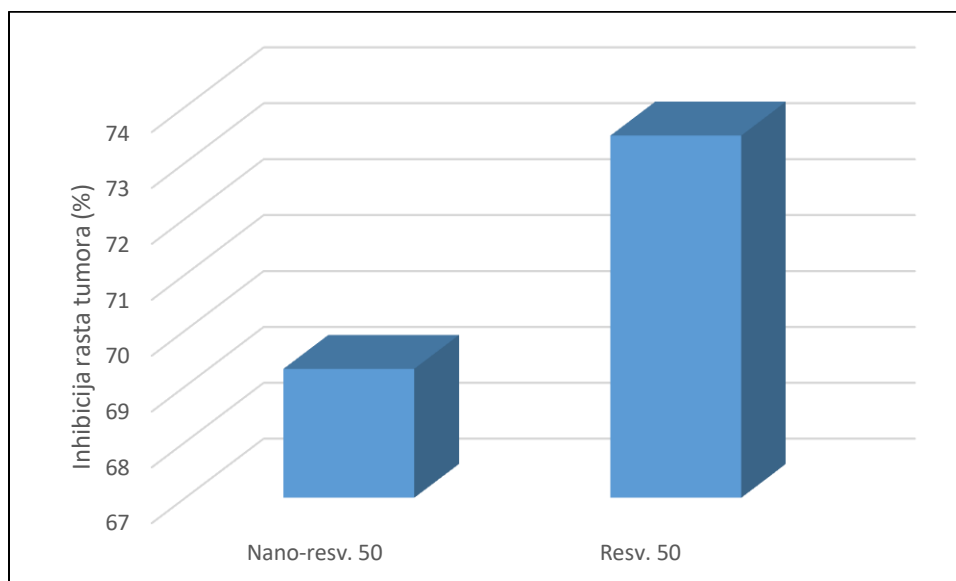
Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Ukupni volumen tumora dobiven je mjerenjem volumena tumora kaliperom prema formuli:  $\text{Volumen tumora} = (\text{širina tumora}^2 \times \text{dužina tumora}) / 2$ . Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP).

▲ Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (▲▲▲  $P \leq 0,001$ ).

**Kratice:** **Nano-resv. 50** – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; **Resv. 50** – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

## 3.2. INHIBICIJA RASTA TUMORA

Rezultati mjerenja inhibicije rasta tumora prikazani su na Slici 8. Rezultati ukazuju na viši postotak inhibicije rasta tumora kod obje obrađene skupine u odnosu na kontrolu. Skupina obrađena resveratrolom u dozi od 50 mg/kg pokazala je inhibiciju od 73,48% u odnosu na kontrolu, dok je skupina obrađena nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg pokazala inhibiciju od 69,31% u odnosu na kontrolnu skupinu.



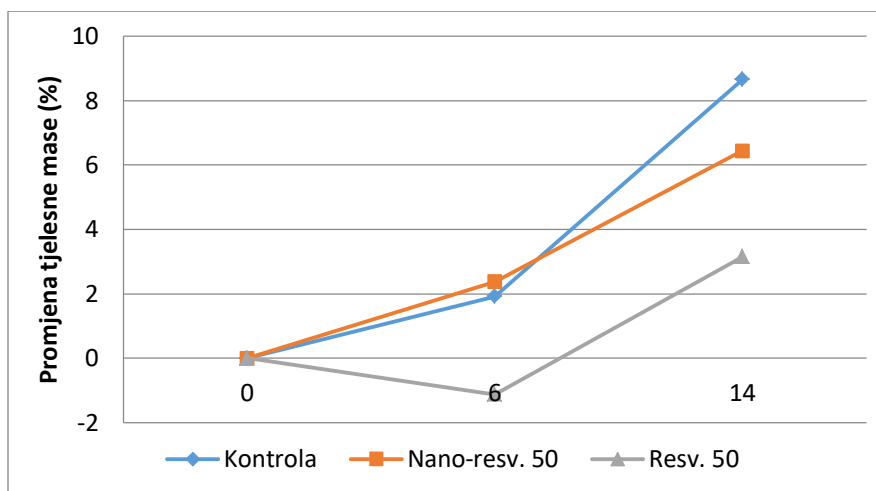
**Slika 8.** Postotak inhibicije rasta tumora u miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolu.

Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Nakon mjerenja volumena tumora izračunata je inhibicija rasta tumora te izražena kao % u odnosu na kontrolnu skupinu prema formuli: % inhibicije rasta tumora  $\%TVI = (Srednja\ vrijednost\ volumena\ tumora\ u\ kontrolnoj\ grupi - Srednja\ vrijednost\ volumena\ tumora\ u\ pokusnoj\ grupi) \times 100 / Srednja\ vrijednost\ volumena\ tumora\ u\ kontrolnoj\ grupi$ .

**Kratice:** Nano-resv. 50 – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Resv. 50 – resveratrol u dozi od 50 mg/kg.

### 3.3. PROMJENA TJELESNE MASE

Praćenjem promjene tjelesne mase pratili smo promjenu mase tumora tijekom pokusa te dobili uvid u brzinu njegova rasta koji je izračunat kao % u odnosu na početnu masu tumora u pojedinoj skupini, a rezultati su prikazani na Slici 9. Kod kontrole je uočen najveći porast tjelesne mase koji je posebice izražen od 6. do 14. dana. Kod skupine obrađene nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg uočen je gotovo potpuno linearan rast od 0. do 14. dana. Skupina obrađena resveratrolom u dozi od 50 mg/kg pokazuje najveće odstupanje u promjeni tjelesne mase gdje je od 0. do 6. dana uočeno prvo smanjenje tjelesne mase, a onda od 6. do 14. dana njeno povećanje koje je, sveukupno gledajući, najmanje u odnosu na ostale skupine.



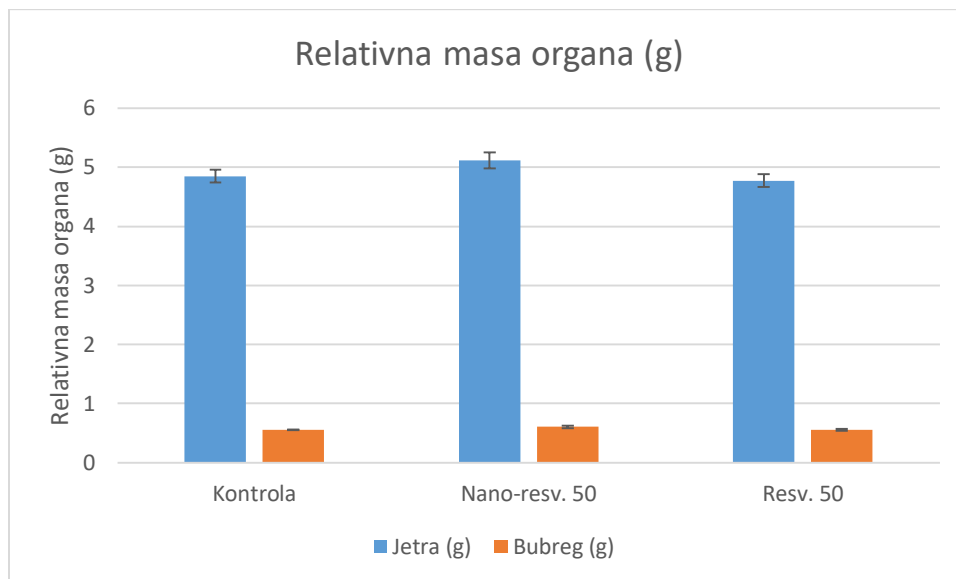
**Slika 9.** Promjena tjelesne mase miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrola u dozi od 50 mg/kg

Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 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. 50 – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Resv. 50 – resveratrol u dozi od 50 mg/kg.

### 3.4. PROMJENA MASE UNUTARNJIH ORGANA

Rezultati promjene mase unutarnjih organa (jetre i bubrega) ne pokazuju statistički značajnu razliku 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 50 mg/kg

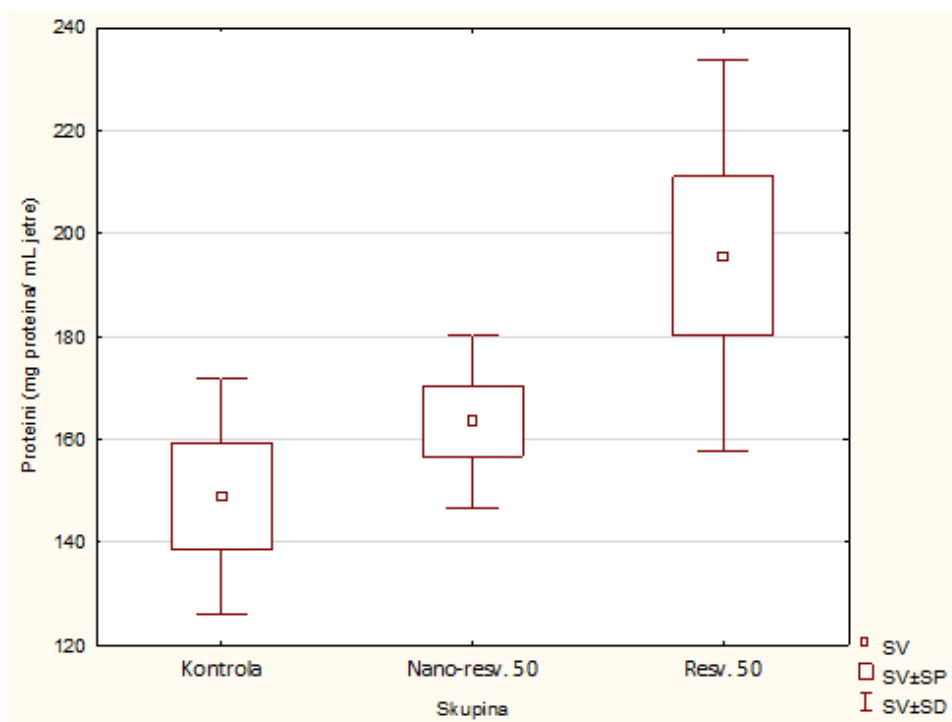
Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana.

**Kratice:** **Nano-resv. 50** – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; **Resv. 50** – resveratrol u dozi od 50 mg/kg.

## 3.5. PARAMETARI OKSIDACIJSKOG STRESA

### 3.5.1. Ukupna koncentracija proteina u uzorcima tkiva jetre miševa

Rezultati određivanja koncentracije ukupnih proteina u uzorcima tkiva jetre miševa ne pokazuju statistički značajnu razliku između ispitivanih skupina (Slika 11).



**Slika 11.** Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima tkiva jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg

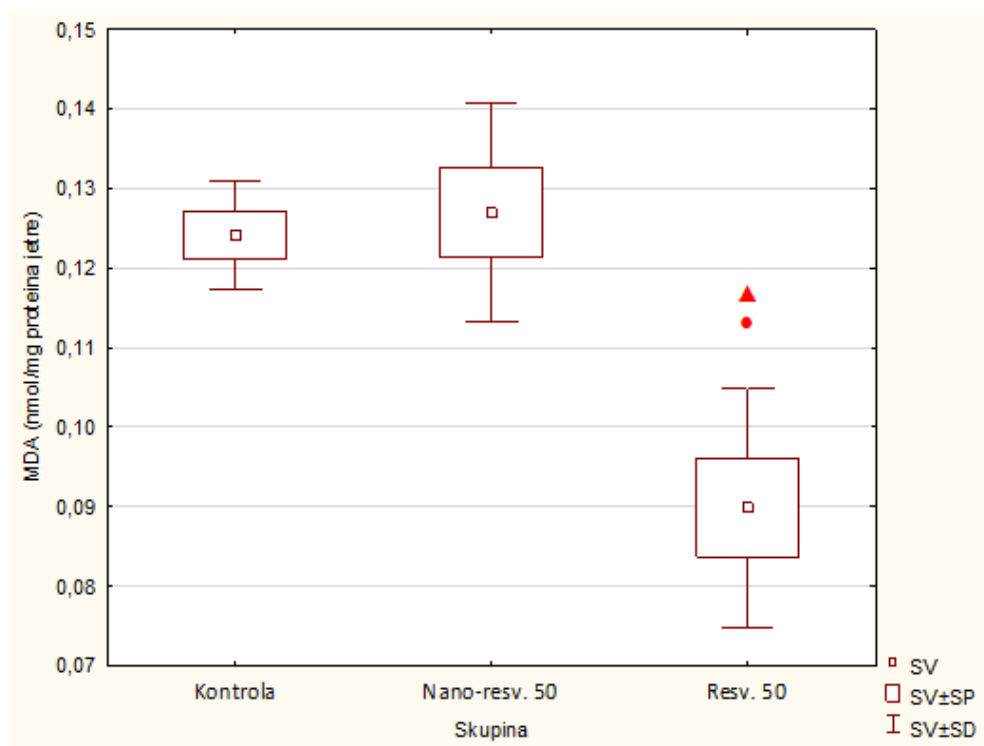
Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP).

**Kratice:** **Nano-resv. 50** – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; **Resv. 50** – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



### 3.5.2. Mjerenje razine lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima tkiva jetre miševa

Rezultati mjerenja koncentracije MDA u uzorcima tkiva jetre prikazani su na Slici 12. Rezultati ukazuju na statistički značajno nižu vrijednost MDA u skupini obrađenoj s resveratrolom u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolu ( $P \leq 0,05$ ) te u odnosu na skupinu obrađenu s nanokristalima resveratrola u dozi od 50 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 50 mg/kg.

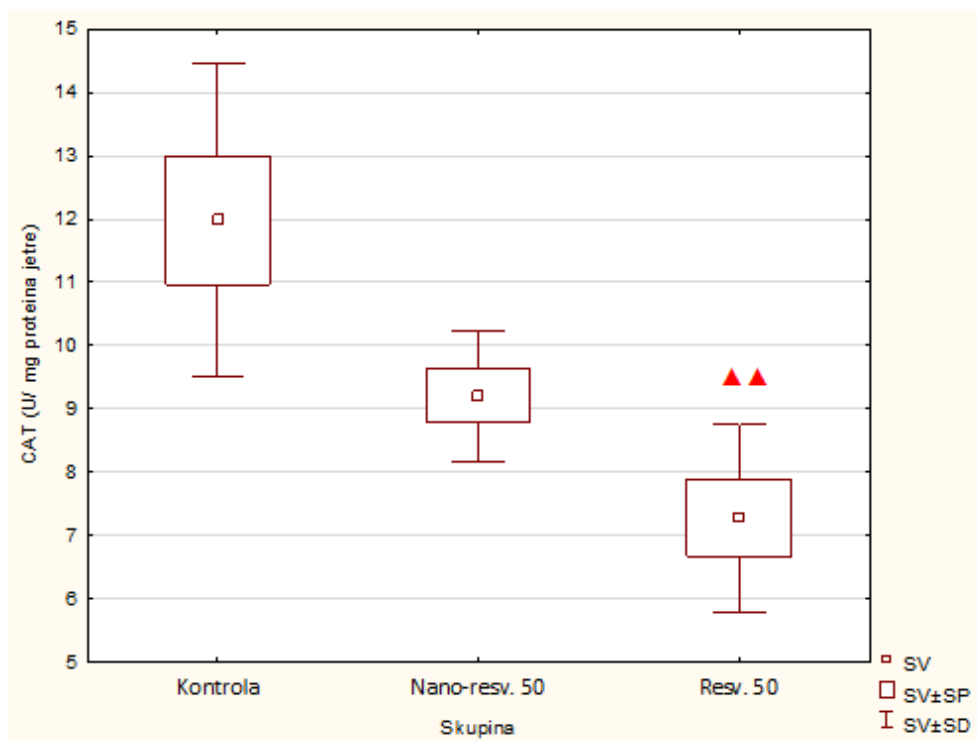
Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Statistički značajno različito: Resv. 50 vs Kontrola (▲  $P \leq 0,05$ ), Resv. 50 vs Nano-resv. 50 (●  $P \leq 0,05$ )

**Kratice:** Nano-resv. 50 – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Resv. 50 – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD – standardna devijacija.

### 3.5.3. Enzimski aktivnosti katalaze u uzorcima tkiva jetre miševa

Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti katalaze (CAT) u uzorcima tkiva jetre prikazani su na Slici 13. Rezultati ukazuju na statistički značajno nižu aktivnost katalaze kod skupine obrađene s resveratrolom u dozi od 50 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 50 mg/kg.

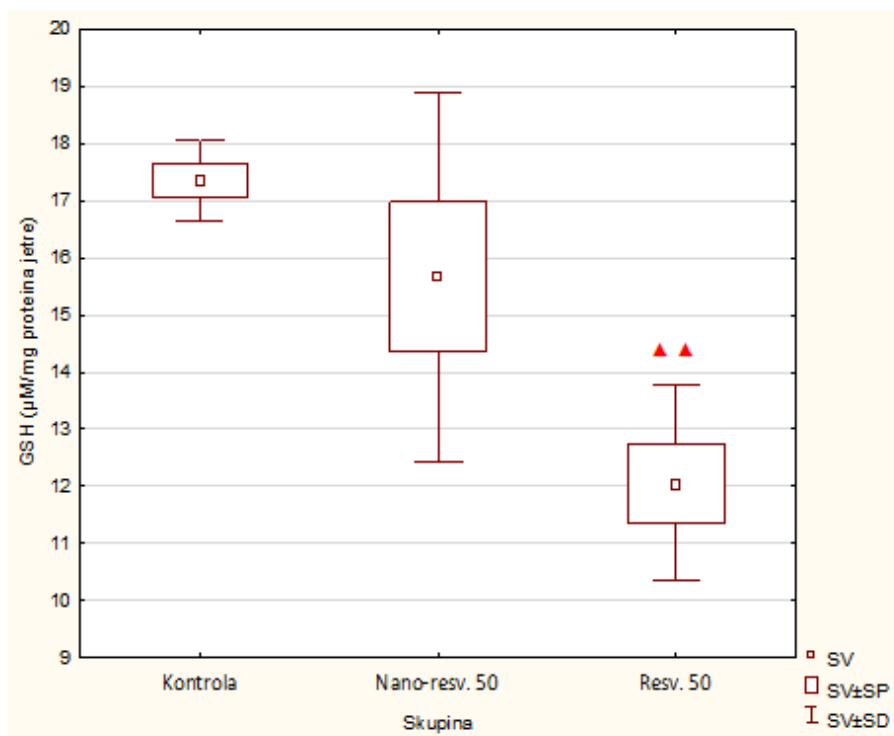
Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Statistički značajno različito: Resv. 50 vs Kontrola (▲▲  $P \leq 0,01$ )

**Kratice:** Nano-resv. 50 – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Resv. 50 – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD – standardna devijacija.

### 3.5.4. Razina ukupnog glutationa u uzorcima tkiva jetre miševa

Rezultati mjerenja koncentracije ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima tkiva jetre prikazani su na Slici 14. Rezultati ukazuju na statistički značajno nižu koncentraciju ukupnog GSH kod skupine obrađene s resveratrolom u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P \leq 0,01$ ).



**Slika 14.** Koncentracija GSH u uzorcima tkiva jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg.

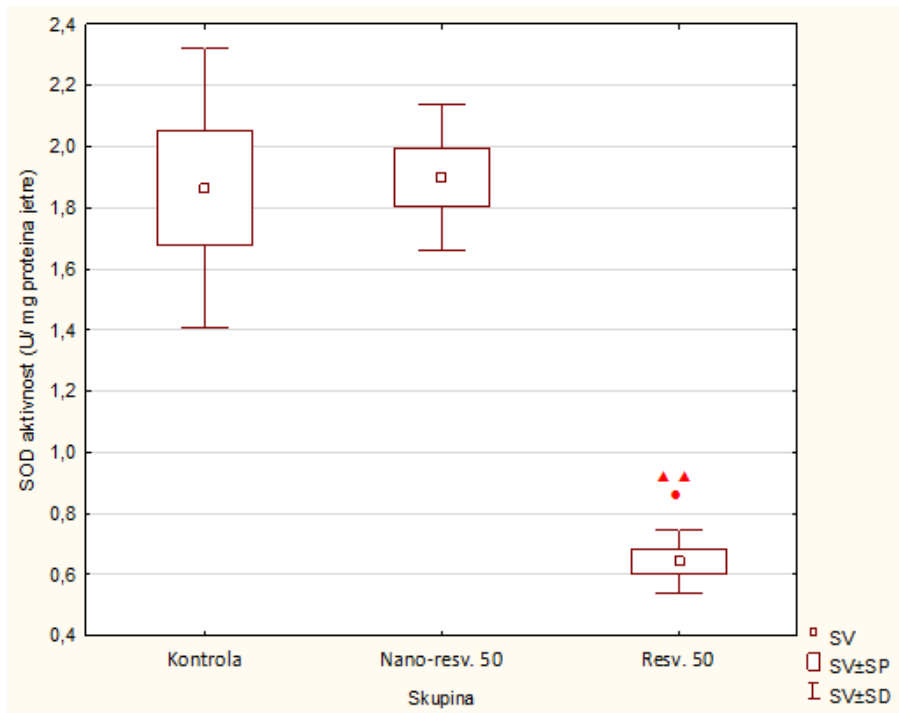
Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Statistički značajno različito: Resv. 50 vs Kontrola ( $\blacktriangle\blacktriangle P \leq 0,01$ )

**Kratice:** Nano-resv. 50 – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Resv. 50 – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD – standardna devijacija.

### 3.5.5. Enzimaska aktivnost superoksid dismutaze u uzorcima tkiva jetre miševa

Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u uzorcima tkiva jetre (Slika 15) ukazuju na statistički značajno nižu vrijednost SOD u skupini obrađenoj s resveratrolom u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolu ( $P \leq 0,01$ ) te u odnosu na skupinu obrađenu s nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg ( $P \leq 0,05$ ).



**Slika 15.** Aktivnost SOD u uzorcima tkiva jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg.

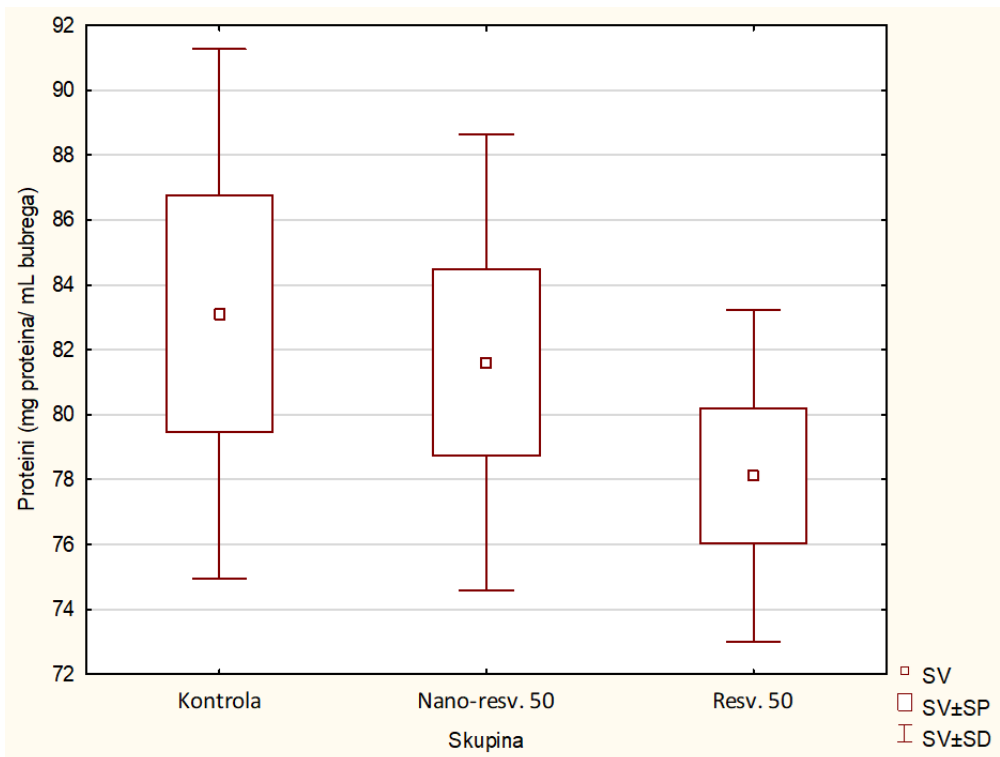
Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Statistički značajno različito: Resv. 50 vs Kontrola ( $\blacktriangle \blacktriangle P \leq 0,01$ ), Resv. 50 vs Nano-resv. 50 ( $\bullet P \leq 0,05$ )

**Kratice:** Nano-resv. 50 – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Resv. 50 – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD – standardna devijacija.

### 3.5.6. Ukupna koncentracija proteina u uzorcima tkiva bubrega miševa

Rezultati određivanja koncentracije ukupnih proteina u uzorcima tkiva bubrega miševa ne pokazuju statistički značajnu razliku između ispitivanih skupina (Slika 16).



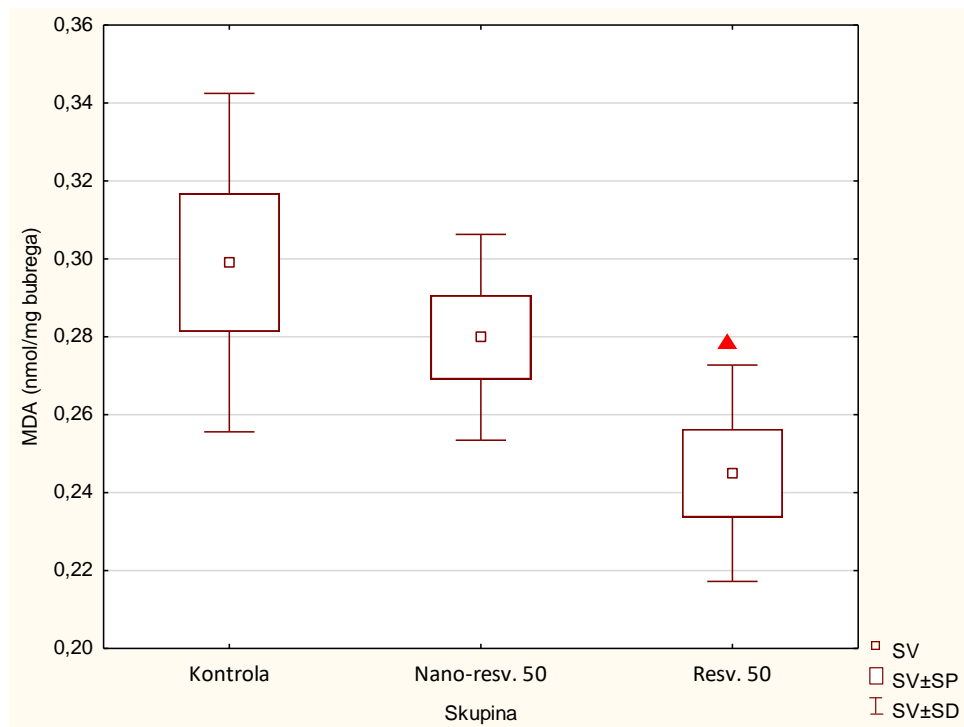
**Slika 16.** Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima tkiva bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg.

Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP).

**Kratice:** **Nano-resv. 50** – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; **Resv. 50** – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

### 3.5.7. Razina lipidne peroksidacije u uzorcima tkiva bubrega miševa

Rezultati mjerenja koncentracije lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima tkiva bubrega prikazani su na Slici 17. Rezultati pokazuju na statistički značajno nižu vrijednost MDA u skupini obrađenoj s resveratrolom u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolu ( $P \leq 0,05$ ).



**Slika 17.** Koncentracija MDA u uzorcima tkiva bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg.

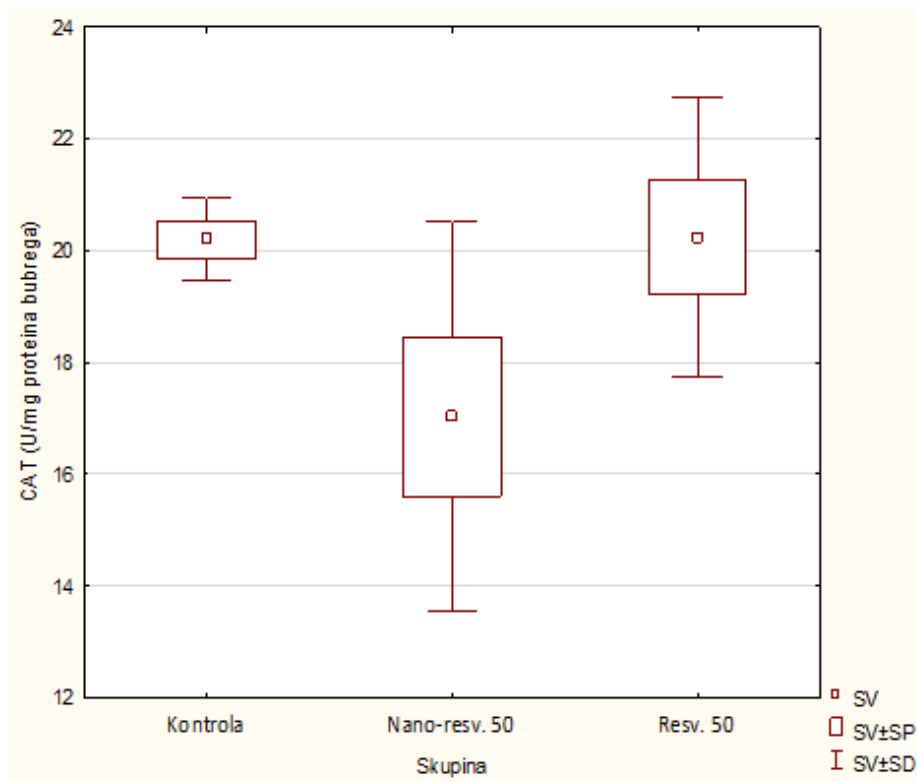
Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP).

Statistički značajno različito: Resv. 50 vs Kontrola ( $\blacktriangle P \leq 0,05$ )

**Kratice:** **Nano-resv. 50** – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; **Resv. 50** – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

### 3.5.8. Enzimska aktivnost katalaze u uzorcima tkiva bubrega miševa

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



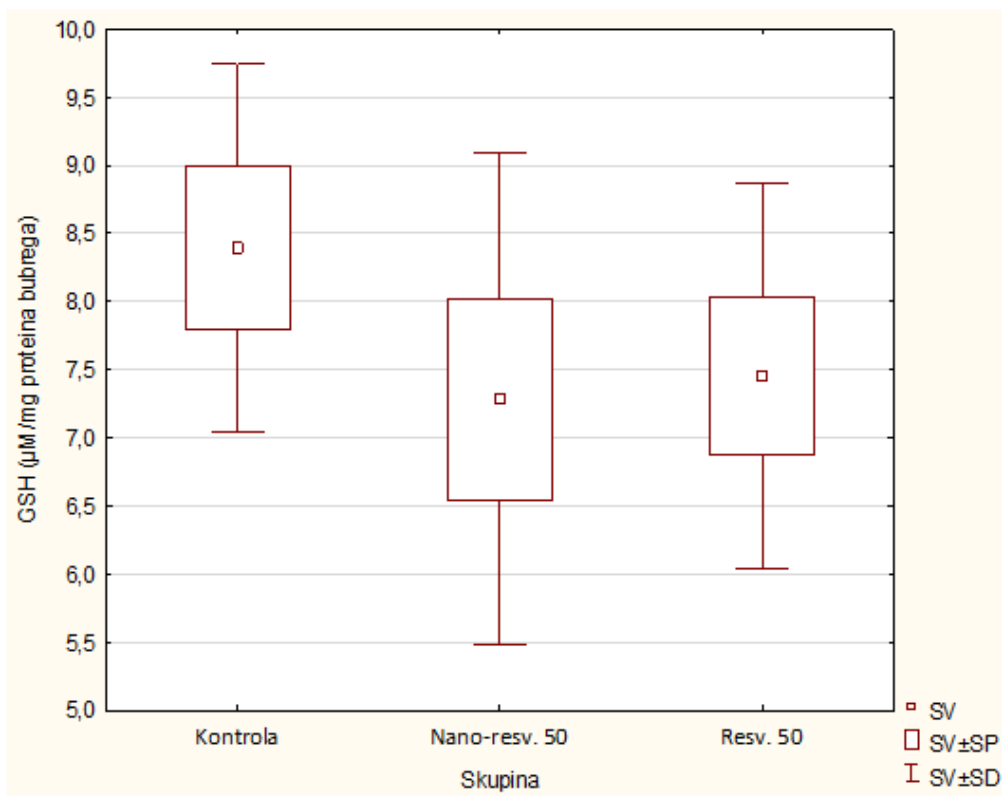
**Slika 18.** Koncentracija CAT u uzorcima tkiva bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg.

Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP).

**Kratice:** **Nano-resv. 50** – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; **Resv. 50** – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

### 3.5.9. Razina ukupnog glutationa u uzorcima tkiva bubrega miševa

Rezultati mjerenja koncentracije ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima tkiva bubrega ne pokazuju statistički značajnu razliku između ispitivanih skupina (Slika 19).



**Slika 19.** Koncentracija GSH u uzorcima tkiva bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg.

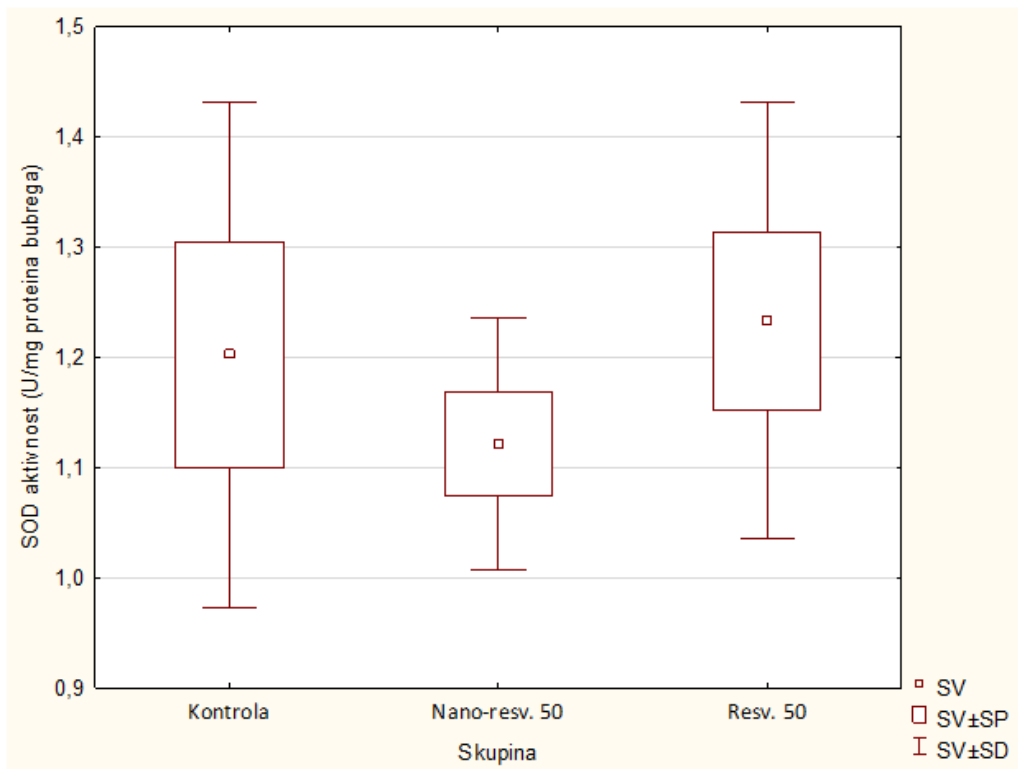
Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP).

**Kratice:** **Nano-resv. 50** – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; **Resv. 50** – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



### 3.5.10. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze u uzorcima tkiva bubrega miševa

Rezultati mjerenja aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u uzorcima tkiva bubrega ne pokazuju statistički značajnu razliku između ispitivanih skupina (Slika 20).



**Slika 20.** Aktivnost SOD u uzorcima tkiva bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg.

Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

**Kratice:** **Nano-resv. 50** – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; **Resv. 50** – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.

### **3.6. BIOKEMIJSKI PARAMETRI U SERUMU**

Biokemijska analiza seruma iz krvi miševa pokazala je statistički značajne promjene u koncentraciji pojedinih enzima i proteina kod skupine obrađene resveratrolom u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu obrađenu s nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg (Tablica 6). Vrijednosti koncentracije albumina su bile statistički značajno povišene u skupini obrađenoj resveratrolom u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu, dok su vrijednosti alanin aminotransferaze i amilaze bile statistički značajno snižene u skupini obrađenoj resveratrolom u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu obrađenu s nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg. Vrijednosti koncentracije pojedinih metabolita i supstrata pokazale su statistički značajno povećanje u skupini obrađenoj s nanokristalima u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 7). Vrijednosti koncentracije fosfora, kreatinina i kalija su bile statistički značajno više u skupini obrađenoj s nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je vrijednost kreatinina bila statistički značajno niža kod skupine obrađene resveratrolom u dozi od 50 mg/kg u odnosu na skupinu obrađenu s nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg.

**Tablica 6.** Vrijednosti analize enzima i proteina u serumu miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg.

| ANALIZA BIOKEMIJSKIH PARAMETARA- ENZIMI I PROTEINI (X ± SP) |               |            |                |                  |            |            |
|---|---------------|------------|----------------|------------------|------------|------------|
| SKUPINE   | ALB (U/L)     | ALP (U/L)  | ALT (U/L)      | AMY (g/L)        | TP (g/L)   | GLOB (g/L) |
| Kontrola  | 30,00±0,37    | 26,67±3,31 | 14,67±1,05     | 1044±6,23        | 44,67±0,21 | 14,67±0,21 |
| Nano-resv. 50   | 29,00±0,37    | 27,67±2,20 | 14,33±0,76     | 1115,33±36,30    | 43,67±0,56 | 14,67±0,42 |
| Resv. 50  | 33,67±0,76 ** | 32,33±2,76 | 10,33±0,76 ▲ * | 974,67±9,40 ▲ ** | 47,00±1,10 | 13,67±0,21 |

Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SP.

▲ Statistički značajno različito u usporedbi s kontrolnom skupinom (▲  $P \leq 0,05$ ); \* Statistički značajno različito u usporedbi sa skupinom Nano-resv. 50 (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ )

**Kratice:** Nano-resv. 50 – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Resv. 50 – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; ALB – albumin; ALP - alkalna fosfataza; ALT - alanin aminotransferaza; AMY – amilaza; TP – ukupni proteini; GLOB – glubulin; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

**Tablica 7.** Vrijednosti analize metabolita i supstrata u serumu miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg.

| ANALIZA BIOKEMIJSKIH PARAMETARA- METABOLITI I SUPSTRATI (X ± SP) |                               |                            |                             |                              |                            |                            |                        |                        |
|--|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|
| SKUPINE  | TBIL<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | BUN<br>( $\text{mmol/L}$ ) | PHOS<br>( $\text{mmol/L}$ ) | CRE<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | GLU<br>( $\text{mmol/L}$ ) | Na+<br>( $\text{mmol/L}$ ) | K+ ( $\text{mmol/L}$ ) | Ca ( $\text{mmol/L}$ ) |
| Kontrola   | 5±0,00                        | 7,17±0,09                  | 2,35±0,11                   | 24,33±2,64                   | 11,80±0,68                 | 133,33±0,76                | 5,40±0,10              | 2,28±0,03              |
| Nano-resv. 50  | 5±0,00                        | 6,27±0,09                  | 2,97±0,08 ▲                 | 34,33±1,69▲                  | 14,50±1,51                 | 134,00±0,73                | 6,30±0,11 ▲            | 2,22±0,02              |
| Resv. 50   | 4,67±0,21                     | 6,23±0,69                  | 2,74±0,13                   | 19,66±1,12●●                 | 14,97±1,35                 | 131,33±0,56                | 5,87±0,24              | 0,28±0,03              |

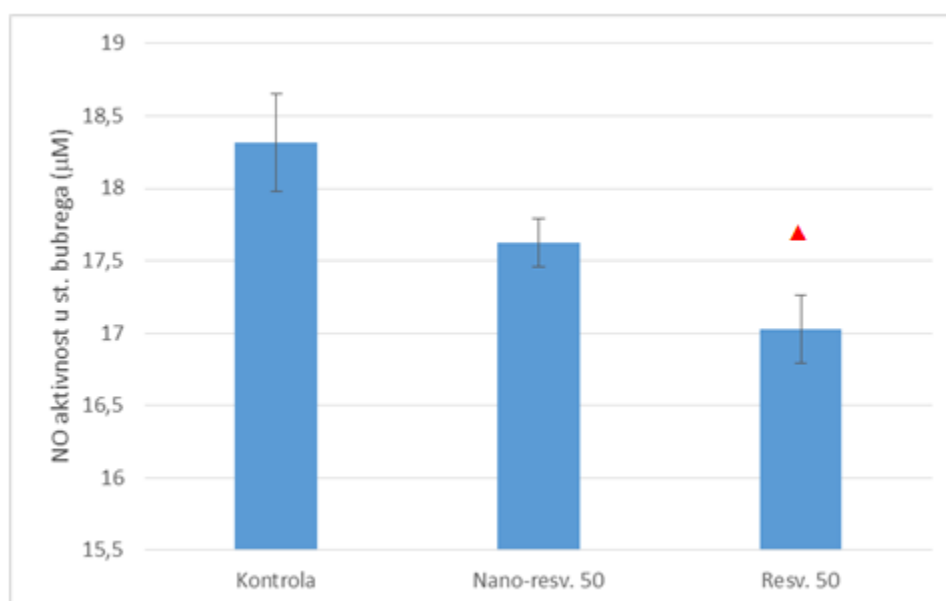
Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SP.

▲ Statistički značajno različito u usporedbi s kontrolnom skupinom (▲ $P \leq 0,05$ ); ● Statistički značajno različito u usporedbi sa skupinom Nano-resv. 50 (●● $P \leq 0,01$ )

**Kratice:** Nano-resv. 50 – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Resv. 50 – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; TBIL – ukupni bilirubin, BUN - dušik uree u krvi; PHOS – fosfor; CRE – kreatinin; GLU - glukoza u krvi; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška.

### 3.7. AKTIVNOST DUŠIKOVOG OKSIDA U UZORCIMA TKIVA BUBREGA MIŠEVA MJERENIH INDIREKTNOM METODOM PREMA GRIESS-U

Rezultati mjerenja aktivnosti dušikovog oksida u uzorcima tkiva bubrega prikazani su na Slici 21. Rezultati ukazuju na statistički nižu aktivnost NO kod skupine obrađene resveratrolom u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P \leq 0,05$ ).



**Slika 21.** Određivanje aktivnosti NO iz uzorka tkiva bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg.

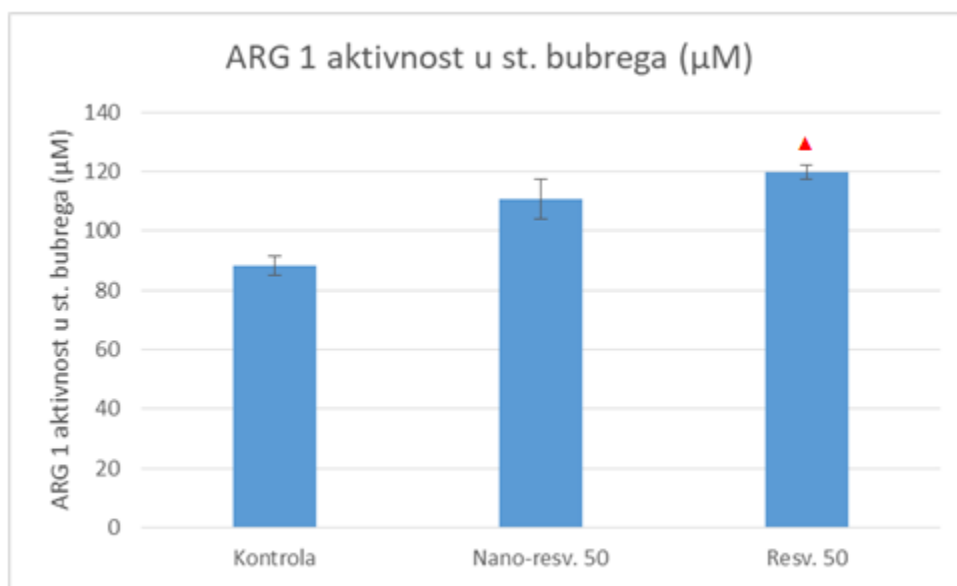
Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Statistički značajno različito: Resv. 50 vs Kontrola (▲  $P \leq 0,05$ )

**Kratice:** Nano-resv. 50 – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Resv. 50 – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD – standardna devijacija.

### 3.8. ENZIMSKA AKTIVNOST ARGINAZE 1

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja enzimske aktivnosti arginaze 1 (Arg 1) u uzorcima tkiva bubrega prikazani su na Slici 22. Rezultati pokazuju da je aktivnost Arg 1 značajno viša kod skupine obrađene resveratrolom u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P \leq 0,05$ ).



**Slika 22.** Aktivnost arginaze 1 u uzorcima tkiva bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg.

Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV $\pm$  SD (SP).

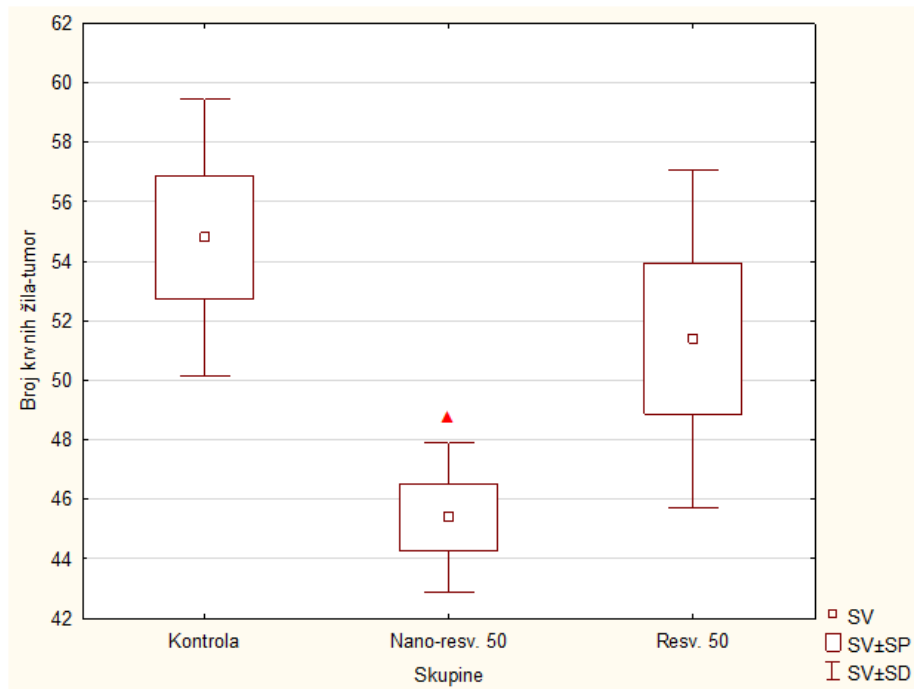
Statistički značajno različito: Resv. 50 vs Kontrola ( $\blacktriangle P \leq 0,05$ )

**Kratice:** Nano-resv. 50 – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Resv. 50 – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD – standardna devijacija

## **3.9. UČINAK NANOKRISTALA RESVERATROLA I RESVERATROLA NA ANGIOGENEZU**

### **3.9.1. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti tumora**

Mikroskopska analiza kvantitativnog mjerenja prožiljenosti tumora koja je provedena određivanjem prosječne gustoće prožiljenosti tumora u područjima najintenzivnije prokrvljenosti na ukupnom povećanju mikroskopa od 400x, pokazala je statistički značajno smanjenje broja krvnih žila kod skupine obrađene s nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P \leq 0,05$ ) (Slika 23).



**Slika 23.** Kvantitativno mjerenje prožiljenosti tumora u miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg

Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

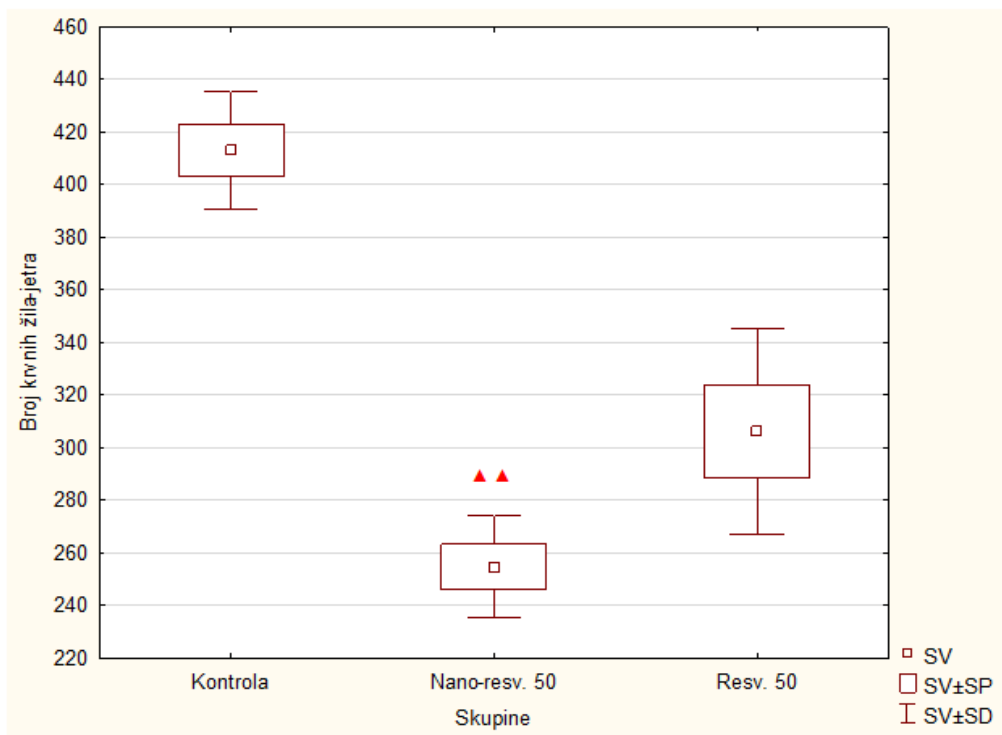
Statistički značajno različito: Nano-resv. 50 vs Kontrola ( $\blacktriangle P \leq 0,05$ )

**Kratice:** **Nano-resv. 50** – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; **Resv. 50** – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; **SV** – srednja vrijednost; **SP** - standardna pogreška; **SD** – standardna devijacija.



### 3.9.2. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti jetre

Mikroskopskom analizom kvantitativnog mjerenja prožiljenosti jetre vidljivo je statističko smanjenje broja krvnih žila (Slika 24) u skupini obrađenoj nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P \leq 0,01$ ).



**Slika 24.** Kvantitativno mjerenje prožiljenosti jetre u miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg

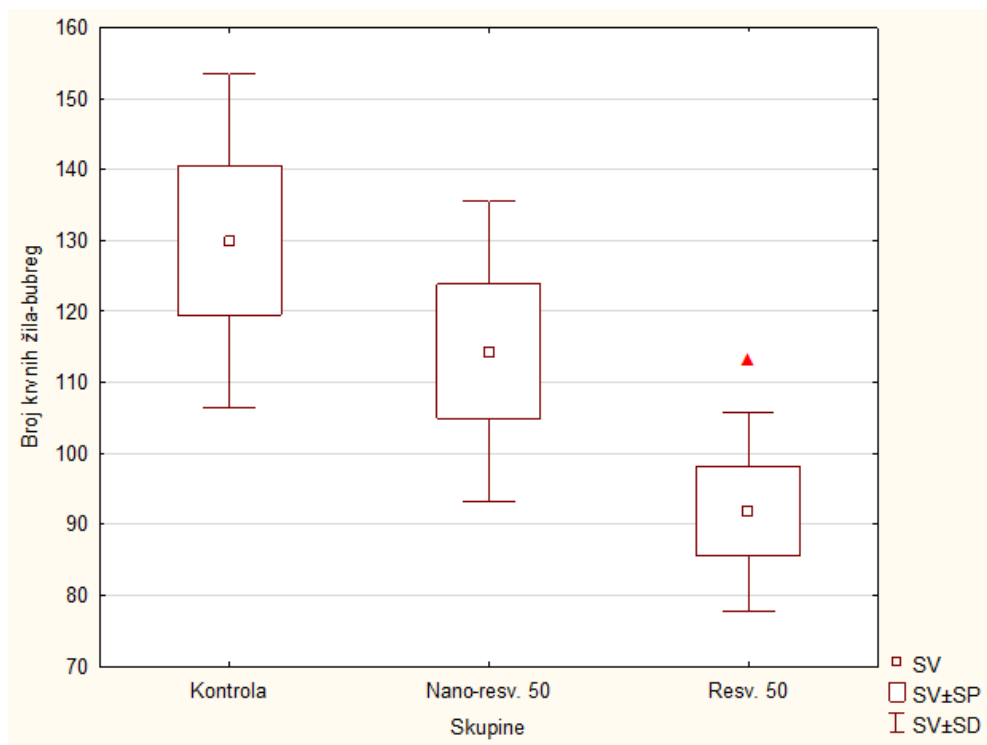
Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Statistički značajno različito: Nano-resv. 50 vs Kontrola (▲▲  $P \leq 0,01$ )

**Kratice:** Nano-resv. 50 – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Resv. 50 – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD – standardna devijacija

### 3.9.3. Kvantitativno mjerenje prožiljenosti bubrega

Mikroskopska analiza kvantitativnog mjerenja prožiljenosti bubrega prikazana je na Slici 25. Iz dobivenih rezultata vidljivo je statističko smanjenje broja krvnih žila bubrega u skupini obrađenoj resveratrolom u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P \leq 0,05$ ).



**Slika 25.** Kvantitativno mjerenje prožiljenosti bubrega u miševa nositelja EAT-a obrađenih s nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg

Miševi (N=10) su nakon unosa stanica EAT ( $1 \times 10^6$ ) obrađeni *it* sa nanokristalima resveratrola i resveratrolom u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan u periodu od 14 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP).

Statistički značajno različito: Resv. 50 vs Kontrola ( $\blacktriangle P \leq 0,05$ )

**Kratice:** Nano-resv. 50 – nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Resv. 50 – resveratrol u dozi od 50 mg/kg; SV – srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD – standardna devijacija

## 4. RASPRAVA

Liječenje tumora, drugog glavnog uzroka smrtnosti svjetskog stanovništva nakon kardiovaskularnih bolesti, danas predstavlja jednu od najsloženijih vrsta terapija u medicini. Kod konvencionalnih metoda liječenja koje se temelje na citotoksičnim kemoterapijskim lijekovima i korištenju radioterapije dokazana je mogućnost pojave rezistencije na samu primjenu terapije uz štetne nuspojave, hipoksiju te oštećenje tumorskih, ali i okolnih zdravih stanica. Iz tog razloga, posebnu pozornost znanstvene i zdravstvene zajednice privlače određeni spojevi iz prirode zbog svojih mogućih učinaka na bolesti uzrokovane upalom, uključujući i tumor, čije bi korištenje u konačnici zaživjelo u kliničkoj primjeni (Ko i sur., 2017).

Važnu skupinu fitokemikalija koje mogu značajno utjecati na rast tumorskih stanica predstavljaju polifenoli. Njihovo djelovanje ne pripisuje se samo njihovoj sposobnosti da djeluju kao snažni antioksidansi, već i njihovoj sposobnosti međureakcije s osnovnim staničnim mehanizmima koji uključuju međureakciju s membranom i unutarstaničnim receptorima, modulaciju signalnih kaskadnih puteva, međureakciju s enzimima uključenim u promociju i metastaziranje tumora, međureakciju s onkogenima i onkoproteinima te izravnu ili neizravnu međureakciju s nukleinskim kiselinama. Zbog svega navedenoga, polifenolni spojevi pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti uključujući inhibiciju lipidne peroksidacije, agregacije trombocita, kapilarne propusnosti i aktivnosti enzimskih sustava (ciklooksigenaze, lipooksigenaze) te posjeduju dokazano antikancerogeno, antimutageno, antioksidacijsko i protuupalno djelovanje (Kampa i sur., 2007).

Resveratrol je kao jedan od najznačajnijih predstavnika polifenolnih spojeva uključen u moduliranje signalnih puteva povezanih sa staničnim rastom i dijeljenjem, upalom, apoptozom, angiogenezom, invazijom i metastaziranjem tumora.

Svrha ovog rada bila je istražiti učinak otopine resveratrola i njegovih nanokristala u dozi od 50 mg/kg na rast angiogenetski-ovisnog, brzo rastućeg Ehrlichovog solidnog tumora, oksidacijski stres i potencijalnu toksičnost nastalu nakupljanjem nanokristala u jetri i bubregu miševa te polarizaciju makrofaga.

Obrada životinja podijeljenih u 3 skupine započela je subkutanom (*sc*) injiciranjem  $1 \times 10^6$  EAT stanica te intratumoralnim (*it*) injiciranjem resveratrola ili nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg svaki drugi dan tijekom 14 dana dok je kontrolna skupina obrađena fiziološkom otopinom. Da bismo razjasnili ulogu oksidacijskog stresa u rastu i angiogenezi Ehrlichovog solidnog tumora i ukazali na moguću zaštitnu ili potencijalno toksičnu ulogu antioksidansa resveratrola i njegovih nanokristala zbog nakupljanja nanokristala u jetri (čak 90%) i bubregu, ispitali smo sljedeće: promjenu tjelesne mase, volumena i inhibicije rasta tumora, promjenu mase i oksidacijskog stresa (proteini, MDA, CAT, GSH i SOD) tkiva jetre i bubrega, biokemijske odrednice seruma iz krvi miševa (enzimi i proteini, metaboliti i supstrati), polarizaciju i aktivnost makrofaga [analiza dušikovog oksida (NO) i arginaze 1 (Arg 1)] u bubregu te anti-angiogeni potencijal putem kvantitativnog mjerenja prožiljenosti tkiva jetre, bubrega i samog tumora.

Antikancerogene učinke resveratrola i njegovih nanokristala na rast EAT u solidnom obliku utvrdili smo mjerenjem promjene volumena tumora i tjelesne mase miševa uz određivanje postotka inhibicije rasta tumora gdje je vidljivo da su primijenjeni spojevi pokazali statistički značajno smanjenje volumena u obje pokusne skupine (Slika 7) u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P \leq 0,001$ ). Rezultati promjene tjelesne mase (Slika 9) ukazuju na porast tjelesne mase u svim skupinama; najveći porast tjelesne mase zapažen je u kontrolnoj skupini dok je najmanji porast mase bio u skupini obrađenoj resveratrolom u dozi od 50 mg/kg. Skupine obrađene resveratrolom ili njegovim nanokristalima pokazale su i izrazito visok postotak inhibicije rasta stanica EAT (69% - 73,5%) što potvrđuje antikancerogene učinke resveratrola i njegovih nanokristala (Slike 7, 8 i 9). Intratumoralna obrada i poboljšanje fizičko-kemijskih i biofarmaceutskih značajki resveratrola kao nanokristala nisu pokazala učinkovitiji antikancerogeni odgovor od resveratrola. Dobiveni podaci su u skladu s literaturnim podacima *in vitro* i *in vivo* istraživanja (Rauf i sur., 2018; Han i sur., 2019) koja ukazuju na antiproliferacijski, antikancerogeni i kemoprevencijski učinak resveratrola na brojne limfoidne i mijeloidne tumore, tumor dojke, prostate, kolona, pankreasa, pluća, jajnika i cerviksa te melanom. Neki od mehanizama antikancerogenog djelovanja resveratrola su nejasni, ali uključuju antioksidacijski učinak i sposobnost neutraliziranja slobodnih radikala, protuupalni učinak, inhibiciju stanične proliferacije, indukciju apoptoze i nekroze te inhibiciju enzima poput ribonukleotid reduktaze, DNA polimeraze, DNA topoizomeraze i protein kinaze C (PKC) uz smanjenje ekspresije VEGF-a i povećanje imunomodulacije preko citokinske mreže, posebice

INF- $\gamma$ . Resveratrol također ima učinak na ekspresiju CYP450 i metabolizam kancerogena te inhibiciju glikolitičkih enzima što igra ključnu ulogu u inhibiciji procesa karcinogeneze. U inhibiciji karcinogeneze resveratrol djeluje na sve faze karcinogeneze; inhibira proces inicijacije, promocije i progresije (Summerlin i sur., 2015). Prema dostupnoj literaturi, resveratrol svoj antikancerogeni učinak ispoljava kroz višestruke mehanizme koji uključuju proapoptotičko, antiproliferativno, protuupalno i anti-angiogenetsko djelovanje. Ciljna molekula djelovanja resveratrola je TANK-vezna kinaza 1 (engl. *Serine/threonine-protein kinase*, TBK1), pokazatelj mnogih kroničnih upalnih procesa koji mogu dovesti do razvoja tumora (Singh i sur., 2015). Antikancerogena aktivnost resveratrola temelji se na regulaciji razine reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), modulaciji signalnih putova, aktivaciji apoptoze te inhibiciji staničnog ciklusa (Summerlin i sur., 2015). Nadalje, mogući kemoprotektivni učinak resveratrola rezultat je inhibicije kinon-reduktaze 2 (NQO2) koja sudjeluje u regulaciji ekspresije staničnih antioksidacijskih i detoksifikacijskih enzima te na taj način poboljšava staničnu otpornost na oksidacijski stres. Resveratrol također povećava aktivnost SIRT-a (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylases*) vodeći do poboljšanja stanične otpornosti na stres. Zbog strukturne sličnosti s dietilstilbestrolom (sintetski oblik ženskog spolnog hormona estrogena), pripisuje mu se i mogućnost regulacije ekspresije hormon-ovisnih gena kao što je tumor supresor gen BRCA1 (Amri i sur., 2012). Nadalje, inhibicijski učinak resveratrola na progresiju estrogen pozitivnih i estrogen negativnih stanica raka dojke zabilježen je primjenom doze od 1 mM resveratrola. Zasigurno, ove mehanizme možemo pripisati i dobivenim rezultatima unutar našeg istraživanja (Slike 7, 8, 9 i 23).

Uz brojne ostale čimbenike, oksidacijski stres igra važnu ulogu u inicijaciji, promociji i progresiji tumora inducirajući oštećenje DNA i ometajući put prijenosa unutarstaničnog signala. Budući da antioksidacijski enzimi igraju ključnu ulogu u zaštiti stanica od oksidacijskog stresa, disregulacija ili oštećenja u aktivnosti antioksidacijskih enzima poput SOD i CAT povezuju se s tumorom (Khan i sur., 2010). Dosadašnja istraživanja pokazala su kako je resveratrol dobro sredstvo za uklanjanje hidroksila, superoksida i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Međutim, izravni antioksidacijski učinci resveratrola slabiji su od ostalih dobro utvrđenih antioksidanata kao što su primjerice askorbat i cistein (Bradamante i sur., 2004). Prema tome, zaštitni učinci resveratrola protiv oksidacijskih ozljeda vjerojatnije će se pripisati regulaciji endogenih staničnih antioksidacijskih sustava, a ne izravnoj aktivnosti uklanjanja ROS-a (Li i sur., 2012; Xia i sur., 2014).

Procjenu učinka resveratrola i njegovih nanokristala na antioksidacijsku sposobnost jetre i bubrega miševa ispitali smo mjerenjem ukupne razine proteina, MDA te aktivnosti antioksidacijskih enzima CAT, GSH i SOD.

Smanjenje aktivnosti endogenih antioksidacijskih enzima s pojačanim stvaranjem slobodnih radikala i MDA karakteristika je procesa karcinogeneze gdje je pokazano da je udio MDA kao krajnjeg produkta lipidne peroksidacije veći u tumorskom nego u normalnom tkivu (Szatrowski i Nathan, 1991). U našem radu istražili smo učinak resveratrola i nanokristala resveratrola na jetru i bubreg. Naša analiza razine lipidne peroksidacije u jetri pokazala je statistički značajno sniženu razinu MDA ( $P \leq 0,05$ ), CAT ( $P \leq 0,01$ ), GSH ( $P \leq 0,01$ ) i SOD aktivnosti ( $P \leq 0,01$ ) u skupini obrađenoj s resveratrolom u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu (Slike 12-15). Snižene razine CAT, GSH i SOD aktivnosti možemo pripisati prilagodbi stanica na antioksidacijsku sposobnost resveratrola u mikrookolišu jetre. Nadalje, zapažena je i statistički značajna razlika u razini MDA ( $P \leq 0,05$ ) i SOD aktivnosti ( $P \leq 0,05$ ) između resveratrola i nanokristala resveratrola (Slika 12) što ukazuje na bolje antioksidacijsko djelovanje resveratrola u odnosu na nanokristale. Zaštitni učinci na jetru potvrđeni su u brojnim istraživanjima, a temelje se na povećanju SOD, CAT i GSH-Px aktivnosti kao i ekspresiji Nrf2 uz linearno smanjenje jetrenih koncentracija MDA, Hsp70, Hsp90 i NF- $\kappa$ B (Faghihzadeh i sur., 2015).

Antioksidacijsko djelovanje resveratrola potvrđeno je i smanjenom razinom MDA kod bubrega (Slika 17) u odnosu na kontrolnu skupinu dok nije došlo do značajnih promjena u razini CAT, GSH i SOD aktivnosti (Slika 18,19,20). Otkriveno je da resveratrol utječe na brojne različite signalne molekule u stanicama bubrega: inhibira odgovor PDGF i TGF- $\beta$ 1 u mezangialnim i epitelnim stanicama, aktivira energetski senzor AMPK, povećava razinu SIRT1 (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylases*) i peroksisom proliferator-aktivirani receptor- $\gamma$  koaktivator-1  $\alpha$  (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$* , PGC-1 $\alpha$ ). Nadalje, resveratrol smanjuje oksidacijski stres, što pokazuje niža razina ROS i MDA te povećana aktivnost antioksidacijskih enzima uz poboljšanu biogenezu mitohondrija (Den Hartogh i Tsiani, 2019). Dobar učinak resveratrola i njegovih nanokristala na antioksidacijsku sposobnost može se pripisati njegovoj akumulaciji u tkivu jetre i bubrega. Primjerice, istraživanja pokazuju da oralni unos resveratrola u štakora rezultira detektabilnom

razinom resveratrola u plazmi i različitim tkivima s najvećom koncentracijom u jetri i bubregu (El-Mohsen i sur., 2006). Slično tome, pojedinačna intravenska primjena trans-resveratrola (15 mg/kg tjelesne težine) u štakora rezultirala je značajnom serumskom razinom (0,025  $\mu$ M), a ispitivanjem raspodjele resveratrola unutar tkiva utvrđena je najviša razina u bubregu (1,45 nmol/g) i plućima (1,13 nmol/g) (Juan i sur., 2010).

Unatoč izrazitom antioksidacijskom djelovanju koje se u većini slučajeva očituje u porastu razine antioksidacijskih enzima i inhibiciji lipidne peroksidacije, ravnoteža između antioksidacijskih i prooksidacijskih učinaka resveratrola i dalje je kontroverzna te ovisi o primijenjenoj dozi kao i vrsti stanica. Velik broj istraživanja pokazao je da resveratrol može djelovati kao antioksidans ili prooksidans ovisno o specifičnom mikrookolišu. Dvije glavne i suprotne funkcije ovog spoja odnose se na njegovu kemoprotektivnu aktivnost povezanu s antioksidacijskim učinkom kako bi se smanjilo oštećenje esencijalnih biomakromolekula te na njegov kemoterapijski potencijal povezan s indukcijom stvaranja ROS-a u stanicama tumora što posljedično vodi do njihove pojačane apoptoze (Muqbil i sur., 2012).

Pozitivne učinke resveratrola i njegovih nanokristala na jetru i bubreg potvrđuju i biokemijske odrednice seruma. Analiza biokemijskih odrednica pokazala je statistički značajne promjene u pojedinim enzimima i proteinima (Tablica 6) te metabolitima i supstratima (Tablica 7) iz seruma miševa. Obrada s resveratrolom u dozi od 50 mg/kg pokazala je statistički značajan utjecaj na povišenu razinu albumina u odnosu na skupinu obrađenu s nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg ( $P \leq 0,01$ ). Obrada s resveratrolom pokazala je i statistički značajan utjecaj na snižene razine alanin aminotransferaze u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P \leq 0,05$ ) i skupinu obrađenu s nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg ( $P \leq 0,05$ ) te na amilazu u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P \leq 0,05$ ) i skupinu obrađenu s nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg ( $P \leq 0,01$ ). Razine alkalne fosfataze, ukupnih proteina i globulina ostale su nepromijenjene. Obrada s nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg pokazala je značajan utjecaj na povišene razine fosfora i kalija u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P \leq 0,05$ ), a posebice je vidljiv značajan utjecaj resveratrola i njegovih nanokristala na kreatinin. Naime, u skupini obrađenoj resveratrolom u dozi od 50 mg/kg uočena je statistički značajno snižena razina kreatinina u odnosu na skupinu obrađenu nanokristalima resveratrola ( $P \leq 0,01$ ) što upućuje na protuupalno djelovanje ovog spoja, dok je obrada s nanokristalima resveratrola u dozi od 50

mg/kg pokazala statistički značajno povišenu razinu kreatinina u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P \leq 0,05$ ) što s druge strane upućuje na moguću toksičnost nanokristala korištenih u istraživanju.

Enzimi iz seruma predstavljaju važne dijagnostičke biljege oštećenja/zaštite jetre i bubrega u nositelja tumora nakon obrade te jasno ukazuju na stadij bolesti (Kathriya i sur., 2010). Dosadašnja istraživanja pokazala su kako tumorske stanice uzrokuju značajno oštećenje jetre te poremećaje u metabolizmu jetrenih stanica što može dovesti do promjena u aktivnosti enzima iz seruma (Dolai i sur., 2012). U našem istraživanju, resveratrol je djelovao na snižavanje razina određenih serumskih enzima čije su razine u kontrolnoj skupini povećane; posljedično nastale brojnim čimbenicima koje izlučuju stanice EAT te induciraju oštećenja tkiva i organa (ALT, AMY) ometajući njihovu fiziološku funkciju. Resveratrol i nanokristali resveratrola tako imaju zaštitni učinak na jetru i bubrege od toksičnih čimbenika tumorskih stanica.

U ovom istraživanju analizirana je i polarizacija makrofaga putem mjerenja aktivnosti dušikovog oksida (NO) i arginaze 1 (Arg 1) kako bi se stekao uvid u imunomodulatornu ulogu resveratrola. Naime, makrofagi igraju ključnu ulogu ne samo u obrani domaćina protiv bakterija, virusa i parazita, već i u obrani od tumorskih stanica. To su stanice urođenog imunološkog sustava koje imaju brojne fiziološke funkcije, a tumoru-pridruženi makrofagi (TAM) prisutni su u tumorskom mikrokolišu te imaju značajan utjecaj na formiranje, rast i metastaziranje tumora putem međureakcije s tumorskim stanicama. U početku se pretpostavljalo kako su makrofagi uključeni u protutumorski imunitet, ali se ispostavilo da mogu promovirati inicijaciju tumora, angiogenezu te da suprimiraju protutumorski imunitet tijekom zloćudne progresije (Qian i Pollard, 2010).

Njihovo višestruko djelovanje posljedica je reakcije na velik broj vanjskih podražaja i sposobnosti proizvodnje velikog broja efektorskih molekula potrebnih za međustaničnu komunikaciju, mikrobnu obranu te modulaciju upalnih reakcija putem kojih makrofagi potiču, suzbijaju ili moduliraju kako urođene, tako i adaptivne imunološke odgovore (Murray i Wynn, 2011). Regulacijski mehanizmi polarizacije makrofaga u M1 i M2 makrofage su suprotni, a u većini slučajeva klasično aktivirani M1 makrofagi uključeni su u upalni odgovor, uništavanje patogena i protutumorsku imunost, dok alternativno aktivirani M2 makrofagi utječu na protuupalni odgovor, zacjeljivanje rana i imaju prokarcinogene značajke. Makrofagi pronađeni u



tumoru (TAM) nalikuju M2 makrofagima te igraju značajnu ulogu u imunosupresiji i tumorskom imunološkom bijegu. M1 i M2 makrofage karakterizira metabolizam arginina putem dušik-oksida sintaze (NOS) ili arginaze s važnim funkcionalnim posljedicama. Arginin je prepoznat kao biološki prekursor nitrita/nitrata koji se oslobađa iz aktiviranih makrofaga te se prethodno spomenuta dva enzima bore upravo za supstrat arginin. M1 makrofagi eksprimiraju enzim iNOS koji metabolizira arginin u NO i citrulin. NO se može metabolizirati na daljnje nizvodne reaktivne dušikove vrste, dok se citrulin može ponovo upotrijebiti za učinkovitu sintezu NO putem ciklusa citrulin-NO. M2 makrofagi karakterizirani su eksprimiranjem enzima Arg 1 koji hidrolizira arginin u ornitin i ureu.

Put arginaze tako ograničava dostupnost arginina za sintezu NO, a sam ornitin može se dodatno uključiti u puteve sinteze poliamina i prolina važnih za staničnu proliferaciju i obnavljanje tkiva gdje je pokazano kako poliamini i njegovi metaboliti mogu inhibirati sintezu NO u makrofagima miševa i štakora (Rath i sur., 2014).

U tumoru NO ima dvostruku ulogu; uključen je u inicijaciju i progresiju tumora, ali također ograničava njegovu proliferaciju i invaziju te pridonosi protutumorskom imunološkom odgovoru. Važnost NO-a u nizu staničnih procesa određena je kroz strogu prostornu kontrolu i kontrolu doze na više razina putem njegove transkripcijske, post-translacijske i metaboličke regulacije (Keshet i Erez, 2018).

Osim što visoke razine NO mogu djelovati citotoksično na tumorske stanice, pokazano je da mogu imati i tumorigenu ulogu u različitim vrstama tumora, a jedan od pristupa liječenju je razvoj lijekova koji smanjuju prekomjernu razinu NO.

Makrofagi nazočni u različitim tkivima, primjerice u jetri, bubregu i slezeni mogu se pod utjecajem okolišnih čimbenika različito polarizirati. Tako primjerice bubreg, pod utjecajem antioksidacijskog mikrookoliša pokazuje bolju reparacijsku, regeneracijsku i protuupalnu aktivnost te blago povećanje M2 makrofagne funkcije. Naši rezultati su pokazali statistički nižu aktivnost NO kod skupine obrađene resveratrolom u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P \leq 0,05$ ) (Slika 21), dok rezultati spektrofotometrijskog određivanja enzimske aktivnosti Arg 1 u uzorcima tkiva bubrega ukazuju na značajno višu aktivnost Arg 1 kod iste

skupine u odnosu na kontrolu ( $P \leq 0,05$ ) (Slika 22). Rezultati ponovno potvrđuju protuupalno djelovanje resveratrola u tkivu bubrega.

Za rast solidnih tumora i njihovih pripadajućih metastaza od iznimne važnosti je odgovarajuća opskrba krvlju putem angiogeneze (Auerbach i sur., 1991). Proces angiogeneze u kojem se formiranje krvnih žila odvija iz već postojećih, uključuje složen slijed događaja. Uz odgovarajuću angiogenu stimulaciju, krvožilne endotelne stanice povećavaju svoju ekspresiju i lučenje MMP za razgradnju izvanstaničnog i tkivnog matriksa, povećava im se pokretljivost te se podvrgavaju povećanoj proliferaciji kako bi se dobio potreban broj endotelnih stanica za formiranje novih krvnih žila (Cao i sur., 2005).

Blokiranje razvoja novih krvnih žila posljedično dovodi do smanjene opskrbe kisikom i hranjivim tvarima što u konačnici znači smanjenje veličine tumora i pripadajućih metastaza. Inhibicija angiogeneze tako predstavlja važnu strategiju za liječenje solidnih tumora koja u osnovi ovisi o prekidu opskrbe krvlju mikro-regijama tumora, što rezultira pan-hipoksijom i pan-nekrozom u čvrstim tumorskim tkivima. Različita aktivacija angiogeneze između normalnog i tumorskog tkiva čini ovaj postupak atraktivnim ciljem za otkrivanje novih antikancerogenih lijekova. Za resveratrol je pokazano kako snažno djeluje na inhibiciju proliferacije endotelnih stanica i aktivnost matriks-metaloproteinaze 2 (MMP2) koja je potrebna za remodeliranje ECM-a i cjelokupan proces angiogeneze, a isto tako inhibira izlučivanje VEGF-a te akumulaciju hipoksijom inducirano čimbenika 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) (Khalid i sur., 2016).

Naši rezultati histološke analize kvantitativnog mjerenja prožiljenosti i mikrožilne gustoće (MVD) potvrđuju literaturne činjenice pokazujući statistički značajno smanjeni broj krvnih žila u svim tkivima bubrega, jetre i tumora. U uzorcima tkiva jetre i tumora uočena je statistički značajno smanjena vrijednost broja krvnih žila u skupini obrađenoj s nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P \leq 0,01$ ;  $P \leq 0,05$ ), dok je u uzorcima tkiva bubrega uočeno smanjenje broja krvnih žila u skupini obrađenoj resveratrolom u dozi od 50 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P \leq 0,05$ ) (Slike 23-28). Čini se da na više proliferativna tkiva, primjerice tumor i jetru, nanokristali pokazuju veći anti-angiogeni učinak u odnosu na manje proliferativno tkivo kao što je bubreg. Rezultati smanjene angiogeneze i MVD u ispitivanim tkivima zasigurno ukazuju na anti-angiogeni učinak resveratrola *in vivo* što je u

sukladu s dosadašnjim istraživanjima, a ovakav model angiogeneze prouzročen *sc* unosom EAT stanica pokazao se odličnim za ispitivanje učinaka resveratrola na inhibiciju rasta tumorskih stanica.

Dobiveni rezultati mogu se protumačiti uzimajući u obzir i prirodu Ehrlichovog ascitesnog tumora koju su opisali Čulo i sur. (1978). EAT je slabo diferencirani i brzorastući zloćudni tumor izvorno nastao u miša i to spontano iz mliječne žlijezde. Predstavlja visoko transplantabilni tumor i uspješno je transplantiran u gotovo svim poznatim sojevima miša. Nakon intraperitonealne inokulacije EAT brzo raste u ascitnom obliku, ali lako može nastaviti u smjeru rasta prema u solidnom obliku subkutanom ili intramuskularnom inokulacijom i to kada je broj inokuliranih stanica ispod kritične razine potrebne za razvoj ascitesne forme ( $1 \times 10^6$  ili manje).

Pojava solidnog tumora pokazala se ovisnom o razini imunološke reaktivnosti primatelja gdje dosadašnji podaci govore da su tumorske stanice koje rastu u subkutanom prostoru otpornije na djelovanje imunoloških čimbenika domaćina od onih koje rastu u intraperitonealnoj šupljini. Razlog za to može biti čiste anatomske prirode, tj. antitijela ili imunološke stanice nisu u mogućnosti doći do tumorskih stanica u subkutanim ekstravaskularnim prostorima, ali i činjenice da je nivo imunokompetentnih stanica u tom prostoru niži nego u intraperitonealnoj šupljini. Drugo objašnjenje za veću imunološku otpornost EAT stanica koje rastu u subkutanom tkivu može biti prekomjerna akumulacija supresivnih tvari koje luče tumorske stanice u samom tumoru. Pokazalo se da ove tvari sprečavaju upalnu reakciju u blizini tumorskih stanica, omogućavajući im progresivni rast usprkos neispravnom sustavnom imunitetu.

Uz značajnu otpornost solidnog tumora, u obzir treba uzeti i problem ranije spomenute bioraspoloživosti resveratrola. Osim izbora učinkovite doze u primjeni ovog spoja, zabrinutost u pogledu bioraspoloživosti i postizanje učinkovite koncentracije u plazmi služi kao potencijalni nedostatak za postizanje željenih terapijskih ishoda budući da je niska bioraspoloživost resveratrola svakako čimbenik koji utječe na njegovu smanjenu učinkovitost. S obzirom da je terapija tumora resveratrolom ili nanokristalima primijenjena *it*, ova razlika u biodostupnosti nije imala značajnijeg učinka osim duže nazočnosti unutar tumorskog tkiva što bi mogla biti posljedica učinkovitijeg anti-angiogenog učinka nanokristala u odnosu na resveratrol. Točnije, iako bioraspoloživost resveratrola može biti niska, istraživanja su ipak utvrdila da razina

resveratrola i njegovih metabolita u plazmi ima mikromolarni raspon, a ispitivanja *in vitro* potvrdila su da mikromolarna razina resveratrola inducira različite biološke učinke i modulira stanične signalne putove te ekspresiju gena (Den Hartogh i Tsiani, 2019).

To sve, uz činjenicu izrazite heterogenosti EAT tumora s populacijama stanica različite osjetljivosti predstavlja veliki izazov u određivanju optimalnog doziranja resveratrola za postizanje što boljeg antioksidacijskog, anti-angiogenog i antikancerogenog učinka. Ipak, na temelju dobivenih rezultata možemo ustanoviti da resveratrol i njegovi nanokristali djeluju inhibicijski na stanice EAT tumora te posjeduju izraziti anti-angiogeni potencijal pri čemu se antikancerogena djelotvornost resveratrola temelji na inhibiciji proliferacije stanica EAT, protuupalnom i anti-angiogenom učinku. Nadalje, dobiveni rezultati analize biokemijskih odrednica ukazuju da intratumoralna obrada resveratrolom ili nanokristalima resveratrola nije polučila toksični učinak nanokristala na bubrege i jetru. Smanjenje oksidacijskog stresa, što pokazuju niže razine ROS-a i MDA u tkivu jetre i bubrega, potvrđuje antioksidacijski i protuupalni učinak resveratrola.

## 5. ZAKLJUČAK

Rezultati dobiveni provedenim istraživanjem ukazuju na sljedeće:

1. Smanjeni volumen solidnog tumora i inhibicija rasta tumora potvrđuju antikancerogeno djelovanje resveratrola i njegovih nanokristala na rast solidnog oblika Ehrlichovog ascitesnog tumora.
2. Rezultati smanjenja angiogeneze i mikrožilne gustoće u tkivu tumora, jetre i bubrega utvrđuju anti-angiogeni potencijal resveratrola *in vivo*.
3. Resveratrol je djelotvoran antioksidans; razina ROS-a u stanicama jetre i bubrega je smanjena u odnosu na kontrolnu skupinu.
4. Protuupalni i antioksidacijski učinak resveratrola i njegovih nanokristala potvrđen je smanjenjem razine NO te povećanjem aktivnosti arginaze 1 u tkivu bubrega.
5. Analiza biokemijskih odrednica potvrđuje zaštitni učinak resveratrola i njegovih nanokristala na jetru i bubreg.
6. Sažimajući navedeno, resveratrol i njegovi nanokristali primijenjeni intratumoralno uspješno inhibiraju rast i angiogenezu solidnog oblika Ehrlichovog ascitesnog tumora te zaštitno djeluju na jetru i bubreg kroz antioksidacijsku i protuupalnu aktivnost.

## 6. LITERATURA

Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**:121-126.

Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* **24**(5A):2783-2840.

Alarco´ n de la Lastra C, Villegas I. 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans.* **35**(5):1156-1160.

Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. 2008. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm.* **5**(4):505-515.

Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C. 2012. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations?. *J Control Release.* **158**(2):182-193.

Auerbach R, Auerbach W, Polakowski I. 1991. Assays for angiogenesis: a review. *Pharmacol Ther.* **51**:1–11.

Baba AI, Cătoi C. 2007. Comparative Oncology. Bucharest (RO): The Publishing House of the Romanian Academy; Chapter 3, Tumor Cell Morphology. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9553/>

Bagchi D, Das DK, Tosaki A, Bagchi M and Kothari SC. 2001. Benefits of resveratrol in women's health. *Drugs Exp Clin Res.* **27**(5-6):233-248.

Barradas-Bautista D, Alvarado-Mentado M, Agostino M, Cocho G. 2018. Cancer growth and metastasis as a metaphor of Go gaming: An Ising model approach. *PLoS ONE.* **13**(5):e0195654

Beatty GL, Gladney WL. 2015. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* **21**(4):687–692.

Bertram JS. 2000. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med.* **21**(6):167-223.

Bhullar KS, Hubbard BP. 2015. Lifespan and healthspan extension by resveratrol. *Biochim Biophys Acta.* **1852**(6):1209–1218.

- Bielenberg DR, Zetter BR. 2015. The Contribution of angiogenesis to the process of metastasis. *Cancer J.* **21**(4):267–273.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* **5**(1):9-19.
- Biswas AK, Islam MR, et al. 2014. Nanotechnology based approaches in cancer therapeutics. *Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol.* **5**:1-11.
- Bonferoni MC, Rossi S, Sandri G, Ferrari F. 2017. Nanoparticle formulations to enhance tumor targeting of poorly soluble polyphenols with potential anticancer properties. *Semin Cancer Biol.* **46**:205–14.
- Bradamante S, Barenghi L, Villa A. 2004. Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc Drug Rev.* **22**:169–188.
- Cao Y, Fu Z-D, Wang F, Liu H-Y, Han R. 2005. Anti-angiogenic activity of resveratrol, a natural compound from medicinal plants. *J Asian Nat Prod Res.* **7**(3):205–213.
- Carter LG, D'Orazio JA, Pearson KJ. 2014. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocr Relat Cancer.* **21**:209-225.
- Casey SC, Amedei A, Aquilano K, Azmi AS, Benencia F, Bhakta D, Bilsland AE, Boosani CS, Chen S, Ciriolo MR et al. 2015. Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol.* **35**:S199–S223.
- Cooper GM. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; The development and causes of cancer. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
- Čulo F, Allegretti N, Marušić M. 1978. Ascitic versus Solid Growth of Ehrlich Ascites Tumor Influenced by Immunological Factors. *Oncology.* **35**(1):15–21.
- Davidov-Pardo G, McClements DJ. 2015. Nutraceutical delivery systems: resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chem.* **167**:205-212.

- De la Lastra CA, Villegas I. 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: Mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans.* **35**:1156–1160.
- Den Hartogh DJ, Tsiani E. 2019. Health Benefits of Resveratrol in Kidney Disease: Evidence from In Vitro and In Vivo Studies. *Nutrients.* **11**(7):1-32.
- Devi PU. 2004. Basics of carcinogenesis. *Health Adm.* **1**:16-24.
- Dimova I, Popivanov G, Djonov V. 2014. Angiogenesis in cancer - general pathways and their therapeutic implications, *J BUON.* **19**(1):15–21.
- Dolai N, Karmakar I, Suresh Kumar RB, Kar B, Bala A, Haldar PK. 2012. Evaluation of antitumor activity and *in vivo* antioxidant status of *Anthocephalus cadamba* on Ehrlich ascites carcinoma treated mice. *J Ethnopharmacol.* **142**:865–870.
- Duarte A, Martinho A, Luís Â, Figueiras A, Oleastro M, Domingues FC, Silva F. 2015. Resveratrol encapsulation with methyl- $\beta$ -cyclodextrin for antibacterial and antioxidant delivery applications. *Food Sci Technol.* **63**:1254–1260.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* **3**:991–998.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* **21**:137–148.
- Durackova Z. 2010. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res.* **59**(4):459-469.
- El-Mohsen MA, Bayele H, Kuhnle G, Gibson G, Debnam E et al. 2006. Distribution of [ $^3$ H] *trans*-resveratrol in rat tissues following oral administration. *Br J Nutr.* **96**:62–70.
- Faghihzadeh F, Hekmatdoost A, Adibi P. 2015. Resveratrol and liver: A systematic review. *J Res Med Sci.* **20**(8):797–810.
- Feitelson MA, Arzumanyan A, Kulathinal RJ et al. 2015. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin Cancer Biol.* **35**(Suppl):S25–S54.
- Flohé L, Otting F. 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol.* **105**:93-104.



- Fouad YA, Aanei C. 2017. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res.* **7**(5):1016–1036.
- Friedman AD, Claypool SE, Liu R. 2013. The smart targeting of nanoparticles. *Curr Pharm Des.* **19**(35):6315–6329.
- Fukumura D, Kloepper J, Amoozgar Z, Duda DG, Jain RK. 2018. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. *Nat Rev Clin Oncol.* **15**(5):325–340.
- Gambini G, Inglés M, Olaso G, et al. 2015. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* Article ID 837042, 13 pages, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/837042>.
- Gao ZW, Dong K, Zhang HZ. 2014. The roles of CD73 in cancer. *Biomed Res Int.* Volume 2014, Article ID 460654, 9 pages, <https://doi.org/10.1155/2014/460654>.
- Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P. 2005. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect.* **113**(11):1555–1560.
- Gill JG, Piskounova E, Morrison SJ. 2016. Cancer, oxidative stress, and metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **81**:163-175.
- Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. 2006.. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* **10**:1493-1505.
- Goubran HA, Kotb RR, Stakiw J, Emara ME, Burnouf T. 2014. Regulation of tumor growth and metastasis: the role of tumor microenvironment. *Cancer Growth Metastasis.* **7**:9–18.
- Griess P. (1879) Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt “Ueber einige azoverbindungen.” *Chem Ber.* **12**:426–428.
- Gülçin İ. 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innov. Food Sci Emerg Technol.* **11**(1):210–218.

- Hameed S, Bhattarai P, Dai Z. 2018. Nanotherapeutic approaches targeting angiogenesis and immune dysfunction in tumor microenvironment. *Sci China Life Sci.* **61**(4):380-391.
- Han Y, Jo H, Cho JH, Dhanasekaran DN, Song YS. 2019. Resveratrol as a Tumor-Suppressive Nutraceutical Modulating Tumor Microenvironment and Malignant Behaviors of Cancer. *Int J Mol Sci.* **20**(4):1-18.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* **144**:646–674.
- Hicklin DJ, Ellis LM. 2005. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol.* **23**(5):1011-1027.
- Hida, K, Maishi N, Annan DA, Hida Y. 2018. Contribution of tumor endothelial cells in cancer progression. *Int J Mol Sci.* **19**(1272):1-12.
- Hoshino J, Park EJ, Kondratyuk TP, Marler L, Pezzuto JM, van Breemen JB, Mo S, Li Y, Cushman M. 2010. Selective synthesis and biological evaluation of sulfateconjugated resveratrol metabolites. *J Med Chem.* **53**:5033–5043.
- Howitz, KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B and Sinclair DA. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* **425**(6954):191-196.
- Irving B. 2007. Nanoparticle drug delivery systems. *Inno Pharm Biotechnol.* **24**:58-62.
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* **275**(5297):218-220.
- Jayakumar T, Thomas PA, Geraldine P. 2007. Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Exp Gerontol.* **42**(3):183-191.
- Jiang J, Oberdorster G, Elder A, Gelein R, Mercer P, Biswas P. 2008. Does Nanoparticle Activity Depend upon Size and Crystal Phase?. *Nanotoxicology.* **2**(1):33–42.
- Juan ME, Maijó M, Planas JM. 2010. Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in rat plasma and tissues by HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* **51**(2):391-398.

- Juère E, Florek J, Bouchoucha M, Jambhrunkar S, Wong KY, Popat A, et al. 2017. In vitro dissolution, cellular membrane permeability, and anti-inflammatory response of resveratrol-encapsulated mesoporous silica nanoparticles. *Mol Pharm.* **14**(12):4431–4441.
- Kampa M, Nifli A-P, Notas G, Castanas E. 2007. Polyphenols and cancer cell growth. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **159**:79–113.
- Kathriya A, Das K, Kumar EP, Mathai KB. 2010. Evaluation of antitumor activity of *Oxalis corniculata* Linn. Against Ehrlich ascites carcinoma on mice. *Iran J Cancer Prev.* **4**:157–165.
- Keshet R, Erez A. 2018. Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. *Dis Model Mech.* **11**(8):1-11.
- Khalid EB, Ayman EE, Rahman H et al. 2016. Natural products against cancer angiogenesis. *Tumor Biol.* **37**(11):14513-14536.
- Khan MA, Tania M, Zhang DZ, Chen HC. 2010. Antioxidant enzymes and cancer. *Chin J Cancer Res.* **22**:87–92.
- Ko JH, Sethi G, Um JY, Shanmugam MK, Arfuso F, Kumar AP, Bishayee A, Ahn KS. 2017. The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* **18**(12): 2589.
- Kohane DS. 2007. Microparticles and nanoparticles for drug delivery. *Biotechnol Bioeng.* **96**(2):203–209.
- Kris-Etherton PM, Keen CL. 2002. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol.* **13**(1):41-49.
- Kundu JK, Surh YJ. 2008. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer Lett.* **269**(2):243-261.
- Lanz T, Tropf S, Marner FJ, Schröder J, Schröder G. 1991. The role of cysteines in polyketide synthases. Site-directed mutagenesis of resveratrol and chalcone synthases, two key enzymes in different plant-specific pathways. *J Biol Chem.* **266**(15):9971-9976.
- Li H, Xia N, Forstermann U. 2012. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. *Nitric Oxide.* **26**:102–110.
- Liou GY, Storz P. 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.* **44**(5):479–496.

- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 24.2, Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**(1):265-275.
- Malarkey DE, Hoenerhoff M, Maronpot RR. 2013. Carcinogenesis: mechanisms and manifestations. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology, Third Edition, 107–146.
- Martins LAM, Coelho BP, Behr G, Pettenuzzo LF, Souza ICC, Moreira JCF, Borojevic R, Gottfried C, Guma FCR. 2014. Resveratrol induces pro-oxidant effects and time-dependent resistance to cytotoxicity in activated hepatic stellate cells. *Cell Biochem Biophys.* **68**:247–257.
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N et al. 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* **10**:300-309.
- Mostafalou S, Mohammadi H, Ramazani A, Abdollahi M. 2013. Different biokinetics of nanomedicines linking to their toxicity; an overview. *Daru.* **21**(1):14.
- Mukherjee S, Dudley JI, Das DK. 2010. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose Response.* **8**(4):478–500.
- Muqbil I, Beck FW, Bao B, Sarkar FH, Mohammad RM, Hadi SM, Azmi AS. 2012. Old wine in a new bottle: the warburg effect and anticancer mechanisms of resveratrol. *Curr Pharm Des.* **18**:1645–1654.
- Murray PJ, Wynn TA. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage sub-sets. *Nat Rev Immunol.* **11**:723–737.
- Nag SA, Qin J, Srivenugopal KS, Wang M, Zhang R. 2013. The MDM2-p53 pathway revisited. *J Biomed Res.* **27**(4):254-271.
- Ndiaye M, Kumar R, Ahmad N. 2011. Resveratrol in cancer management: where are we and where we go from here?. *Ann N Y Acad Sci.* **1215**:144-149.
- Nussenbaum F, Herman IM. 2010. Tumor angiogenesis: Insights and innovations. *J Oncol.* Volume 2010, Article ID 132641, 24 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2010/132641>

- Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz P, Luis F, Lopes C. 2007. Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc.* **79**(4):593-616.
- Ozaslan M, Karagoz ID, Kilic IH and Guldur ME. 2011. Ehrlich ascites carcinoma. *Afr J Biotechnol.* **10**(13):2375-2378.
- Panzarini E, Inguscio V, Tenuzzo BA, Carata E, Dini L. 2013. Nanomaterials and autophagy: new insights in cancer treatment. *Cancers.* **5**(1):296–319.
- Peters A, Veronesi B, Calderon-Garciduenas L, Gehr P, Chen LC, Geiser M, Reed W, Rothen-Rutishauser B, Schurch S, Schulz H. 2006. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles – a critical update. *Part Fibre Toxicol.* **3**(13):1-13.
- Qian BZ, Pollard JW. 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* **141**:39–51.
- Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. 2014. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol.* **5**(532):1-11.
- Rauf A, Imran M, Butt MS, Nadeem M, Peters DG, Mubarak MS. 2018. Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **58**(9):1428-1447.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?. *Free Radic Biol Med.* **49**(11):1603–1616.
- Rizvi SAA, Saleh AM. 2018. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharm J.* **26**(1):64–70.
- Romero GB, Keck CM, Müller RH. 2016. Simple low-cost miniaturization approach for pharmaceutical nanocrystals production. *Int J Pharm.* **501**(1-2):236-244.
- Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update.* **4**(1):3-24.
- Sanchez-Perez Y, Carrasco-Legleu C, Garcia-Cuellar C. 2005. Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* **217**:25–32.

- Seleci M, Ag Seleci D, Jonczyk R, et al. 2016. Smart multifunctional nanoparticles in nanomedicine. *BioNanoMaterials*. **17**(1-2):33-41.
- Siddiqui IA, Sanna V, Ahmad N, Sechi M, Mukhtar H. 2015. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Ann N Y Acad Sci*. **1348**(1):20–31.
- Singh CK, Ndiaye MA, Ahmad N. 2015. Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation. *Biochim Biophys Acta*. **1852**(6):1178-1185.
- Singh G, Pai RS. 2014. Recent advances of resveratrol in nanostructured based delivery systems and in the management of HIV/AIDS. *J Control Release*. **194**:178–188.
- Singh R, Lillard JW, Jr. 2009. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol*. **86**(3):215–223.
- Singh SK, Makadia V, Sharma S, Rashid M, Shahi S, Mishra PR, ... Gayen JR. 2017. Preparation and in-vitro/in-vivo characterization of trans-resveratrol nanocrystals for oral administration. *Drug Deliv Transl Res*. **7**(3):395–407.
- Stivala LA, Savio M, Carafoli F, Perucca P, Bianchi L, Maga G, Forti L, Pagnoni UM, Albini A, Prosperi E, et al. 2001. Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J Biol Chem*. **276**(25):22586-22594.
- Summerlin, N, Soo E, Thakur S, Qu Z, Jambhrunkar S, Popat A. 2015. Resveratrol nanoformulations: Challenges and opportunities. *Int J Pharm*. **479**(2):282–290.
- Sutandyo, N. 2010. Nutritional carcinogenesis. *Acta Med Indones*. **42**(1):36-42.
- Szatrowski TP, Nathan CF. 1991. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res*. **51**:794–798.
- Tietze F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*. **27**(3):502–522.
- Visconti R, Grieco D. 2009. New insights on oxidative stress in cancer. *Curr Opin Drug Discov Devel*. **12**(2):240–245.

- Vitrac X, Desmoulière A, Brouillaud B, Krisa S, Deffieux G, Barthe N, Rosenbaum J, Méryllon JM. 2003. Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci.* **72**:2219–2233.
- Walle T. 2011. Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.* **1215**:9-15.
- Wang LH, Wu CF, Rajasekaran N, Shin YK. 2018. *Cell Physiol Biochem.* **51**(6):2647-2693.
- Weir B, Zhao X, Meyerson M. 2004. Somatic alterations in the human cancer genome. *Cancer Cell.* **6**(5):433-438.
- Whitlock NC, Baek SJ. 2012. The anticancer effects of resveratrol – Modulation of transcription factors. *Nutr Cancer.* **64**(4):493–502.
- Williams LD, Burdock GA, Edwards JA, Beck M, Bausch J. 2009. Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food Chem Toxicol.* **47**(9)2170–2182.
- Xia N, Forstermann U, Li H. 2014. Resveratrol as a gene regulator in the vasculature. *Curr Pharm Biotechnol.* **15**:401–408.
- Xia Y. 2014. Are we entering the nano era? *Angew Chem Int Edit.* **53**:12268–12271.
- Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Sharma V. 2015. Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors: A review. *J Clin Diagn Res.* **9**(6):XE01–XE05.
- Yang L, Watts DJ. 2005. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicol Lett.* **158**(2):122–132.
- Yu C, Shin YG, Chow A, Li Y, Kosmeder JW, Lee YS, Hirschelman WH, Pezzuto JM, Mehta RG, Van Breemen RB. 2002. Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Phar Res.* **19**:1907–1914.
- Zhang J, Han S, Zhang B, Zhang Y. 2014. Cancer immunology and cancer immunodiagnosis. *J Immunol Res.* 2014:725691. doi:10.1155/2014/725691
- Zolnik BS, Gonzalez-Fernandez A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. 2010. Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology.* **151**(2):458–465.

Zu Y, Zhang Y, Wang W, Zhao X, Han X, Wang K, et al. 2016. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of resveratrol-loaded carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Drug Deliv.* **23**(3):981–991.





# ŽIVOTOPIS

## Osobne informacije

Ime i prezime: Matea Tomašević

Datum rođenja: 16.01.1996.

## Obrazovanje

- 2017.-2020.** Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek  
Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalna biologija, modul: Fiziologija i imunobiologija
- 2014.-2017.** Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek  
Odjel za biologiju  
Preddiplomski sveučilišni studij Biologije
- 2010.-2014.** Opća gimnazija Požega

## Laboratorijska stručna praksa

### **lipanj i srpanj 2019.**

*Klinika za tumore, Odjel za onkološku patologiju i kliničku citologiju, Zagreb*

- Laboratorijska stručna praksa u sklopu izrade diplomskog rada (pod voditeljstvom dr. sc. Snježane Ramić)
- obrada uzorka (uklapanje tkiva u parafin, rezanje), imunohistokemija, mikroskopiranje

### **ožujak 2018. – srpanj 2018.**

*Prirodoslovno matematički fakultet, Zavod za animalnu fiziologiju, Zagreb*

- Laboratorijska stručna praksa (pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Ane Galov)
- izolacija DNA iz tkiva životinja, PCR, elektroforeza

**Radno iskustvo:**

**siječanj 2020. -**

*Poliklinika Breyer, Genetički laboratorij*

- Nifty – neinvazivni prenatalni test probira
- separacija plazme, izolacija DNA, PCR, kvantifikacija, sekvenciranje nove generacije (NGS)

**svibanj 2019. – srpanj 2019.**

*CCC Arena Park, Zagreb*

- Pomoćni radnik (studentski posao)

**rujan 2018. – studeni 2019.**

*Terranova Arena Centar, Zagreb*

- Pomoćni radnik u trgovini maloprodaje (studentski posao)