

Učinak resveratrola na antioksidacijski kapacitet u plazmi kardiovaskularnih bolesnika

Gmižić, Daria

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:111955>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-28**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Daria Gmižić

**Učinak resveratrola na antioksidacijski
kapacitet u plazmi kardiovaskularnih
bolesnika**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Daria Gmižić

**Effect of resveratrol on antioxidant capacity
in plasma of patients with cardiovascular
disease**

Master thesis

Zagreb, 2021.

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

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Dubravki Rašić, znanstvenoj suradnici, na svojoj pomoći u izradi ovog diplomskog rada.

Dr. sc. Dubravka Rašić me je svojim objašnjenjima i komentarima aktivno usmjeravala prilikom istraživanja i izrade diplomskog rada, te svojim razumijevanjem doprinijela da ovo za mene bude lijepo znanstveno iskustvo.

Zahvaljujem joj na svom vremenu, angažmanu vikendima i na godišnjem odmoru, kojima je omogućila da ovaj rad dovršim u željenom roku.

Posebna zahvala ide mom profesoru dr. sc. Domagoju Đikiću na zanimljivim predavanjima tokom studija kojima je probudio moj interes za toksikologiju, te strpljenju u procesu izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Jedinici za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada na njihovoj ljubaznosti i na prilici da sudjelujem u istraživanju u njihovim prostorima, bez čega ne bi bilo ovog diplomskog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Učinak resveratrola na antioksidacijski kapacitet u plazmi kardiovaskularnih bolesnika

Daria Gmižić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Resveratrol je poznati antioksidans pronađen u vinu, bobičastom voću i kikirikiju i pripisuje mu se zaštitnički učinak na ljudski organizam. Njegova biosinteza potaknuta je stresnim uvjetima poput napada patogena i UV zračenja. U ovom diplomskom radu metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) izmjerena je koncentracija resveratrola u plazmi kardiovaskularnih bolesnika predviđenih za operaciju koji su uzimali resveratrol ili placebo u kapsulama dva puta na dan od ukupno 800 mg po danu. Krv je uzorkovana tijekom i nakon operacije. Također, u uzorcima plazme pacijenata koji su primali resveratrol i u kontrolnim uzorcima FRAP metodom spektrofotometrijski je izmjeren antioksidacijski kapacitet plazme. Izmjerena koncentracija resveratrola je niska u odnosu na primljenu dozu što ukazuje na nisku bioraspoloživost resveratrola zbog njegovog ekstenzivnog metabolizma. Dobiveni visoki koeficijenti varijacije koncentracije resveratrola ukazuju na razlike među ispitanicima u sastavu crijevne mikrobiote, genetičkom polimorfizmu u enzimima faze II. metabolizma i cirkadijanom ritmu. Antioksidacijski kapacitet plazme statistički je pozitivno koreliran s koncentracijom resveratrola. Antioksidacijski kapacitet plazme nakon operacije je bio statistički niži u uzorcima plazme ljudi tretiranih resveratrolom u odnosu na tretirane placeboom što ukazuje na nespecifičnost FRAP metode stoga, za potpuniji uvid u učinak resveratrola na antioksidacijski kapacitet trebalo bi se primijeniti i druge metode mjerenja antioksidativne aktivnosti.

(50 stranica, 12 slika, 2 tablice, 68 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: stilben, fitoaleksin, antioksidans, oksidacijski stres, vino, FRAP

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

Suvoditelj: dr. sc. Domagoj Đikić, red. prof.

Ocjenitelji: dr. sc. Domagoj Đikić, red. prof.

dr. sc. Sandra Radić Brkanac, izv. prof.

dr. sc. Ivan Čanjevac, doc.

dr. sc. Alan Moro, red. prof.

Rad prihvaćen: 17. veljače 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Effect of resveratrol on antioxidant capacity in plasma of patients with cardiovascular disease

Daria Gmižić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Resveratrol is a known antioxidant found in wine, berries, and peanuts and is credited with a protective effect on the human body. Its biosynthesis is induced by stressful conditions such as pathogen attacks and UV radiation. In this master's thesis, the plasma concentration of resveratrol in cardiovascular patients scheduled for surgery, who took a total of 800 mg of resveratrol or placebo per day via twice a day capsules, was measured by high performance liquid chromatography (HPLC). Blood was sampled during and after surgery. Also, in both plasma samples of patients who were receiving resveratrol, and in control samples, plasma antioxidant capacity was measured spectrophotometrically by the FRAP method. The measured resveratrol concentration was low in relation to the received dose, which indicated the low bioavailability of resveratrol due to its extensive metabolism. The obtained high coefficients of variation of resveratrol concentration indicated differences among the subjects in the composition of the intestinal microbiota, genetic polymorphism in enzymes of phase II metabolism, and circadian rhythm. The plasma antioxidant capacity showed a statistically positive correlation with resveratrol concentration. However, plasma antioxidant capacity after surgery was statistically lower in plasma samples of people treated with resveratrol compared to those treated with a placebo. This indicated nonspecificity of the FRAP method. Therefore, for a more complete insight into the effect of resveratrol on antioxidant capacity, other methods of measuring antioxidant activity should be used.

(50 pages, 12 figures, 2 tables, 68 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: stilbene, phytoalexin, antioxidant, oxidative stress, wine, FRAP

Supervisor: D. Sc. Dubravka Rašić, R. A.

Co-supervisor: D. Sc. Domagoj Đikić, Prof.

Reviewers: D. Sc. Domagoj Đikić, Prof.

D. Sc. Sandra Radić Brkanac, Prof.

D. Sc. Ivan Čanjevac, Asst. Prof.

D. Sc. Alan Moro, Prof.

Thesis accepted: 17th February 2021.

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Resveratrol	2
1.2. Biosinteza resveratrola	4
1.3. Farmakokinetika resveratrola	5
1.4. Resveratrol u vinu	7
1.5. Oksidacijski stres	8
1.6. Biološka svojstva resveratrola	9
1.6.1. Antioksidacijska svojstva resveratrola	10
1.6.2. Kardioprotektivna svojstva resveratrola	11
1.7. Cilj istraživanja	13
2. MATERIJALI I METODE	14
2.1. Kemikalije	15
2.2. Instrumenti	15
2.3. Biološki uzorci	16
2.4. Mjerenje koncentracije resveratrola	17
2.4.1. Priprema otopina i baždarni dijagram	17
2.4.2. Priprema uzoraka	18
2.4.3. HPLC analiza uzoraka	19
2.4.4. Validacija metode	20
2.5. Mjerenje antioksidacijskog kapaciteta plazme metodom plazmine sposobnosti redukcije željezovog (III) iona (FRAP metoda)	21
2.5.1. Priprema otopina i baždarnog dijagrama	21
2.5.2. Spektrofotometrijska analiza antioksidacijskog kapaciteta plazme	23
2.6. Statistička obrada podataka	24
3. REZULTATI	25

3.1. Koncentracija resvetrola	26
3.2. Antioksidacijski kapacitet plazme izmjeren FRAP metodom	29
3.3. Korelacija između koncentracije RSV-a i antioksidacijskog kapaciteta plazme izmjerenog FRAP metodom	31
4. RASPRAVA	33
5. ZAKLJUČAK	39
6. LITERATURA	41
7. ŽIVOTOPIS	49

POPIS KRATICA:

ABTS – diamonijeva sol

ADP – adenzin difosfat

AMPK – proteinska kinaza aktivirana adenzinom monofosfatom (engl. *5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*)

CoA – koenzim A

COX 1 – ciklooksigenaza 1

COX 2 – ciklooksigenaza 2

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic acid*)

FRAP – plazmina sposobnost redukcije željezovog (III) iona (engl. *Ferric reducing ability of plasma*)

GCLC – katalitička podjedinica glutamat cistein ligaze

HDL – lipoprotein visoke gustoće (engl. *High density lipoprotein*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)

ICAM-1 – međustanična adhezijska molekula 1 (engl. *Intercellular adhesion molecule-1*)

LDL – lipoprotein niske gustoće (engl. *Low density lipoprotein*)

LOD – granica detekcije (engl. *Limit of detection*)

LOOH – lipidni hidroperoksid

LOQ – granica kvantifikacije (engl. *Limit of quantification*)

MDA – malondialdehid

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NF - κB – nuklearni faktori kappa B

NrF2 – nuklearni transkripcijski faktor 2

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (engl. *Reactive oxygen species*)

RSV – resveratrol (3,4',5-trihidroksi-trans-stilben)

SIRT1 – nikotinamid adenin dinukleotid ovisna deacetilaza, sirtuin 1(engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide dependent deacetylase, sirtuin-1*)

TPTZ – 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin

VCAM-1 – vaskularna stanična adhezijska molekula 1 (engl. *Vascular cell adhesion molecule-1*)

1. UVOD

1.1. Resveratrol

Resveratrol (3,4',5-trihidroksi-trans-stilben, RSV) je polifenol detektiran u 72 biljke filogenetski raspoređene u 12 porodica i 31 rod (Generalić Mekinić i sur.). Pronađen je u vinovoj lozi (*Vitis vinifera* L.), kikirikiju (*Arachis hypogaea* L.), pistaciju (*Pistacia vera* L.), bobičastom voću poput borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.) i brusnice (*Vaccinium oxycoccus* L.) i drugdje (Tokuşoğlu i sur. 2005, Može i sur. 2011, Borowska i sur. 2009). Prvi put ga je izolirao Takaoka 1939. godine iz korijena čemerike (*Veratrum grandiflorum* L.) te se pretpostavlja da je dobio ime po resorcinolu koji je također izoliran iz *Veratrum* roda (Takaoka 1939, Weiskirchen i Weiskirchen 2016).

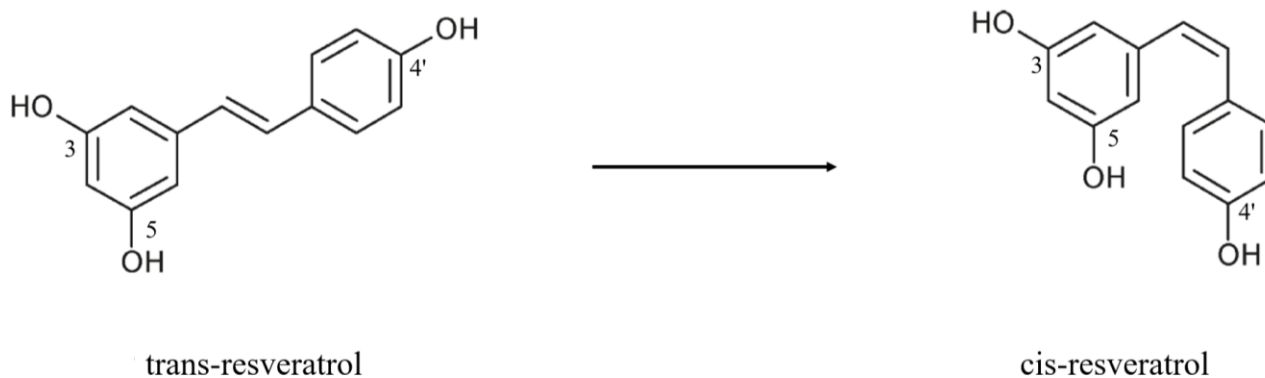
RSV se još od davnina koristi kao aktivan sastojak u mnogim tradicionalnim biljnim pripravcima. U tradicionalnoj orijentalnoj medicini se od sušenog korijenja i rizoma čemerike radi biljni pripravak koji se koristi kao lijek za žuticu, malariju, proljev i glavobolju (Weiskirchen i Weiskirchen 2016). Nadalje, od biljke japanski dvornik (*Polygonum cuspidatum* Sieb. i Zucc.) pripravlja se čaj „kojo-kon“ koji se koristi za liječenje ateroskleroze, hiperlipidije, dermatitisa, favusa, alergija, upala i ostalo (Siemann i Creasy 1992). Japanski dvornik je autohtona biljka istočne Azije u kojoj je pronađena najveća koncentracija RSV-a, a danas je rasprostranjena i klasificirana kao invazivna vrsta u Americi i Europi pa tako i u Hrvatskoj (Weiskirchen i Weiskirchen 2016, Vuković i sur. 2016).

Od svih biljaka u kojima je detektiran najveća pažnja posvećena je vinovoj lozi (*Vitis vinifera* L.), odnosno grožđu i vinu, budući da je interes za samu molekulu porastao 1990-ih nakon otkrića uloge vina u „francuskom paradoksu“. Naime, u Francuskoj je primijećena 40% manja smrtnost od kardiovaskularnih bolesti u odnosu na druge industrijalizirane države unatoč podjednakom indeksu tjelesne mase, krvnom tlaku, postotku pušača i drugo. Multivarijantna analiza pokazala je da su unos mliječnih masnoća i konzumacija vina jedino povezani sa smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti, gdje je unos mliječnih masnoća pozitivno koreliran, a konzumacija vina negativno korelirana. Dok je unos mliječnih masnoća podjednak u svim promatranim državama, konzumacija vina je veća u Francuskoj, stoga se smatra da vino ima ulogu u zaštiti od kardiovaskularnih bolesti (Renaud i De Lorgeril 1992). Osim zbog zaštite od

kardiovaskularnih bolesti, RSV se istražuje zbog njegovih antioksidacijskih, antitumornih i protuupalnih svojstva (Fernández-Mar i sur. 2012).

Osim polifenolima, RSV pripada fitoaleksinima, sekundarnim biljnim metabolitima niske molekularne mase čija sinteza u biljaka je potaknuta stresnim uvjetima poput UV zračenja, fluktuacija temperature, ozljeda i napada patogena poput bakterija i gljivica, stoga se i javljaju u većim koncentracijama na mjestima gdje su uvjeti takvi (Hao i He 2004, Siemann i Creasy 1992). RSV omogućuje adaptaciju biljaka na takve uvjete i doprinosi njihovoj zaštiti od patogena (Hao i He 2004).

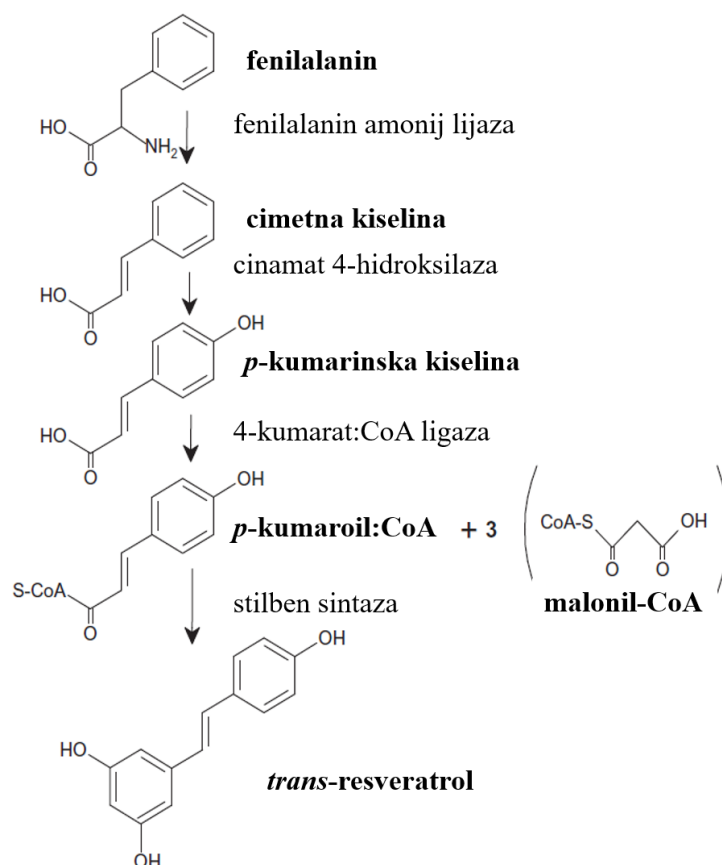
RSV ima stilbensku C6-C2-C6 strukturu koja sadrži dva fenolna prstena povezana stirenskom dvostrukom vezom koja omogućava postojanje trans- i cis-stereoizomera (**slika 1**, Pandey i Rizvi 2011). RSV se u prirodi pojavljuje kao trans- i kao cis-stereoizomer, međutim trans-stereoizomer se pojavljuje češće i smatra se sterički stabilnijim i biološki aktivnijim (Morris i suradnici 2015, Juškaite i suradnici 2017). RSV se smatra izrazito fotosjetljivim budući da više od 80% trans-RSV iz otopine izložene sunčevom zračenju prelazi fotoizomerizacijom u cis-RSV (Neves i sur. 2012). Odjeljivanje u HPLC sustavu s UV detektorom omogućeno je različitim maksimumom apsorpcije koji je za trans-RSV na 303 nm, a za cis-RSV na 288 nm (Sato i sur. 1997).



Slika 1. Prikaz strukture i fotoizomerizacije resveratrola (prilagođeno prema Jensen i sur. 2010).

1.2. Biosinteza resveratrola

Biosinteza RSV-a započinje iz fenilalanina koji nastaje putem šikiminske kiseline iz eritroze-4-fosfata i fosfoenolpiruvata (**slika 2**). Četiri su ključna enzima koji sudjeluju u njegovoj biosintezi: fenilalanin amonij lijaza, cinamat 4-hidroksilaza, 4-kumarat:CoA ligaza i stilben sintaza. Fenilalanin amonij lijaza deaminira fenilalanin tvoreći pritom cimetnu kiselinu. Cinamat 4-hidroksilaza katalizira vezanje hidroksilne skupine na para položaj fenolnog prstena cimetne kiseline i tvori p-kumarinsku kiselinu. Enzim 4-kumarat:CoA ligaza katalizira vezanje tioesterskom vezom CoA na karboksilnu skupinu p-kumarinske kiseline i tvori p-kumaroil:CoA. Stilben sintaza katalizira vezanje p-kumaroil:CoA s tri molekule malonil-CoA i nastaje trans-RSV (Ferrer i sur. 2008). Biosinteza spomenutih enzima je inducirana izlaganjem biotičkom ili abiotičkom stresu poput UV zračenja, napada patogena, kemijskim tvarima i drugo (Fritzemeier i Kindl 1981, Fernández-Mar i sur. 2012)



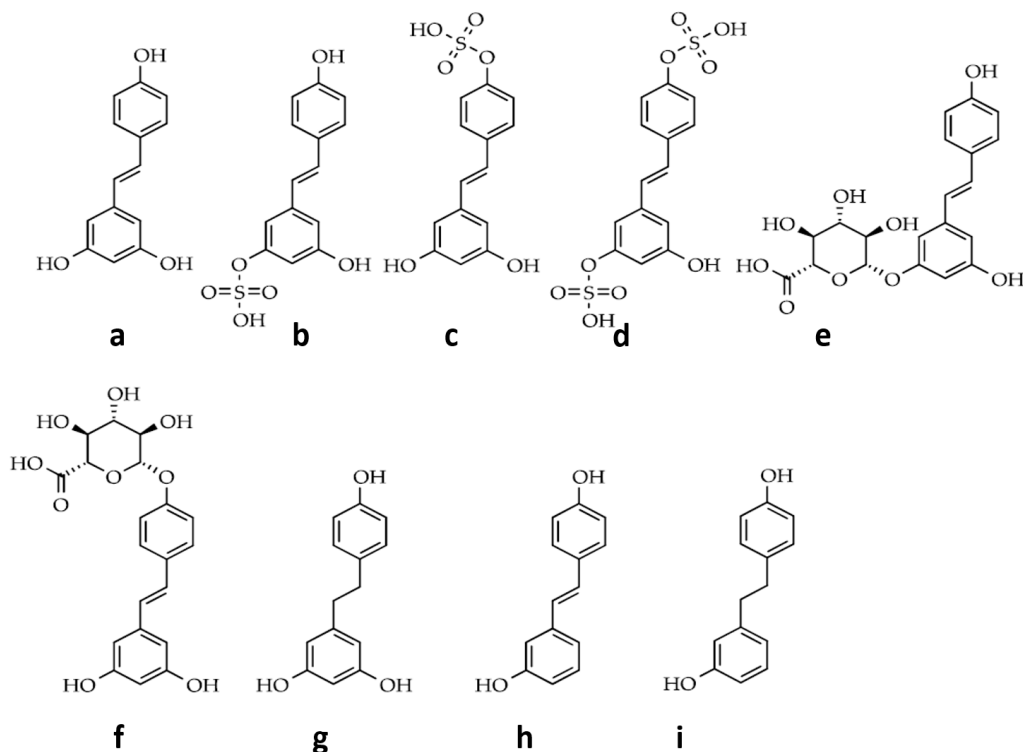
Slika 2. Biosintetski put trans-resveratrola (prilagođeno prema Fernández-Mar i sur. 2012)

1.3. Farmakokinetika resveratrola

Mnoga istraživanja pokazuju nisku bioraspoloživost RSV-a unatoč visokoj apsorpciji. RSV je lipofilan spoj, ali zbog njegove niske molekularne mase može pasivno prolaziti kroz membranu. Oko 70 % oralno unesenog RSV-a apsorbira se pasivnom difuzijom u gastrointestinalnom traktu gdje prolazi kroz brzu i ekstenzivnu biotransformaciju te se distribuira do različitih organa (Walle i sur. 2004). U enterocitima većina RSV-a prolazi konjugaciju, odnosno fazu II. metabolizma te se glukoronidira i sulfatira pri čemu nastaju njegovi glavni metaboliti prikazani na **slici 3 (a - f)**, a tek 1,5 % RSV-a ostane nekonjugiran. Primijećena je varijacija među vrstama u fazi II. metabolizma gdje su RSV-sulfati glavni metaboliti kod ljudi, dok su RSV-glukoronidi glavni metaboliti kod svinja i štakora. RSV i njegovi metaboliti transporterima mogu preći apikalnu membranu u intestinalni lumen ili bazolateralnom membranom dospjeti u krvotok. U intestinalnom lumenu RSV i njegovi metaboliti se dalje metaboliziraju te uz pomoću crijevnih bakterija nastaju dihidroresveratrol, 3,4'-O-dihidroksi-trans-stilben i lunalurin (**slika 3, g - i**) (Springer i Moco 2019).

Nakon što dospiju u krvotok RSV i njegovi metaboliti vežu se na proteine u krvi poput lipoproteina, hemoglobina i albumina čime se olakšava njihov transport do jetre, bubrega i ostalih organa. U jetri se dalje metabolizira čime se povećava topivost u vodi te olakšava ekskrecija, a oko 75 % RSV-a eliminira se urinom i fecesom (Springer i Moco 2019, Wenzel i Somoza 2005).

Metaboliti RSV-a postižu maksimalnu koncentraciju u plazmi otprilike 30 minuta nakon unosa, a vrijeme poluživota iznosi 9.2 sata. Koncentracija RSV-a u plazmi ovisna je o unesenoj dozi (Fernández-Mar i sur. 2012). Drugi pik koncentracije u plazmi primijećen je 6 sati nakon ingestije što upućuje na enterohepatičku cirkulaciju, odnosno hidrolizu metabolita iz crijeva u jetri i njihova ponovna apsorpcija i konjugacija u crijevima te odlazak krvotokom do jetre (Walle i sur. 2004).



Slika 3. Trans-RSV i njegovi glavni metaboliti. (a) trans-RSV; (b) trans-RSV-3-O-sulfat; (c) trans-RSV-4'-O-sulfat; (d) trans-RSV-3,4'-O-disulfat; (e) trans-RSV-3-O-glukoronid; (f) trans-RSV-3,4'-O-glukoronid; (g) dihidroresveratrol (DHR); (h) 3,4'-O-dihidroksi-trans-stilben; (i) lunalurin (prilagođeno prema Springer i Moco 2019)

S obzirom da je RSV nisko bioraspoloživ zbog ekstenzivnog metabolizma, postoje istraživanja koja se bave povećavanjem njegove bioraspoloživosti u kombinaciji s drugim molekulama. Johnson i suradnici su 2011. godine pokazali povećanje bioraspoloživosti RSV-a inhibirajući njegovu glukoronidaciju uz korištenje piperina iz crnog papra (*Piper nigrum* L.), a De Santi i suradnici su 2000. inhibirali sulfataciju RSV-a s kvercentinom. Također, spominje se značajna varijabilnosti u bioraspoloživosti među osobama te se to pripisuje različitom sastavu crijevne mikrobiote, genetičkom polimorfizmu u enzimima faze II. metabolizma, načinu života i prehrane (Smoliga i Blanchard 2014; Springer i Moco 2019).

1.4. Resveratrol u vinu

Najvažniji izvor RSV-a u prehrani je grožđe odnosno njegov proizvod vino. Langcake i Pryce su prvi put izolirali RSV iz lišća vinove loze (*Vitis vinifera* L.) 1976. godine. Oni su pokazali da se RSV sintetizira kao odgovor biljke na infekciju mikroorganizmima *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola*, *Uncinula necator* i UV zračenje te da ga nema u listovima koji nisu prošli tretman mikroorganizmima ili zračenjem. Siemann i Creasy su 1992. godine prvi put izolirali RSV iz vina. Oni su analizirali Chardonnay vina sa dva lokaliteta, New Yorka i Kalifornije, te su primijetili da vina iz New Yorka sadržavaju veću koncentraciju RSV-a. Kao moguće objašnjenje predložili su utjecaj geografskog podrijetla odnosno klime područja na količinu RSV-a. Budući da New York ima vlažniju klimu i veći pritisak patogena u odnosu na Kaliforniju, bilo je očekivano da će ga u takvim uvjetima biti više, s obzirom da se sintetizira kao odgovor na stresne uvjete. Osim što su primijetili razliku u količini RSV-a istih sorta, ali različitih lokaliteta, primijetili su i da je količina RSV-a u bijelim vinima ($0.001\text{-}0.438\ \mu\text{mol L}^{-1}$) znatno manja u odnosu na crna vina ($0.003\text{-}2.861\ \mu\text{mol L}^{-1}$). S obzirom da se RSV nalazi u kožici boba grožđa, a ne u mesu, očekivano je da će količina RSV-a biti veća u crnom vinu nego u bijelom jer tokom proizvodnje crnog vina kožica ostaje za vrijeme fermentacije, dok se pri proizvodnji bijelog vina kožica uklanja. U skladu s navedenim, literatura potvrđuje veću koncentraciju RSV-a u crnom nego u bijelom vinu (Katalinić i sur. 2008; Melzoch i sur. 2001; Sato i sur. 1997; Preiner i sur. 2014; Ratola i sur. 2004; Stervbo i sur. 2007).

Osim trans-RSV-a, u vinu se nalazi i cis-RSV te njegov derivat glukozid, koji se trivijalno zove piceid i također se pojavljuje u trans- i cis-obliku, koji nastaju kroz proces vinifikacije, odnosno proizvodnje vina, i fotoizomerizacije. Koncentracija piceida 3 puta je veća od koncentracije trans-RSV-a u vinu te tokom sazrijevanja vina njegova koncentracija raste (Stervbo i sur. 2007; Alpeza i sur. 2019, Melzoch i sur. 2001).

Pregledom dostupne literature o koncentraciji trans-RSV-a u vinima iz različitih područja (511 uzoraka iz 18 regija), primijećen je trend povećanja koncentracije trans-RSV-a prema sjeveru na sjevernoj hemisferi. Na južnoj hemisferi što je bliže ekvatoru, to je veća koncentracija trans-RSV-a. Ustanovljeno je da prosječno crno vino sadrži $1.9 \pm 1.7\ \text{mg L}^{-1}$ trans-RSV-a, u rasponu od nedetektiranih koncentracija do $14.3\ \text{mg L}^{-1}$. Nadalje, od sorte vina Pinot Noir i St.

Laurent su se pokazale kao sorte koje sadrže najveću koncentraciju trans-RSV-a (Stervbo i sur. 2007). U više izvora spominje se da sorta Cabernet Sauvignon ima među najnižim koncentracijama trans-RSV-a od crnih vina (Geana i sur. 2015; Katalinić i sur. 2008). Međutim, primijećeno je da je koncentracija trans-RSV-a u lišću dvostruko veća kod sorte Cabernet Sauvignon u odnosu na Pinot Noir te se smatra da je to razlog zbog čega je Cabernet Sauvignon sorta otpornija na infekciju plijesni *Botrytis cinerea* (Jeandet i sur. 1992).

Analizom dalmatinskih vina utvrđeno je da prosječno crno vino sadrži $2.34 \pm 2.05 \text{ mg L}^{-1}$ (u rasponu 0.08–6.74), dok bijelo vino sadrži u prosjeku $0.31 \pm 0.17 \text{ mg L}^{-1}$ (u rasponu 0.09–0.74) trans-RSV-a, odnosno prosječno crno vino iz Dalmacije ima veću koncentraciju od prosječnog crnog vina u svijetu. Primijećeno je također da bijela vina sadrže veću koncentraciju cis-RSV-a od crnog vina. Od sorti vina najveća koncentracija RSV-a zabilježena je u crnim vinima Merlot, Plavac mali i Babić, dok najveća koncentracija u bijelim vinima je primijećena kod sorte Zlatica (Katalinić i sur. 2008, Alpeza i sur. 2019, Preiner i sur. 2014).

Osim što mnogi čimbenici utječu na koncentraciju RSV-a u vinima (sorta vinove loze, enološka praksa, klima područja, geografski položaj, izloženost stresnim uvjetima) postoje i brojni čimbenici koji mogu povećati sadržaj RSV-a u vinu. Neki od čimbenika su dodatak pektolitičkih enzima, povećana temperatura, veći sadržaj SO_2 i sniženi pH tijekom proizvodnje vina (Alpeza i sur. 2019; Neves i sur. 2012).

1.5. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres nastaje kada se poremeti ravnoteža između proizvodnje i akumulacije reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) te sposobnosti organizma da ih detoksificira. U reaktivne vrste kisika spadaju superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$) i singletni kisik ($^1\text{O}_2$) (Pizzino i sur. 2017). Stvaranje reaktivnih vrsta kisikovih spojeva (ROS) neizbježan je nusprodukt aerobnog metabolizma, a može biti i posljedica egzogenih čimbenika (ionizirajuće zračenje, teški metali, pesticidi, neki lijekovi i dr.). ROS dovodi do oštećenja važnih makromolekula poput DNA, lipida i proteina i time narušava njihovu funkciju. Istraživanja su pokazala da je oksidacijski stres povezan sa

mnogim bolestima, poput raka, dijabetesa, kardiovaskularnih i neuroloških bolesti, stoga je važno imati mehanizme eliminacije ROS (Pandey i Rizvi 2011; Pandey i Rizvi 2012; Sayin i sur. 2012; Whitehead i sur. 1995).

Antioksidansi su tvari koje smanjuju štetne učinke ROS-a i sprječavaju oksidaciju molekula. Dijelev se na enzimске antioksidanse: superoksid dismutazu (SOD), glutation peroksidazu, glutation reduktazu i katalazu, i neenzimske antioksidanse: askorbinsku kiselinu (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E), glutation, karotenoide, flavonoide, stilbene i drugo (Sayin i sur. 2012). Aktivnost antioksidansa može se mjeriti raznovrsnim testovima koje se temelje na različitim mehanizmima djelovanja antioksidansa, uključujući prijenos elektrona, doniranje protona, keliranje metala i ostalo (Shahidi i Zhong 2015). Plazmina sposobnost redukcije željezovog (III) iona (engl. *Ferric reducing ability of plasma*, FRAP) jedan je od testova kojim se mjeri mogućnost antioksidansa da donira elektron (Benzie i Strain 1996).

1.6. Biološka svojstva resveratrola

Nakon što su Jang i suradnici 1997. demonstrirali njegov antitumorski učinak porastao je interes za RSV-om. Oni su uočili smanjenje broja kožnih tumora do 98 % i smanjenje postotka miševa s tumorima do 88 % nakon 18 tjedana topikalne primjene resveratrola koji je inhibirao aktivnost ciklooksigenaza (COX-1 i COX-2). U ovom radu naglasak je stavljen na njegova antioksidacijska i kardioprotektivna svojstva te su ta svojstva obrađena u posebnim potpoglavljima koji slijede nakon ovog, a ovdje su ukratko navedena neka od njegovih ostalih bioloških svojstva.

Osim što RSV sprječava nastanak tumora inhibiranjem aktivnosti ciklooksigenaza, RSV smanjuje vezanje nuklearnog faktora kappa B (NF – kB) na DNA i time smanjuje transkripciju gena koji promoviraju rast tumora (Carter i sur 2014). Nadalje, RSV štiti od progresije tumorskih stanica dojke smanjenjem proliferacije i povećanjem apoptoze epitelnog tkiva dojka (Whitsett i sur. 2006).

RSV pokazuje i antidijabetičko djelovanje, odnosno poboljšanje homeostaze glukoze, smanjenje otpornosti na inzulin, zaštitu β stanica gušterače i poboljšanje sekrecije inzulina. Ti

učinci povezani su s aktivacijom ili povećanjem ekspresije proteina AMPK i SIRT1 (Szkudelski i Szkudelska 2015). Nadalje, RSV je kod miševa hranjenih prehranom bogatom mastima smanjio dobitak na težini za 48% u odnosu na miševe koji nisu primali RSV (Kim i sur. 2011).

1.6.1. Antioksidacijska svojstva resveratrola

Antioksidacijska svojstva RSV-a povezuju se sa zaštitom od mnogih bolesti, stoga je to jedno od najistraživanijih njegovih svojstva. RSV ima dvostruki antioksidacijski karakter: direktno „hvata“ slobodne radikale (hidroksilni radikal i superoksidni anion) i povećava aktivnost određenih enzimskih i neenzimskih antioksidansa (Sayin i sur. 2012).

Kod ljudskih endotelnih stanica koronarne arterije RSV je spriječio oštećenje stanica inducirano vodikovim peroksidom (H_2O_2). Preinkubacija s RSV-om povećala je ekspresiju katalitičke podjedinice glutamat cistein ligaze (GCLC) koja povećava koncentraciju glutaciona. Također, RSV je inducirao ekspresiju glutamat cistein ligaze, glutation peroksidaze i glutation reduktaze i time spriječio oštećenje stanica (Sayin i sur. 2012). RSV štiti primarne hepatocite od oštećenja oksidacijskim stresom aktiviranjem nuklearnog transkripcijskog faktora 2 (Nrf2) koji se veže na DNA i aktivira gene koji kodiraju za antioksidacijske enzime. Na taj je način RSV povećao aktivnost katalaze, SOD-a, glutation peroksidaze, glutation-S-transferaze i NADPH kinon oksidoreduktaze (Rubiolo i sur. 2008).

RSV smanjuje α -tokoferoksilni radikal i regenerira α -tokoferol, odnosno održava koncentraciju α -tokoferola i doprinosi antioksidacijskoj zaštiti od peroksidacije linolne kiseline izazvane slobodnim radikalima. Sličan princip regeneracije pronađen je i u kombinaciji α -tokoferola s vitaminom C ili zelenim čajem. Također, primijećen je sinergistički učinak RSV-a s α -tokoferolom kod produljenja inhibicijskog perioda stvaranja lipidnih hidroperoksida (LOOH) (Fang i sur. 2002). Kombinacija RSV-a i kofeinske kiseline pokazala je sinergistički učinak (10 % viša vrijednost od tretmana sa RSV ili kofeinom) kod sposobnosti plazme da reducira željezov (III) ion (FRAP). Interakcija RSV-a s katehinom je nakon 4 minute reakcije bila antagonistička, međutim nakon 20 minuta imala je sinergistički učinak, odnosno 0.9 % veću vrijednost u odnosu na same molekule (Skroza i sur. 2015).

RSV ima visok kapacitet keliranja bakra i time pridonosi smanjenju peroksidacije LDL jer se LDL veže s bakrom. Prostorni položaj hidroksilnih grupa izrazito je važan pri keliranju bakra, s obzirom da trans-RSV ima dvostruko veći kapacitet keliranja bakra u odnosu na cis-RSV, a oba izomera su jednako uspješni u „hvatanju“ slobodnih radikala. U istraživanju je također ustanovljeno da trans-RSV ne može kelirati željezove ione (Fe^{2+} i Fe^{3+}) (Belguendouz i sur. 1997). Međutim u drugom istraživanju RSV je povećao koncentraciju bakra kod štakora soja Wistar koji su bili hranjeni dijetom bez bakra te su markeri lipidne peroksidacije (malondialdehid, MDA i lipidni hidroperoksidi, LOOH) bili značajno povišeni, za MDA 1.5 puta, a za LOOH 1.1 puta viši u odnosu na kontrolnu skupinu. Stoga možemo zaključiti da RSV može djelovati prooksidacijski stvarajući ROS. Nasuprot tome, RSV je povećao aktivnost SOD-a za 1.5 puta i FRAP vrijednost za 1.2 puta što upućuje na to da RSV aktivira i sudjeluje u antioksidacijskom djelovanju (Majewski i sur. 2020).

1.6.2. Kardioprotektivna svojstva resveratrola

Kardiovaskularne bolesti vodeći su uzrok smrti u suvremenom svijetu. Prema Izvješću Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo iz 2020. godine mortalitet od kardiovaskularnih bolesti jest prvi na listi uzroka smrti i obuhvaća 42.5% ukupnog mortaliteta 2019. godine. Epidemiološke studije pokazuju da prehrana bogata polifenolima, uključujući i RSV, može smanjiti rizik od kardiovaskularnih bolesti (Kris-Etherton i sur. 2002). Kardiovaskularne bolesti su u većini slučajeva posljedica ateroskleroze, odnosno promjene, oštećenja i nakupljanje plaka na stijenkama arterija. Ateroskleroza je proces koji započinje taloženjem LDL-a na stijenke arterija, a slijedi modifikacija lipida i proteina oksidacijskim i upalnim procesima, invazija makrofaga i njihova transformacija u „pjenaste“ stanice (Lusis 2000; Berliner i sur. 1995). RSV usporava spomenute procese i time štiti od kardiovaskularnih bolesti (Chu i sur. 2011).

Balans između LDL-a i HDL-a bitan je kod stvaranja plaka na arterijama. LDL se taloži na stijenkama, dok HDL sprječava oksidaciju lipoproteina i odvodi LDL u jetru gdje se LDL metabolizira i time sprječava njegovo nakupljanje (Lusis 2000). RSV je snizio ukupan kolesterol i LDL kolesterol, a povišio HDL kolesterol kod miševa bez apopoliproteina E (apo E^{-/-}) tretiranih RSV-om u odnosu na kontrolnu skupinu (Do i sur. 2008).

Ranije je spomenuto da RSV štiti od peroksidacije LDL-a keliranjem bakra, a također to čini direktno „hvatanjem“ hidroksilnih i superoksidnih radikala te inhibiranjem stvaranja ROS-a. Nadalje, RSV je smanjio akumulaciju hidroperoksida na LDL potaknutu ferimioglobinom, snažnim oksidansom koji nastaje u reakciji metmioglobina s H_2O_2 . Nadalje, RSV je inhibirao modifikaciju LDL apoproteina induciranu peroksinitritom ($ONOO_2^-$), također snažnim oksidansom koji je produkt u reakciji superoksidnog radikala ($O_2^{\cdot-}$) i dušikovog (II) oksida (NO) (Brito i sur. 2002).

Nakupljanje oksidiranog LDL-a potiče endotelne stanice da proizvode proupalne molekule uključujući i adhezijske molekule i potiče migraciju makrofaga u žile stvarajući „pjenaste“ stanice koje predstavljaju rane aterosklerozne lezije (Lusis 2000). Kod RSV-om tretiranih miševa apo E^{-/-} nisu pronađene aterosklerotske lezije niti taloženje masnoća, dok kod kontrolne skupine jesu. Također, smanjena je prisutnost međustanične adhezijske molekule 1 (ICAM-1) i vaskularne stanične adhezijske molekule 1 (VCAM-1) u odnosu na kontrolnu skupinu (Do i sur. 2008). Nadalje, RSV je spriječio agregaciju trombocita potaknutu kolagenom, trombinom i ADP-om *in vitro* i agregaciju trombocita potaknutu ADP-om *in vivo* i time doprinosi zaštiti od ateroskleroze (Wang i sur. 2002).

RSV osim što štiti od kardiovaskularnih bolesti usporavanjem ateroskleroze, promovira vazodilataciju uglavnom stimulacijom Ca^{2+} aktiviranih K^+ kanala i poticanjem stvaranja NO koji je važan čimbenik vazorelaksacije (Bradamante i sur. 2004). Nadalje, RSV je smanjio sistolički tlak 15 % nakon tri tjedna primanja RSV-a kod štakora koji spontano imaju visok tlak (Mizutani i sur. 2000).

1.7. Cilj istraživanja

Resveratrol je prepoznatljiv po svojim antioksidacijskim svojstvima kojim se pripisuje zaštita od mnogih bolesti. Cilj ovog istraživanja je bio optimiziranje metode mjerenja RSV-a u ljudskoj plazmi i izmjeriti koncentraciju RSV-a u plazmi kardiovaskularnih bolesnika koji su primali RSV ili placebo u obliku kapsula tijekom boravka u bolnici. Osim toga, cilj je bio odrediti antioksidacijski kapacitet plazme pacijenata koji su primali RSV i usporediti ga sa antioksidacijskim kapacitetom plazme kontrolnih pacijenata koji su primali placebo – laktulozu. Također, cilj je bio istražiti odnos između izmjerene koncentracije RSV i antioksidacijskog kapaciteta plazme.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Kemikalije

- 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin (TPTZ), $C_{18}H_{12}N_6$, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, Sjedinjene Američke Države
- 3,4',5-trihidroksi-trans-stilben (RSV), HPLC čistoće, $C_{14}H_{12}O_3$, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, Sjedinjene Američke Države
- Acetonitril, HPLC čistoće, CH_3CN , Honeywell, Seelze, Njemačka
- Klorovodična kiselina 36.5% , HCl , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Metanol, HPLC čistoće, CH_3OH , Honeywell, Seelze, Njemačka
- Natrijev acetat trihidrat, $C_2H_3NaO_2 \times 3H_2O$, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev klorid, $NaCl$, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Octena kiselina, CH_3COOH , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Ultračista voda za HPLC (18Ω) proizvedena je u Milli-Q Gradient sustavu za vodu (Thermo Scientific Smart2pure 3 UV/UF)
- Željezov (III) klorid heksahidrat, $FeCl_3 \times 6H_2O$, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Željezov (II) sulfat heptahidrat, $FeSO_4 \times 7H_2O$, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, Sjedinjene Američke Države

2.2. Instrumenti

- Analitička vaga, Mettler Toledo, AE 200, Columbus, Ohio, SAD
- Centrifuga, Mikro 22R, Hettich, Kirchlingern, Njemačka
- Centrifuga, Universal 320 R, Hettich, Kirchlingern, Njemačka
- HPLC sustav, Shimadzu, Kyoto, Japan
 - Otplinjač (engl. *Degaser*) DGU-20A3
 - Gradijentna pumpa LC-20AD
 - Gradijentna pumpa LC-20ADSP
 - Automatski izmjenjivač uzoraka (engl. *Autosampler*) SIL-20AChT

- Termostat za kolonu CTO-20A
- Fluorescentni detektor RF-20A
- UV-VIS detektor SPD-20AV
- Komunikator s računalom CBM 20A
- Kupelj za ultrazvučnu ekstrakciju, Bandelin Sonorex
- pH metar, SevenEasy, Mettler Toledo
- Spektrofotometar CPS-240A, Shimadzu, Kyoto, Japan
- Vortex-Genie 2, Scientific Industries

2.3. Biološki uzorci

Prikupljeni su uzorci krvi 34 kardiovaskularnih bolesnika primljenih u bolnicu radi elektivnog kardiokirurškog zahvata zamjene aortnog zaliska u kojemu se koristi uređaj za izvantjelesni krvotok. Bolesnici su podijeljeni u dvije skupine: 17 kojih je primalo RSV i 17 kojih je primalo placebo (laktulozu). Bolesnicima je davan resveratrol odnosno laktuloza u obliku mekih kapsula u dozi 2 x 400 mg/dan tijekom pet dana, počevši dva dana prije operacije. Krv je uzimana tijekom i nakon operacije („T1“ i „T4“), centrifugirana te su izdvojeni uzorci plazme koji su zaleđeni na -20 °C do analize. Navedeno je istraživanje odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice Dubrava i Etičko povjerenstvo Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, a bolesnici su prije uključivanja u istraživanje potpisali odobreni informirani pristanak.

U okviru ovog diplomskog rada izmjerena je koncentracija RSV-a u uzorcima plazme kardiovaskularnih bolesnika koji su primali RSV ili placebo prikupljenih neposredno nakon indukcije u anesteziju (48 h nakon prijema u bolnicu – „T1“) te u uzorcima plazme prikupljenih po dolasku bolesnika u jedinicu intenzivnog liječenja („T4“). Također, u navedene dvije vremenske točke („T1“ i „T4“) izmjeren je antioksidacijski kapacitet plazme u uzorcima plazme ljudi koji su primali RSV te u kontrolnim uzorcima, odnosno u uzorcima plazme pacijenata koji su primali placebo – laktulozu .

2.4. Mjerenje koncentracije resveratrola

Koncentracija RSV-a u plazmi kardiovaskularnih bolesnika izmjerena je prema metodi He i suradnika (2006) HPLC sustavom. Metoda se temelji na odvajanju RSV od drugih sastojaka plazme do kojeg dolazi zbog različitog zadržavanja sastojaka na kromatografskoj koloni pod pritiskom mobilne faze. Odvojeni RSV mjeri se UV-VIS detektorom pri valnoj duljini (λ) od 303 nm.

2.4.1. Priprema otopina i baždarni dijagram

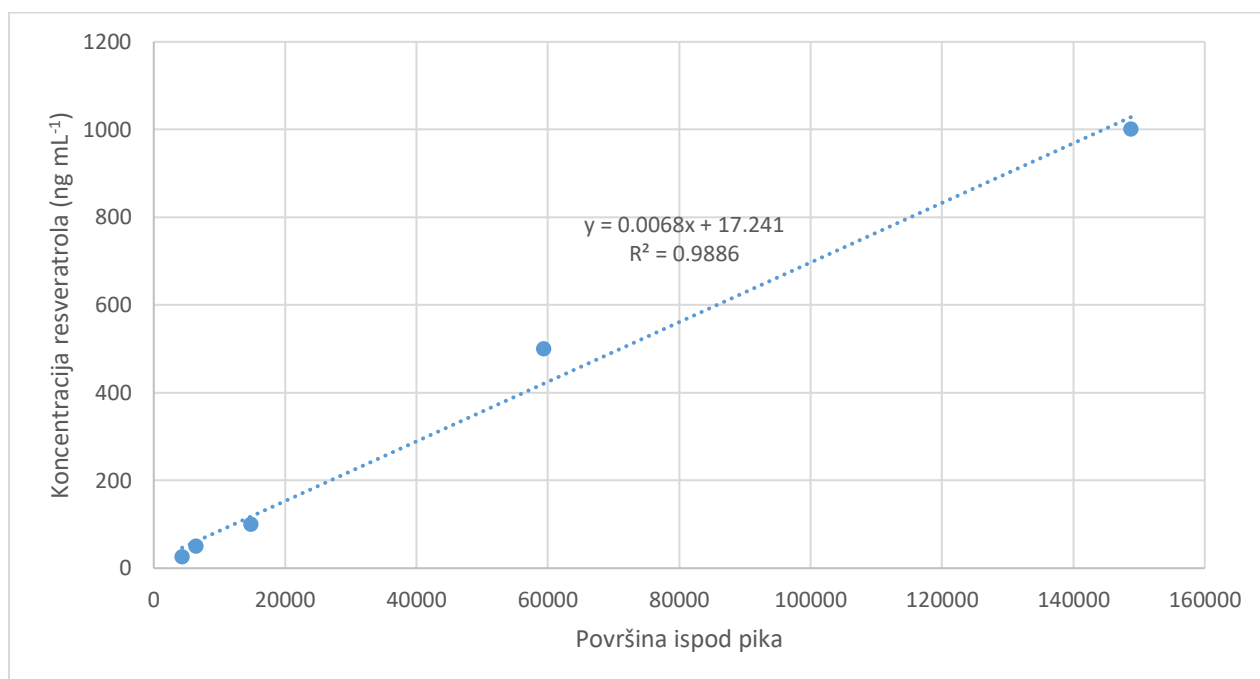
Otopina za ispiranje kolone HPLC uređaja pripravljena je miješanjem 500 mL ultračiste vode i 500 mL metanola HPLC čistoće. Plinovi iz otopine za ispiranje uklonjeni su u kupelji za ultrazvučnu ekstrakciju u trajanju od 15 minuta.

Mobilna faza je smjesa 0.5 % volumnog udjela (ϕ) octene kiseline te 99.5 % (ϕ) otopine metanola HPLC čistoće i ultračiste vode u omjeru 52:48. Plinovi iz mobilne faze uklanjani su 15 minuta u kupelji za ultrazvučnu ekstrakciju.

Matična otopina RSV-a masene koncentracije (γ) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ napravljena je otapanjem 1 mg RSV-a u 10 mL metanola HPLC čistoće. Nakon otapanja, epruveta s otopinom miješana je na Vortexu 1 minutu, a zatim je zamotana u aluminijsku foliju zbog fotoosjetljivosti RSV-a. Razrjeđivanjem matične otopine metanolom dobivene su standardne otopine koncentracija od 25 ng mL^{-1} do 1000 ng mL^{-1} (**tablica 1**). Baždarni dijagram napravljen je mjerenjem površine ispod pika pripremljenih poznatih koncentracija standardnih otopina RSV-a, a njegova jednadžba pravca koristi za izračunavanje koncentracije RSV-a u uzorcima plazme (**slika 4**).

Tablica 1. Priprema standardnih otopina RSV-a

γ (standardne otopine)	V (standardne otopine)	γ (početne otopine)	V (početne otopine)
1000 ng L ⁻¹	10 mL	100 µg L ⁻¹	100 µL
500 ng L ⁻¹	2 mL	1000 ng L ⁻¹	1000 µL
100 ng L ⁻¹	2 mL	1000 ng L ⁻¹	200 µL
50 ng L ⁻¹	2 mL	1000 ng L ⁻¹	100 µL
25 ng L ⁻¹	2 mL	1000 ng L ⁻¹	50 µL

**Slika 4.** Baždarni dijagram standardnih otopina resveratrola.

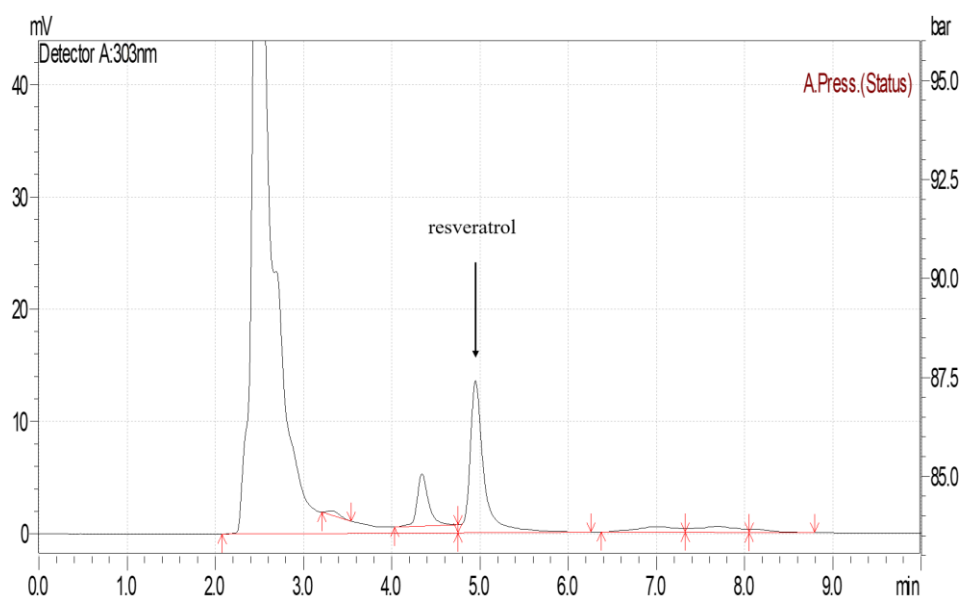
2.4.2. Priprema uzoraka

Iz prethodno odleđenih uzoraka plazme RSV je ekstrahirano tekućinsko-tekućinskom ekstrakcijom. U 50 µL plazme dodano je 100 µL acetonitrila HPLC čistoće. Uzorci plazme s acetonitrirom miješani su na Vortexu 30-ak sekundi te centrifugirani na 2500 rpm i 20 °C 10 minuta. U 100 µL supernatanta dodano je 100 µL ultračiste vode te je sve skupa promiješano na

Vortexu 30-ak sekundi. Uzorci su stavljeni u odjeljak automatskog uzorkivača HPLC sustava te je pokrenuta analiza.

2.4.3. HPLC analiza uzoraka

Za mjerenje koncentracije RSV-a korištena je kromatografska kolona obrnute faze C-18 s česticama veličine 5 μm (Zorbax Eclipse Plus, Agilent, 4.6x250 mm) te kromatografsku pretkolonu s česticama veličine 5 μm (Zorbax Eclipse Plus, Agilent, 4.6x12.5 mm) za uklanjanje nečistoća u uzorku. U kolonu je automatskim izmjenjivačem uzoraka injektirano 25 μL uzorka, a protok mobilne faze bio je 1 mL min^{-1} . Temperature kolone je bila 20 $^{\circ}\text{C}$, a tlak je bio oko 130 bara. Koncentracija RSV-a mjerena je UV-VIS detektorom pri valnoj duljini (λ) od 303 nm. Pri navedenim uvjetima vrijeme zadržavanja (t_R) RSV-a na koloni bilo je 5.2 minute. Analiza svakog uzorka trajala je 10 minuta te je svaki uzorak analiziran u duplikatu, a rezultati su izraženi kao njihova srednja vrijednost. Koncentracija RSV-a u plazmi izračunata je pomoću jednadžbe baždarnog pravca poznatih koncentracija standardnih otopina RSV-a, pomožena je s faktorom razrjeđenja i izražena u $\mu\text{g mL}^{-1}$. HPLC sustav ispire se prije i nakon analize otopinom za ispiranje. Primjer jednog kromatograma je na **slici 5**.



Slika 5. Primjer jednog kromatograma. Označeno sa strelicom predstavlja resveratrol.

2.4.4. Validacija metode

Metoda je validirana računanjem linearnosti, točnosti (engl. *accuracy*), granice detekcije (engl. *limit of detection*, LOD) i granice kvantifikacije (engl. *limit of quantification*, LOQ) metode (Taverniers i sur. 2004). Linearnost se odnosi na mogućnost metode da u određenom području daje rezultate koji su proporcionalni koncentraciji analita u uzorku te je ranije prikazana na baždarnom dijagramu u poglavlju 3.4.1.. Izračunata je računanjem jednadžbe pravca dobivenog mjerenjem površine ispod pika standarda i koeficijenta linearnosti. Jednadžba pravca je $y = 0.0068x + 17.241$, a koeficijent linearnosti je $R^2 = 0.9886$.

Točnost metode rađena je dodatkom poznate koncentracije RSV-a u kontrolni uzorak, uzorak plazme ljudi koji nisu primali RSV nego placebo, te je izražena kao postotak izmjerene vrijednosti od teoretske vrijednosti RSV-a u uzorku. Točnost za koncentraciju od 50 ng mL⁻¹ iznosi 102.99%, a za koncentraciju od 100 ng mL⁻¹ i iznosi 104.7%.

Granica detekcije (LOD) najniža je količina analita u uzorku koja se može detektirati s određenim stupnjem pouzdanosti. Izmjerena je analizom slijepa probe te iznosi 17.36 ng mL⁻¹, a izračunata je po formuli:

$$LOD = \bar{x} + 3SD$$

gdje je \bar{x} srednja vrijednost šuma slijepih proba, a SD je standardna devijacija šuma.

Granica kvantifikacije (LOQ) najniža je količina analita u uzorku koja se može pouzdano kvantificirati. Iznosi 17.54 ng mL⁻¹, a izračunata je po formuli:

$$LOQ = \bar{x} + 10SD$$

gdje je \bar{x} srednja vrijednost šuma slijepih proba, a SD je standardna devijacija šuma.

2.5. Mjerenje antioksidacijskog kapaciteta plazme metodom plazmine sposobnosti redukcije željezovog (III) iona (FRAP metoda)

Antioksidacijski kapacitet plazme pacijenata, koji su primali RSV odnosno placebo, izmjeren je metodom plazmine sposobnosti redukcije željezovog (III) iona (FRAP) koju su razvili Benzie i Strain (1996). Metoda se temelji na sposobnosti antioksidansa da doniranjem elektrona u kiselom mediju (pH 3.6) reducira žuti željezov (III) tripiridiltriazin kompleks u njegov plavi reducirani željezov (II) oblik. Porast apsorbancije nastalog željezova (II) oblika pri λ 593 nm mjeri se spektrofotometrijski te je proporcionalan njegovoj koncentraciji odnosno koncentraciji antioksidansa.

2.5.1. Priprema otopina i baždarnog dijagrama

Fiziološka otopina je 0.9 %-tna vodena otopina natrijevog klorida. Napravljena je otapanjem 9 g NaCl-a u 1 L vode. Otopina je čuvana na sobnoj temperaturi do analize.

Acetatni pufer je 300 mM otopina pH 3.6. Napravljena je otapanjem natrijevog acetata trihidrata u 200 mL ultračiste vode te je dodano oko 13 mL octene kiseline. Nakon toga pH je podešen octenom kiselinom na pH metru te je otopina nadopunjena s ultračistom vodom do 1 L. Pufer je čuvan na 4 °C do analize.

Klorovodična kiselina množinske koncentracije 40 mM napravljena je dodavanjem 337.5 μ L 36.5 % HCl-a u 8 mL ultračiste vode. U otopinu je nadopunjeno ultračiste vode do 10 mL. Otopina je čuvana na sobnoj temperaturi do analize.

Otopina 10 mM TPTZ-a pripremljena je na dan analize otapanjem 0.031 g TPTZ-a u 40 mM HCl-u na kupelji pri 37 °C.

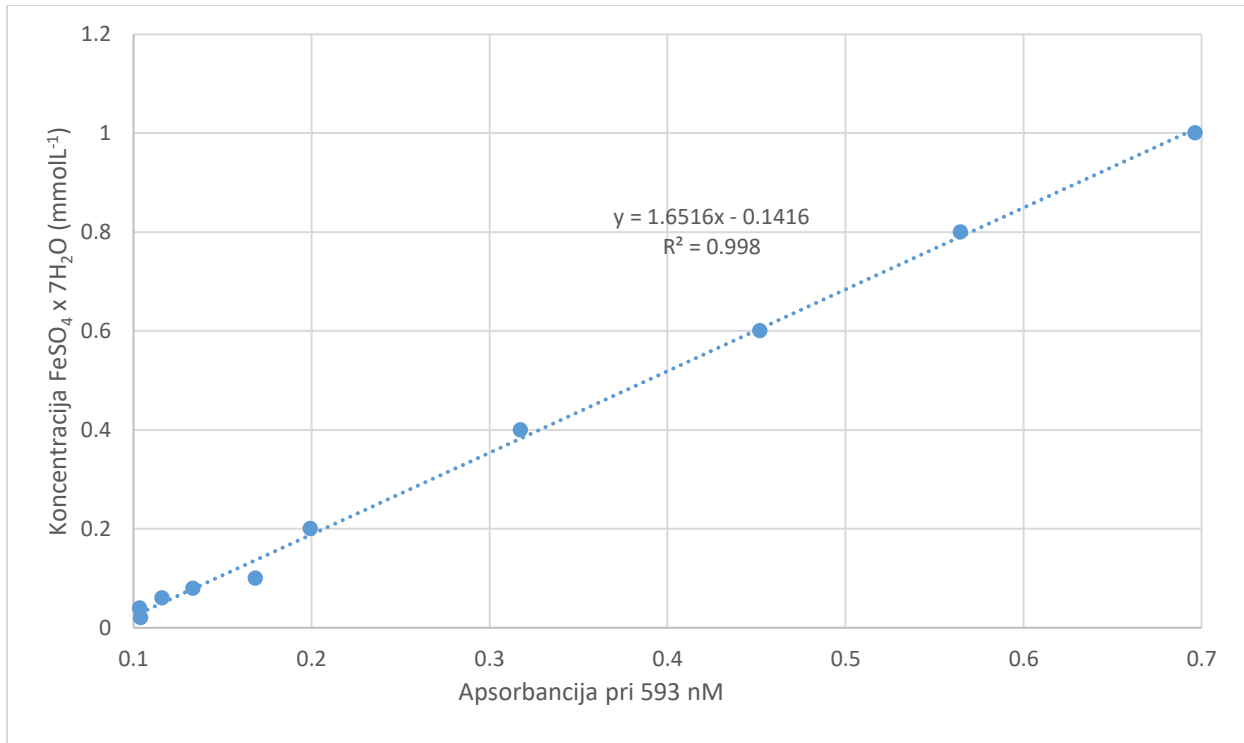
Otopina 20 mM željezovog(III) heksahidrata klorida pripremljena je na dan analize otapanjem 0.054 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ u 10 mL ultračiste vode.

FRAP reagens pripremljen je na dan analize, a čine ga 300 mM acetatni pufer pH 3.6, 10 mM TPTZ i 20 mM $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ u volumnom omjeru 10:1:1. Tijekom analize držan je u vodenoj kupelji na 37 °C.

Matična otopina jest vodena otopina željezovog (II) sulfata heptahidrata, a pripremljena je otapanjem 0.278 g u 1 L ultračiste vode te je nakon pripreme zamrznuta na -20 °C. Razrjeđivanjem matične otopine ultračistom vodom, dobiveni su standardne otopine množinskih koncentracija od 0.02 mM do 1 mM (**tablica 2**). Standardne otopine su poslužile za pripravu baždarnog dijagrama koji je napravljen mjerenjem apsorbancije standardnih otopina. Jednadžba pravca baždarnog dijagrama koristila je za izračunavanje koncentracije antioksidansa u uzorcima plazme (**slika 6**).

Tablica 2. Priprema standardnih otopina $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

Koncentracija standarda (mM)	V matične otopine (1 mM $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	V (ReH_2O)
0.02	5 μL	245 μL
0.04	10 μL	240 μL
0.06	15 μL	235 μL
0.08	20 μL	230 μL
0.1	25 μL	225 μL
0.2	50 μL	200 μL
0.4	100 μL	150 μL
0.6	150 μL	100 μL
0.8	200 μL	50 μL
1.0	250 μL	0 μL



Slika 6. Baždarni dijagram standardnih otopina FeSO₄ x 7H₂O.

2.5.2. Spektrofotometrijska analiza antioksidacijskog kapaciteta plazme

U 15 μL uzorka stavljeno je 15 μL fiziološke otopine da bi razrijedili uzorak te je sve skupa promiješano na Vortexu. Nakon toga dodano je 1 mL FRAP reagensa u 30 μL razrijeđenog uzorka te je par sekundi promiješano na Vortexu. Uzorci su (u duplikatu) stavljeni u spektrofotometar koji je termostatiran na 37 °C. Apsorbancija uzorka pri 593 nm mjerena je nakon 4 minute. Antioksidacijski kapacitet plazme izračunat je pomoću jednadžbe pravca standarda i pomožen je s faktorom razrjeđenja. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost u mmol L^{-1} .

2.6. Statistička obrada podataka

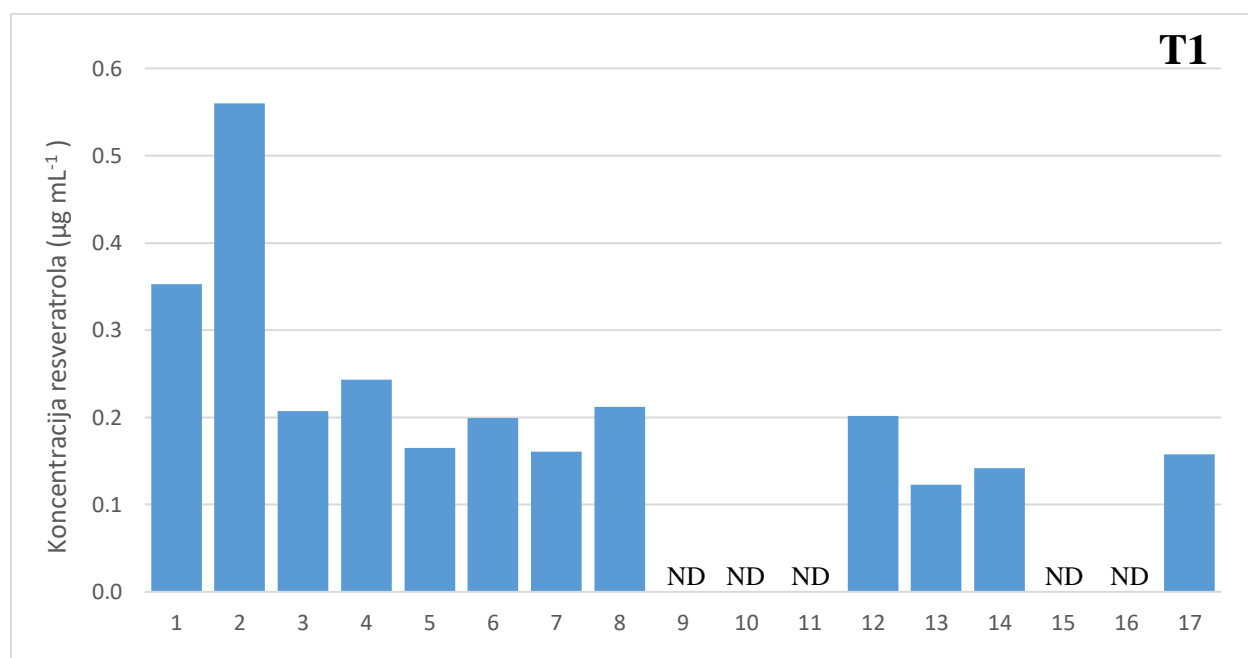
Statistička obrada podataka napravljena je pomoću računalnih programa GraphPad Prism za Windows, verzija 5 i Excel (Microsoft 356) za Windows, verzija 2011. Vrijednosti svih izmjerenih parametara izražene su kao srednja vrijednost ili medijan te pripadajuće minimalne i maksimalne vrijednosti, standardna devijacija i koeficijent varijacije te analizirane koristeći t-test i Pearsonov koeficijent korelacije. P vrijednosti manje ili jednake 0,05 smatrane su statistički značajnima.

3. REZULTATI

3.1. Koncentracija resvetrola

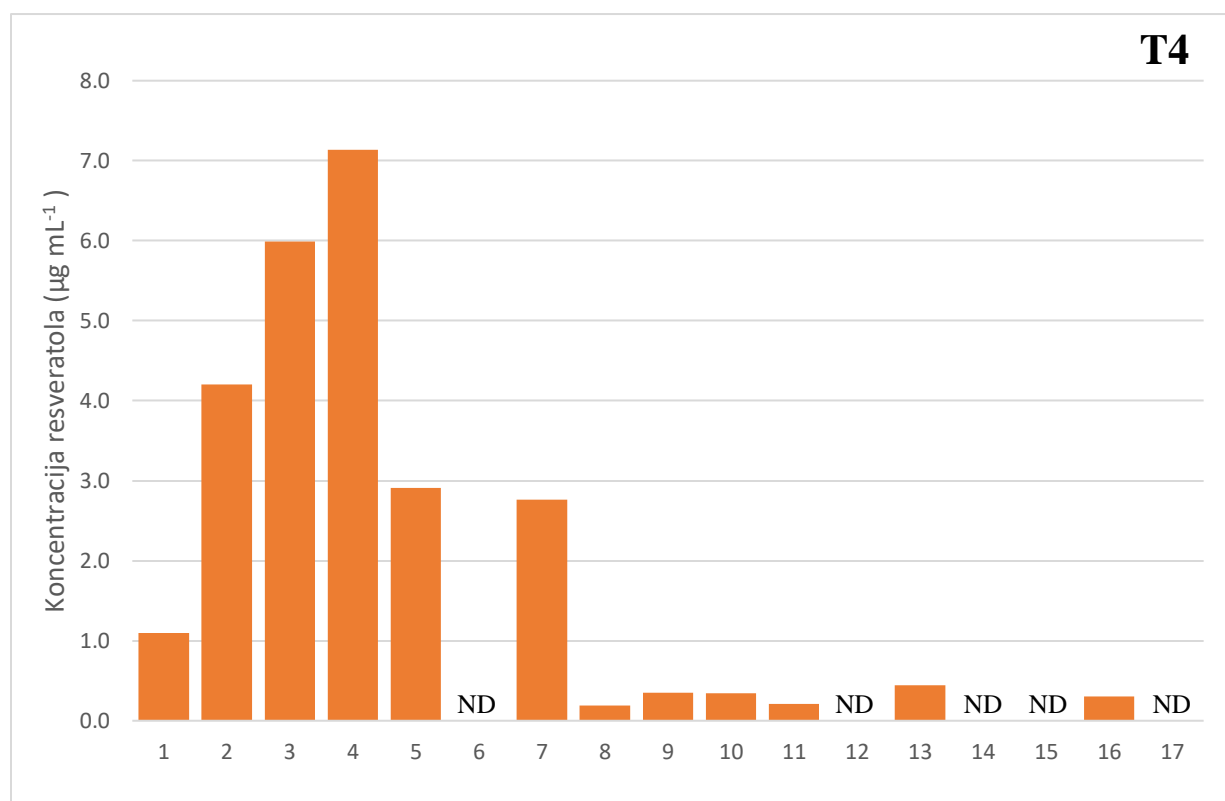
U uzorcima kardiovaskularnih bolesnika koji su primali placebo nije pronađen RSV, stoga se navedeni rezultati u ovom potpoglavlju odnose na uzorke plazme kardiovaskularnih bolesnika koji su primali RSV.

Izmjerena koncentracija RSV u plazmi kardiovaskularnih bolesnika koji su primali RSV uzorkovanoj tijekom operacije, odnosno nakon indukcije u anesteziju („T1“) prikazana je na **slici 7**. U skupini „T1“ srednja vrijednost iznosi $0.23 \pm 0.12 \mu\text{g mL}^{-1}$, a medijan $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Minimalna vrijednost iznosi $0.12 \mu\text{g mL}^{-1}$, a maksimalna $0.56 \mu\text{g mL}^{-1}$. Koeficijent varijacije među uzorcima iznosi 50.9 %. U skupini je bilo pet (od 17) uzoraka u kojima je koncentracija RSV-a bila ispod granice detekcije.



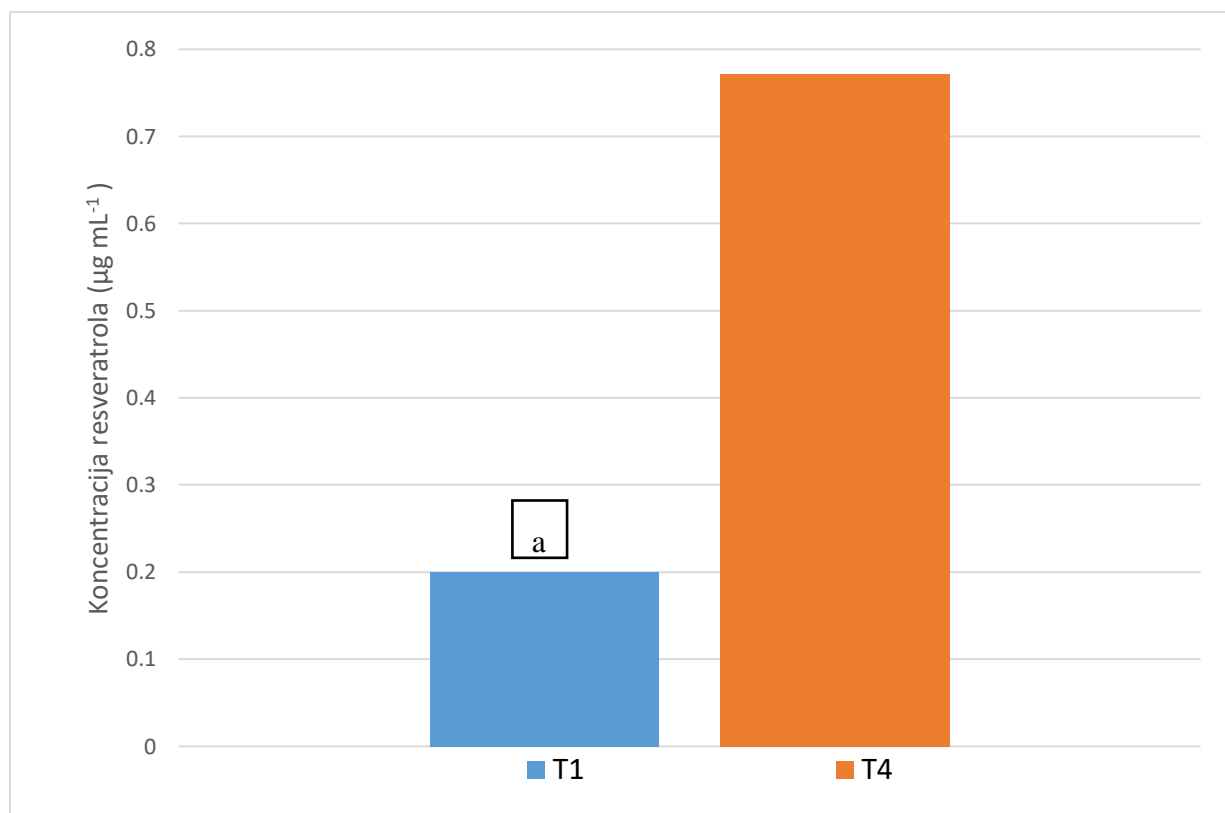
Slika 7. Koncentracija resveratrola u uzorcima plazme kardiovaskularnih bolesnika koji su primali resveratrol prikupljenih nakon indukcije u anesteziju, odnosno tijekom operacije („T1“). ND – koncentracija nije detektirana.

Izmjerena koncentracija RSV u plazmi kardiovaskularnih bolesnika koji su primali RSV uzorkovanoj nakon operacije, odnosno nakon dolaska pacijenata u jedinicu intenzivnog liječenja („T4“) prikazana je na **slici 8**. U skupini „T4“ srednja vrijednost iznosi $2.16 \pm 2.35 \mu\text{g mL}^{-1}$, a medijan $0.78 \mu\text{g mL}^{-1}$. Minimalna vrijednost iznosi $0.19 \mu\text{g mL}^{-1}$, a maksimalna $7.14 \mu\text{g mL}^{-1}$. Koeficijent varijacije iznosi 108.67 %. U skupini je bilo pet (od 17) uzoraka u kojima je koncentracija RSV-a bila ispod granice detekcije.



Slika 8. Koncentracija resveratrola u uzorcima plazme kardiovaskularnih bolesnika koji su primali resveratrol prikupljenih nakon dolaska pacijenata u jedinicu intenzivnog liječenja, odnosno nakon operacije („T4“). ND – koncentracija nije detektirana.

Uspoređena je koncentracija RSV-a u plazmi pacijenata koji su primali RSV za vrijeme operacije („T1“) i nakon operacije (T4“) i utvrdila se statistički značajna razlika. Vrijednosti medijana navedenih skupina uzoraka prikazane su na **slici 9**.



Slika 9. Vrijednost koncentracije resveratrola u uzorcima plazme pacijenata koji su primali resveratrol, a koji su prikupljeni tijekom operacije („T1“) i nakon operacije („T4“). Rezultati su prikazani kao medijan. Za uzorke prikupljene tijekom operacije („T1“) minimalna vrijednost iznosi 0.12 µg mL⁻¹, a maksimalna 0.56 µg mL⁻¹, a za uzorke prikupljene nakon operacije („T4“) minimalna vrijednost iznosi 0.2 µg mL⁻¹, a maksimalna 7.14 µg mL⁻¹. a – različito od T4.

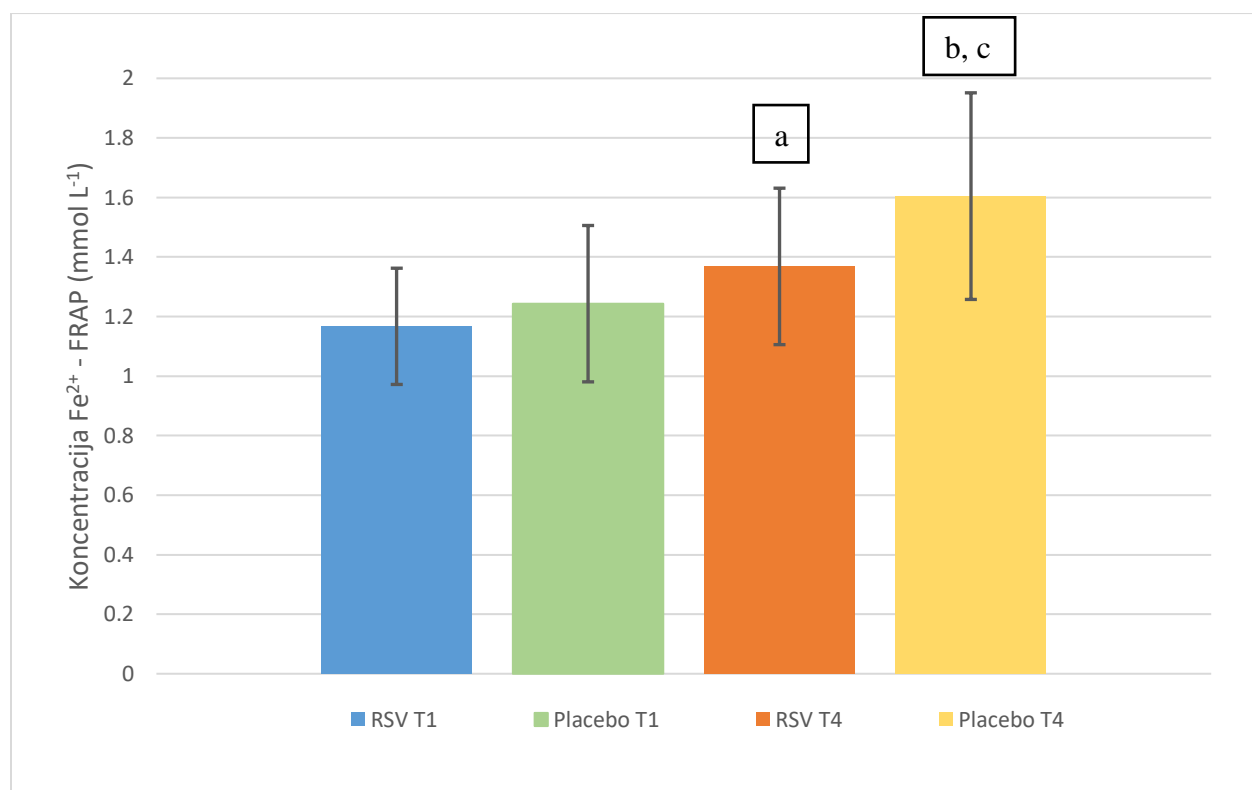
3.2. Antioksidacijski kapacitet plazme izmjeren FRAP metodom

Izmjereni antioksidacijski kapacitet plazme kardiovaskularnih bolesnika koji su primali RSV ili placebo u dvije vremenske točke („T1“ tijekom operacije odnosno „T4“ nakon operacije) izražen je kao koncentracija nastalog Fe^{2+} u reakciji FRAP reagensa i plazme te je prikazan na **slici 10**.

Srednja vrijednost antioksidacijskog kapaciteta plazme bolesnika, koji su primali RSV, tijekom operacije („T1“) iznosi $1.17 \pm 0.2 \text{ mmol L}^{-1}$ i statistički je značajno manja od srednje vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta plazme istih bolesnika nakon operacije („T4“) koja iznosi $1.37 \pm 0.26 \text{ mmol L}^{-1}$.

Srednja vrijednost antioksidacijskog kapaciteta plazme bolesnika, koji su primali placebo (laktulozu), tijekom operacije („T1“) iznosi $1.24 \pm 0.26 \text{ mmol L}^{-1}$ i statistički je značajno manja od srednje vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta plazme istih bolesnika nakon operacije („T4“) koja iznosi $1.61 \pm 0.35 \text{ mmol L}^{-1}$.

Kod uzoraka prikupljenih nakon operacije („T4“) antioksidacijski kapacitet plazme statistički je značajno manji kod bolesnika koji su primali RSV u odnosu na bolesnike koji su primali placebo (laktulozu), a kod uzoraka prikupljenih tijekom operacije („T1“) nije pronađena statistički značajna razlika između antioksidacijskog kapaciteta plazme bolesnika koji su primali RSV i bolesnika koji su primali placebo (laktulozu).

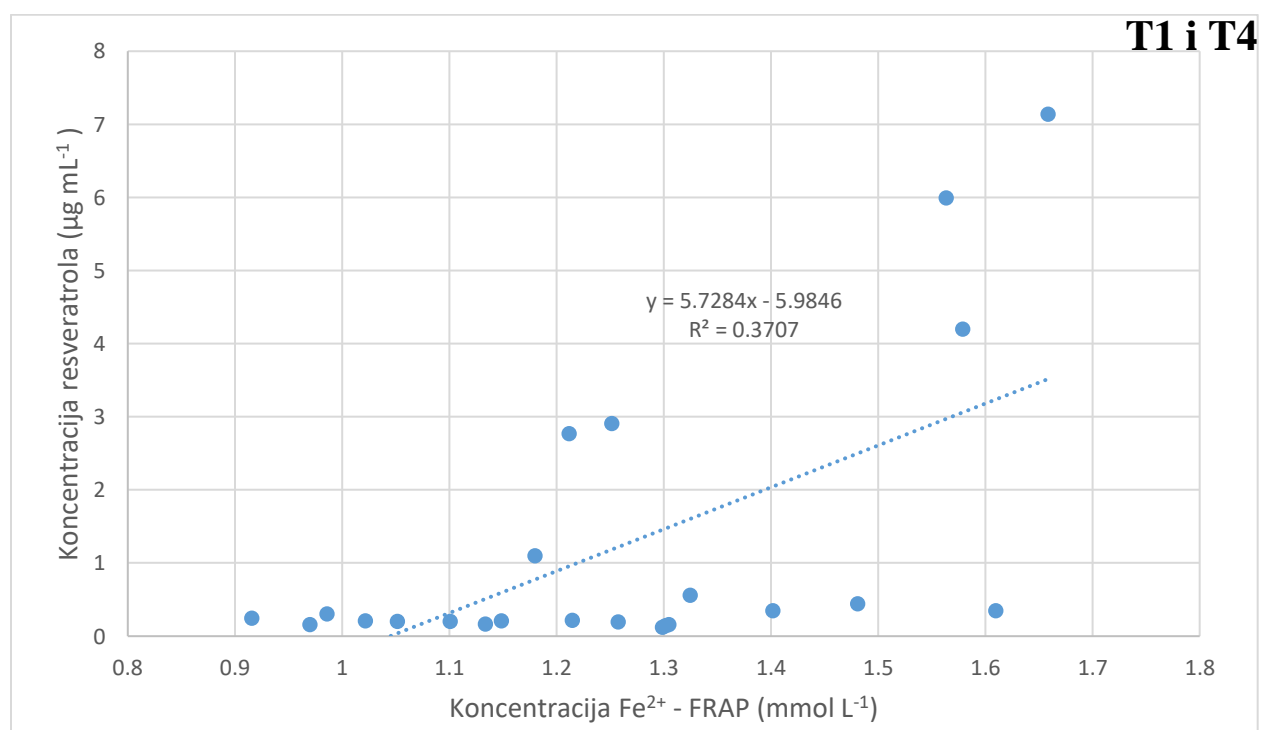


Slika 10. Antioksidacijski kapacitet plazme izmjeren FRAP metodom tijekom („T1“) i nakon operacije („T4“) u ljudi koji su primali resveratrol (RSV) ili placebo. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija koncentracije nastalog Fe²⁺ u reakciji FRAP reagensa s uzorkom plazme. a – različito od RSV T1, b – različito od RSV T4, c – različito od Placebo T1.

3.3. Korelacija između koncentracije RSV-a i antioksidacijskog kapaciteta plazme izmjenjenog FRAP metodom

Budući da u uzorcima plazme kardiovaskularnih bolesnika koji su primali placebo nije pronađen RSV, Pearsonov koeficijent korelacije je računat samo za uzorke plazme kardiovaskularnih bolesnika koji su primali RSV, ali bez uzoraka u kojima RSV nije bio detektiran.

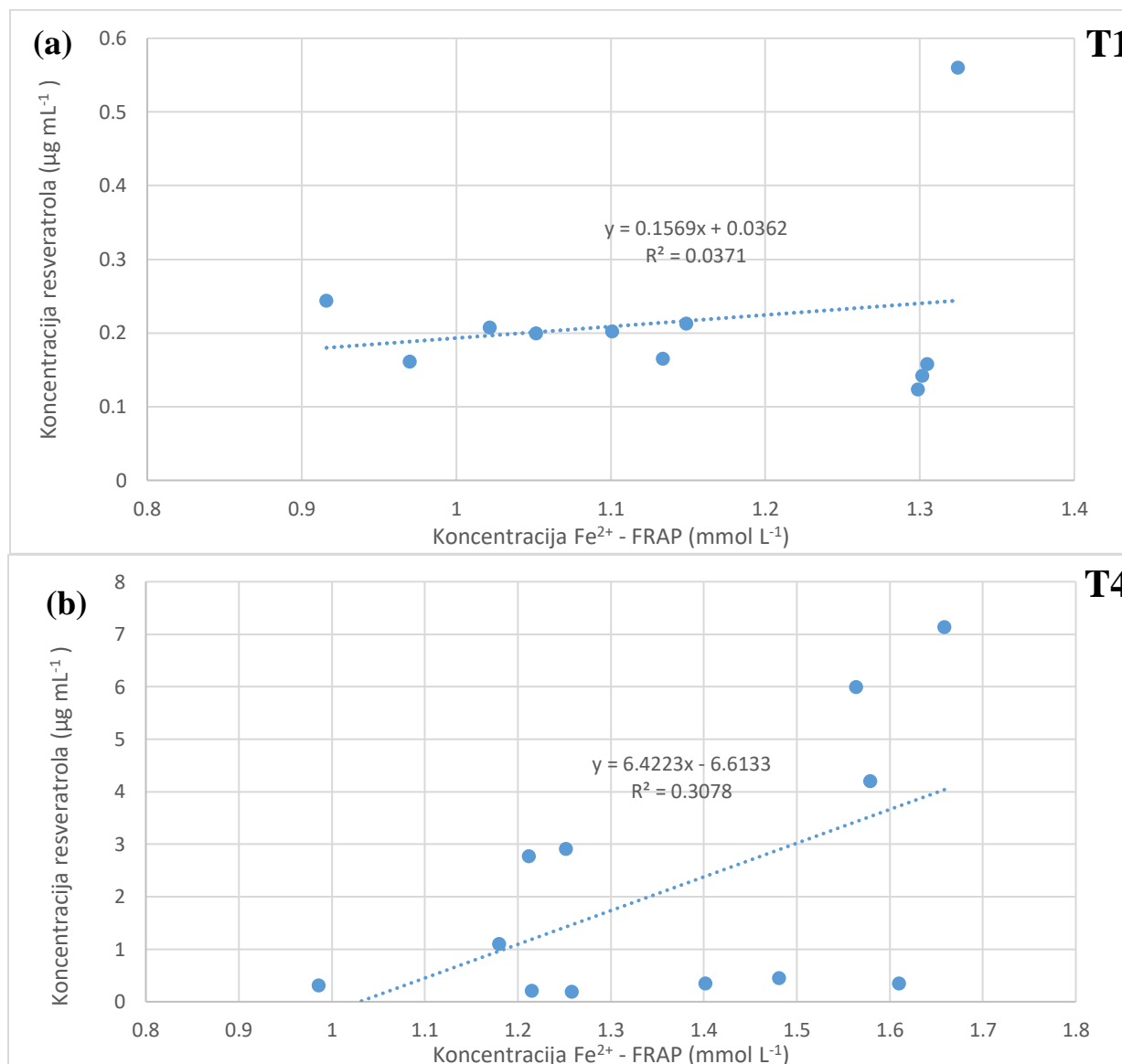
Izračunati Pearsonov koeficijent korelacije između svih uzoraka u kojima je izmjerena koncentracija RSV-a (prikupljenih i tijekom („T1“) i nakon („T4“) operacije) i njihovih pripadajućih vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta plazme izmjenjenog FRAP metodom iznosi 0.61 te je statistički značajan ($p < 0.05$). Odnos između koncentracije RSV-a i antioksidacijskog kapaciteta plazme prikazan je na **slici 11**.



Slika 11. Odnos između izmjerene koncentracije RSV-a svih uzoraka u kojima je detektiran (prikupljenih i tijekom („T1“) i nakon („T4“) operacije) i njihovih pripadajućih vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta plazme izmjenjenog FRAP metodom, a izraženih kao koncentracija Fe²⁺.

Izračunati Pearsonov koeficijent korelacije za uzorke plazme kardiovaskularnih bolesnika u kojima je pronađen RSV, a prikupljenih tijekom operacije („T1“) iznosi 0.19, ali nije statistički značajan (**slika 12 a**).

Za uzorke plazme kardiovaskularnih bolesnika u kojima je pronađen RSV prikupljenih nakon operacije („T4“) Pearsonov koeficijent korelacije iznosi 0.55 te nije statistički značajan, ali p vrijednost iznosi 0.06 (**slika 12 b**).



Slika 12. Odnos između izmjerene koncentracije RSV-a u kojima je detektiran RSV i njihovih pripadajućih vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta plazme izmjenog FRAP metodom, a izraženih kao koncentracija Fe^{2+} . **(a)** tijekom operacije („T1“) **(b)** nakon operacije („T4“)

4. RASPRAVA

Resveratrol je poznati antioksidans koji se nalazi u mnogim biljnim plodovima poput kikirikija, brusnice i grožđa. Unatoč tome što je RSV dostupan u biljnim plodovima koji se koriste u ljudskoj prehrani, njegova je količina u spomenutim plodovima niska, stoga je na tržištu dostupan i u obliku tableta odnosno kapsula. U istraživanju prikazanim u ovom diplomskom radu izmjerena je koncentracija RSV-a u plazmi kardiovaskularnih bolesnika, koji su primali RSV ili placebo u obliku kapsula 2 puta na dan u dozi od ukupno 800 mg. Krv odnosno plazma uzorkovana je tijekom i nakon operacije („T1“, odnosno „T4“). Očekivano, u uzorcima kardiovaskularnih bolesnika koji nisu primali RSV nego placebo nije pronađen RSV. U 10 od ukupno 34 uzorka kardiovaskularnih bolesnika koji su primali RSV koncentracija RSV bila je ispod granice detekcije, međutim valja napomenuti da su uzorci prije same analize koncentracije RSV-a šesterostruko razrijeđeni.

U istraživanju u kojemu je 10 zdravih muškaraca uzimalo RSV, sedam u obliku crnog vina (0.64 ± 0.04 mg RSV-a), a tri u obliku 15 tableta ekstrakta grožđa (2.49 ± 0.06 mg RSV-a), nije pronađen slobodan RSV, međutim pronađeni su njegovi metaboliti u urinu i plazmi. Zaključeno je da slobodan RSV nije pronađen u uzorcima plazme i urina zbog njegovog ekstenzivnog metabolizma (Rotches-Ribalta i sur. 2015). Stoga, osim razrjeđenja, drugi razlog prisutnosti uzoraka u kojima nije detektiran RSV u ovom diplomskom radu je možda također posljedica ekstenzivnog metabolizma RSV-a. Međutim, u spomenutom se istraživanju koriste puno niže doze RSV-a u odnosu na primijenjene doze u istraživanju prikazanom u ovom diplomskom radu i primijenjuje se samo jednom.

Srednja vrijednost koncentracije RSV-a mjerena nakon dva i četiri tjedna primjene RSV-a u dozi 1 g po danu (tijekom 28 dana) iznosila je od 0.16 do $0.58 \mu\text{g mL}^{-1}$ kod pet zdravih volontera (Espinoza i sur. 2017). Rezultati istraživanja dijelom su u skladu s rezultatima ovog diplomskog rada prikazanim kao medijan. Međutim, uspoređujući srednje vrijednosti, možemo primijetiti da je srednja vrijednost koncentracije RSV-a u uzorcima prikupljenim nakon operacije u ovom diplomskom radu otprilike 4 puta veća u odnosu na spomenuto istraživanje. Istovremena nepodudarnost rezultata srednjih vrijednosti i podudarnost medijana izmjerenih koncentracija RSV-a prikazanih u ovom diplomskom radu sa srednjom vrijednosti istraživanja može se objasniti prisutnošću uzoraka sa ekstremnim vrijednostima u mojem istraživanju koje utječu na srednju vrijednost, a na medijan ne.

U ovom diplomskom radu izračunati koeficijent varijacije među uzorcima prikupljenim tijekom operacije iznosi 50.9 %, a među uzorcima prikupljenim nakon operacije iznosi 108.67 %. U istraživanju biodostupnosti RSV-a pronađena je visoka varijabilnost koncentracije RSV-a među ljudskim uzorcima plazme. S obzirom da su ispitanici u vrijeme istraživanja imali ujednačenu prehranu isključen je utjecaj matriksa hrane na apsorpciju RSV-a. Predloženi čimbenik koji je najvjerojatnije utjecao na varijabilnost jest različitost u sastavu crijevne mikrobiote među testiranim ljudima. Sastav crijevne mikrobiote značajno utječe na apsorpciju te je jedinstven svakom čovjeku (Briskey i Rao 2020). Za vrijeme istraživanja obrađenog u ovom diplomskom radu, ispitanici su bili smješteni u bolnici i primali su istu hranu. Iz istog razloga kao u spomenutom istraživanju može se isključiti utjecaj matriksa hrane i zaključiti da je vjerojatan uzrok varijabilnosti koncentracije RSV-a posljedica različite apsorpcije zbog različitog sastava crijevne mikrobiote među ispitanicima. Osim različitog sastava crijevne mikrobiote, u literaturi se spominje utjecaj genetičkog polimorfizma u enzimima faze II metabolizma na varijabilnost bioraspoloživosti među ispitanicima (Springer i Moco 2019.)

Koeficijent varijacije veći od 40 % pronađen je i u drugim istraživanjima (Almeida i sur. 2009; Boocock i sur. 2007; Nunes i sur. 2009), što znači da je visoka varijabilnost u koncentraciji RSV-a u plazmi među ispitanicima česta pojava. U istraživanju je ustanovljeno da je najveća minimalna koncentracija RSV-a ujutro i da tijekom dana pada, odnosno da koncentracija RSV-a pokazuje dnevnu varijaciju. Varijabilnost u apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i eliminaciji RSV-a može biti posljedica dnevnih varijacija pokretljivosti želuca i vremenu pražnjenja, protoku krvi u crijevima i jetri, aktivnosti enzima i bubrežnih funkcija (Almeida i sur. 2009). Iz navedenoga se pretpostavlja da je varijacija u koncentraciji RSV-a među ispitanicima u istraživanju prikazanim u ovom diplomskom radu posljedica njihovog različitog cirkadijanog ritma.

U istraživanju prikazanom u ovom diplomskom radu utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji RSV-a tijekom i nakon operacije. U istraživanju u kojem su ljudi primali 200 mg RSV-a svakih osam sati tijekom tri dana primijećen je porast maksimalne koncentracije pri zadnjoj dozi u odnosu na prvu dozu (Nunes i sur. 2009). U drugom istraživanju ljudi su bili podijeljeni u četiri skupine ovisno o primljenoj dozi RSV-a (25-150 mg) koju su primali šest puta dnevno tijekom 48 sati (13 doza ukupno). Primijećen je porast izloženosti organizma RSV-u

procijenjen akumulacijskim omjerom iz krivulje ovisnosti koncentracije RSV-a o vremenu izloženosti. Oni su zaključili da je pronađena akumulacija posljedica kratkog intervala (4 h) između doza. Također, primijetili su da vrijeme poluživota RSV-a nakon ponovljene doze viši u odnosu na prvu dozu (Almeida i sur. 2009). U literaturi se spominje i drugi porast koncentracije RSV-a nakon primljene doze što upućuje na enterohepatičku cirkulaciju RSV-a koja ovisi o cirkadijanom ritmu (Walle i sur. 2004). U ovom diplomskom radu, ispitanici su primali RSV 48 h prije samog uzorkovanja krvi, stoga je moguće da ekstremne vrijednosti prikazane u diplomskom rada ukazuju na enterohepatičku cirkulaciju i akumulaciju RSV-a u plazmi. Stoga, statistički pronađena razlika između koncentracije RSV-a u plazmi tijekom i nakon operacije je vjerojatno posljedica različitog cirkadijanog ritma i akumulacije RSV-a.

Resveratrolova antioksidacijska svojstva povezuju se sa zaštitom od mnogih bolesti, stoga je to jedno od najistraživanijih njegovih svojstva. FRAP metodom mjeri se sposobnost antioksidansa da doniranjem elektrona reducira željezov (III) ion iz reakcijske otopine. U ovom diplomskom radu FRAP metodom izmjeren je antioksidacijski kapacitet plazme pacijenata, koji su primali RSV ili placebo, u dvije vremenske točke (za vrijeme operacije „T1“ i nakon operacije „T4“). Statistički značajna razlika pronađena je između primjene RSV i laktuloze (placebo) kod antioksidacijskog kapaciteta plazme uzorkovane nakon operacije („T4“) međutim, neočekivano, kod placebo skupine izmjeren je viši antioksidacijski kapacitet plazme u odnosu na RSV skupinu. Nasuprot tome, kod uzoraka uzorkovanih za vrijeme operacije nije pronađena statistički značajna razlika između primjene RSV-a i laktuloze.

Moguće objašnjenje za razliku između uzoraka pacijenata koji su primali RSV i laktulozu uzorkovanih nakon operacije jest sposobnost laktuloze da mobilizira proizvodnju vodika koji neutralizira radikale (doniranjem elektrona ili protona) i time reducira oksidativni stres (Chen i sur. 2011). FRAP metoda je nespecifična, svi spojevi s nižim redoks potencijalom od redoks potencijala reakcije $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (0.77 V) ulazit će u reakciju redukcije željezovog (III) iona i tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta (Benzie i Strain 1996). Budući da redoks potencijal reakcije $2\text{H}^+/\text{H}_2$ iznosi 0.0 V, moguće je da vodik proizveden primjenom laktuloze povećao antioksidacijski kapacitet plazme ulazeći u reakciju redukcije željeza. Nadalje u *in vitro* istraživanju primijećen je porast FRAP vrijednosti do 20 minuta nakon početka reakcije s RSV-om (Skroza i sur. 2015). U istraživanju prikazanom u ovom diplomskom radu

FRAP vrijednost izmjerena je 4 minute nakon miješanja uzorka s FRAP reagensom, a u spomenutom istraživanju se utvrdilo da reakcija traje i nakon 4 minute. Međutim, u drugom *in vitro* istraživanju nije primijećen porast apsorbancije nakon 4 minute reakcije RSV-a s FRAP reagensom (Pandey i Rizvi 2012).

Budući da je utvrđeno da RSV ima nisku biodostupnost (Briskey i Rao 2020; Springer i Moco 2019), moguće je da je to također potencijalan razlog manjeg utjecaja RSV-a na antioksidacijski kapacitet plazme u odnosu na placebo. Također, u literaturi se spominje da RSV može djelovati prooksidacijski stvarajući ROS-ove koji potencijalno mogu sniziti antioksidacijski kapacitet plazme (Majewski i sur. 2020).

U istraživanju u kojemu su štakori soja Wistar primali RSV u dozi 500 mg po danu tijekom osam tjedana primijećen je porast FRAP-a 1.2 puta u odnosu na kontrolnu skupinu koja nije primala RSV. Njihova vrijednost FRAP-a iznosi oko 0.23 mmol L⁻¹ (Majewski i sur. 2020), dok u istraživanju prikazanim u ovom diplomskome radu FRAP vrijednost iznosi više od 1.17 mmol L⁻¹. Razlika u izmjerenim vrijednostima u navedenom istraživanju te u istraživanju prikazanom u ovom diplomskom radu može se objasniti različitim testnim organizmima (štakori soja Wistar u odnosu na ljude) te korištena viša doza u istraživanju prikazanom u ovom diplomskom radu. U drugom *in vitro* istraživanju utjecaja 10 μM RSV-a na mogućnost reduciranja željezovog (III) iona iz FRAP reagensa, FRAP vrijednost iznosila je oko 0.15 mmol L⁻¹ (Pandey i Rizvi 2012), odnosno niža je od vrijednosti u prikazanim u ovom diplomskom radu. Vjerojatni razlog je korištena niža koncentracija RSV-a u odnosu na izmjerenu koncentraciju u istraživanju ovog diplomskog rada.

U istraživanju u kojemu su zdravi ljudi primali RSV u dozi 1 g po danu tijekom 28 dana primijećen je porast ukupnog antioksidacijskog kapaciteta mjenog antioksidacijskim testom koji mjeri mogućnost plazme da inhibira oksidaciju diamonijeve soli (ABTS) potaknutu metmioglobinom (Espinoza i sur. 2017). Metoda se temelji na mogućnosti antioksidansa da inhibira antioksidaciju ABTS-a doniranjem elektrona i protona, dok metoda korištena u ovom diplomskome radu mjeri moć antioksidansa da donira elektrone (Shahidi i Zhong 2015). U literaturi se spominje da RSV ima mogućnost doniranja elektrona i protona i povećava aktivnost drugih antioksidansa (Lin i sur. 2018), stoga FRAP metodom ne možemo izmjeriti ukupnu antioksidacijsku moć RSV-a već samo njegovu sposobnost doniranja elektrona.

U istraživanju prikazanom u ovom diplomskome radu utvrđena je statistički značajno niža vrijednost antioksidacijskog kapaciteta plazme u uzorcima uzorkovanim za vrijeme operacije u odnosu na vrijednost antioksidacijskog kapaciteta plazme u uzorcima uzorkovanim nakon operacije u obje vremenske točke, a izmjerena koncentracija RSV-a u plazmi bolesnika koji su ga primali je za vrijeme operacije bila statistički niža od koncentracije nakon operacije. Zatim, u istraživanju prikazanom u ovom diplomskom radu dobiveno je da je izmjerena koncentracija RSV-a u plazmi pacijenata statistički korelirana s vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta plazme. U istraživanju antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta listova vinove loze FRAP metodom, pokazalo se da unatoč niskoj koncentraciji RSV-a u listovima u odnosu na koncentraciju drugih fenola, njegova koncentracija je značajno korelirana s antioksidacijskim kapacitetom ekstrakta listova (Katalinić i sur. 2013). Iz navedenog možemo zaključiti da RSV utječe na antioksidacijski kapacitet plazme. Povećanjem njegove koncentracije u plazmi, povećava se i antioksidacijski kapacitet plazme. Međutim, valja napomenuti da je antioksidacijski kapacitet plazme u ljudi koji su primali placebo također statistički niži tijekom operacije u odnosu na nakon operacije. Stoga, za uvid u potpuniji utjecaj RSV-a na antioksidacijski kapacitet plazme u kardiovaskularnih bolesnika ispitanog ovim diplomskim radom, trebalo bi primijeniti i druge metode.

5. ZAKLJUČAK

U uzorcima plazme kardiovaskularnih bolesnika koji su primali placebo nije pronađen RSV, a u uzorcima plazme kardiovaskularnih bolesnika koji su primali RSV u obliku kapsula od ukupno 800 mg RSV-a po danu RSV nije pronađen u 10 od 34 uzorka. Pronađena je značajna varijabilnost izmjerene koncentracije RSV-a među uzorcima. U uzorcima plazme prikupljenih tijekom operacije („T1“) pronađena je statistički niža koncentracija RSV-a u odnosu na uzorke prikupljene nakon operacije („T4“). Dobiveni visoki koeficijenti koncentracije RSV-a upućuju da bioraspoloživost RSV-a ovisi o mnogobrojnim čimbenicima koji su specifični za svaku osobu (različiti sastav crijevne mikrobiote, genetički polimorfizam u enzimima faze II. metabolizma i cirkadijani ritam).

Antioksidacijski kapacitet plazme uzorkovane tijekom operacije („T1“) statistički je niži od antioksidacijskog kapaciteta plazme prikupljene nakon operacije („T4“) i kod kardiovaskularnih bolesnika koji su primali RSV i kod bolesnika koji su primali placebo. U uzorcima prikupljenim tijekom operacije („T1“) nije pronađena statistički značajna razlika u antioksidacijskom kapacitetu plazme između bolesnika koji su primali RSV i bolesnika koji su primali placebo, a u uzorcima prikupljenim nakon operacije („T4“) antioksidacijski kapacitet plazme statistički je niži kod bolesnika koji su primali RSV. Navedeno upućuje na nespecifičnost FRAP metode, moguće indirektno antioksidacijsko djelovanje korištenog placeboa (laktuloze) i moguće prooksidacijsko djelovanje RSV-a.

Pronađena je pozitivna korelacija između izmjerene koncentracije RSV-a i antioksidacijskog kapaciteta plazme u uzorcima u kojima je izmjeren RSV. U uzorcima u kojima je izmjerena veća koncentracija RSV-a i pronađen je i veći antioksidacijski kapacitet plazme što upućuje na antioksidacijsko djelovanje RSV-a. Međutim za potpuniji uvid u učinak RSV-a na antioksidacijski kapacitet plazme uz FRAP metodu trebalo bi se koristiti i druge metode mjerenja antioksidativne aktivnosti.

6. LITERATURA

Almeida L., Vaz-da-Silva M., Falcão A., Soares E., Costa R., Loureiro A. I., Fernandes-Lopes C., Rocha J. F., Nunes T., Wright L., Soares-da-Silva P. (2009): Pharmacokinetic and safety profile of transresveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Molecular Nutrition & Food Research* **53**: 7-15.

Alpeza I., Kovačević K., Vanzo A. (2019): Total phenols, stilbene and antioxidative activity in Babić and Plavac mali wines; Efficiency of pectolytic enzymes. *Glasnik Zaštite Bilja* **42** (5): 38-50.

Belguendouz L., Fremont L., Linard A. (1997): Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochemical Pharmacology* **53**: 1347-1355.

Benzie I. F. F., Strain J. J. (1996): The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* **239**: 70-76.

Berliner J. A., Navab M., Fogelman A. M., Frank J. S., Demer L. L., Edwards P. A., Watson A. D., Lusis A. J. (1995): Atherosclerosis: Basic Mechanisms Oxidation, Inflammation, and Genetics. *Journal of the American Heart Association* **91**: 2488-2496.

Boocock D. J., Faust G. E. S., Patel K. R., Schinas A. M., Brown V. A., Ducharme M. P., Booth T., Crowell J. A., Perloff M., Gescher A. J., Steward W. P., Brenner D. E. (2007): Phase I Dose Escalation Pharmacokinetic Study in Healthy Volunteers of Resveratrol, a Potential Cancer Chemopreventive Agent. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **16** (6): 1246-1252.

Borowska E. J., Mazur B., Gadza R., Gadzała Kopciuch R., Buszewski B. (2009): Polyphenol, Anthocyanin and Resveratrol Mass Fractions and Antioxidant Properties of Cranberry Cultivars. *Food Technology and Biotechnology* **47** (1): 56-61.

Bradamante S., Barenghi L., Villa A. (2004): Cardiovascular Protective Effects of Resveratrol. *Cardiovascular Drug Reviews* **22** (3): 169-188.

Briskey D., Rao A. (2020): Trans-Resveratrol Oral Bioavailability in Humans Using LipiSpere. Dispersion Technology. *Pharmaceutics* **12**: 1-11.

Brito P., Almeida L. M., Dinis T. C. P. (2002): The Interaction of Resveratrol with Ferrylmyoglobin and Peroxynitrite; Protection Against LDL Oxidation. *Free Radical Research* **36** (6): 621-631.

Carter L. G., D'Orazio J. A., Pearson K. J. (2014): Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocrine-Related Cancer* **21** (3): 209-225.

Chen X., Zuo Q., Hai Y., Sun X. J. (2011): Lactulose: An indirect antioxidant ameliorating inflammatory bowel disease by increasing hydrogen production. *Medical Hypotheses* **76**: 325-327.

Chu L. M., Lassaletta A. D., Robich M. P., Selke F. W. (2011): Resveratrol in the Prevention and Treatment of Coronary Artery Disease. *Current Atherosclerosis Reports* **13**: 439-446.

De Santi C., Pietrabissao A., Spisni R., Moscaoe F., Pacifici G. M. (2000): Sulphation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural Flavonoids. *Xenobiotica* **30** (11): 9857-9866.

Do G. M., Kwon E. Y., Kim H. J., Jeon S. M., Ha T. Y., Park T, Choi M. S. (2008): Long-term effects of resveratrol supplementation on suppression of atherogenic lesion formation and cholesterol synthesis in apo E-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **374**: 55-59.

Espinoza J. L., Trung L. Q., Inaoka P. T., Yamada K., An D. T., Mizuno S., Nakao S., Takami A. (2017): The Repeated Administration of Resveratrol Has Measurable Effects on Circulating T-Cell Subsets in Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* ID: 6781872: 1-10.

Fang J. G., Lu M., Chen Z. H., Zhu H. H., Li Y., Yang L., Wu L. M., Liu Z. L. (2002): Antioxidant Effects of Resveratrol and its Analogues against the Free-Radical-Induced Peroxidation of Linoleic Acid in Micelles. *Chemistry—A European Journal* **8** (18): 4191-4198.

Fernández-Mar M. I., Mateos R., García-Parrilla M. C., Puertas B., Cantos-Villar E. (2012): Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry* **130**: 797–813.

- Ferrer J. L., Austin M. B., Stewart Jr. C., Noel J.P. (2008): Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**: 356-370.
- Fritzemeier K. H., Kindl H. (1981): Coordinate Induction by UV Light of Stilbene Synthase, Phenylalanine Ammonia-lyase and Cinnamate 4-Hydroxylase in Leaves of Vitaceae. *Planta* **151**: 48-52.
- Geana E. I., Dinca O.R., Ionete R. E., Artem V., Niculescu V. C. (2015): Monitoring *trans*-Resveratrol in Grape Berry Skins During Ripening and in Corresponding Wines by HPLC Food Technology and Biotechnology **53** (1): 73–80.
- Generalić Mekinić I., Skroza D., Ljubenković I., Katalinić V. (2016): Insight into the Presence of Stilbenes in Medicinal Plants Traditionally Used in Croatian Folk Medicine. *Natural Product Communications* **11** (6): 833-835.
- Hao H. D., He L. R. (2004): Mechanisms of Cardiovascular Protection by Resveratrol. *Journal of Medicinal Food* **7** (3): 290-298.
- He H., Chen X., Wang G., Wang J., Davey A. K. (2006): High-performance liquid chromatography spectrometric analysis of *trans*-resveratrol in rat plasma. *Journal of Chromatography B* **832**: 177-180.
- Hrvatski zavod za javno zdravstvo (2020): Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2019. godini.
- Jang M., Cai L., Udeani G. O., Slowing K. V., Thomas C. F., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D., Mehta R. G., Moon R. C., Pezzuto J. M. (1997): Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. *Science* **275**: 218-220.
- Jeandet P., Sbaghi M., Bessis R. (1992): The Production of Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilbene) by Grapevine in vitro Cultures, and its Application to Screening for Frey Mould Resistance. *Journal of Wine Research* **3** (1): 47-57.
- Jensen J. S., Wertz C. F., O'Neil V. A. (2010): Preformulation Stability of *trans*-Resveratrol and *trans*-Resveratrol Glucoside (Piceid). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**:1685-1690.

- Johnson J. J., Nihal M., Siddiqui I. A., Scarlett C. O., Bailey H. H., Mukhtar H. Ahmad N. (2011): Enhancing the bioavailability of resveratrol by combining it with piperine. *Molecular Nutrition & Food Research* **55**: 1169-1176.
- Juškaite V., Ramanauskienė K., Briedis V. (2017): Testing of resveratrol microemulsion photostability and protective effect against UV induced oxidative stress. *Acta Pharmaceutica* **67**: 247-256.
- Katalinić V., Ljubenković I., Pezo I., Generalić I., Stričević O., Miloš M., Modun D., Boban M. (2008): Free resveratrol monomers in varietal red and white wines from Dalmatia (Croatia). *Periodicum biologorum* **110** (1): 77-83.
- Kim S., Jin Y., Choi Y., Park T. (2011): Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochemical Pharmacology* **81**: 1343-1351.
- Kris-Etherton P. M., Hecker K. D., Bonanome A., Coval S. M., Binkoski A. E., Hilpert K. F., Griel A. E. Etherton T. D. (2002): Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine* **113**: 71-88.
- Langcake P., Pryce R. J. (1976): The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology* **9**: 77-86.
- Lusis A.J. (2000): Atherosclerosis. *Nature*, **407**: 233-241.
- Majewski M., Ognik K., Thoene M., Rawicka A., Juśkiewicz J. (2020): Resveratrol modulates the blood plasma levels of Cu and Zn, the antioxidant status and the vascular response of thoracic arteries in copper deficient Wistar rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **390**: 114877: 1-11.
- Melzoch K., Hanzlíková I., Filip V., Buckiová D., Šmidrkal J. (2001): Resveratrol in Parts of Vine and Wine Originating from Bohemian and Moravian Vineyard Regions. *Agriculturae Conspectus Scientificus* **66** (1), 53-57.

- Mizutani K., Ikeda K., Kawai Y., Yamori Y. (2000): Resveratrol attenuates ovariectomy-induced hypertension and bone loss in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **46**: 78-83.
- Morris V. L., Toseef T., Nazumudeen F. B., Rivoira C., Spatafora C., Tringali C., Rotenberg S. A. (2015): Anti-tumor Properties of cis-Resveratrol Methylated Analogues in Metastatic Mouse Melanoma Cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* **402**: 83-91.
- Može Š., Polak T., Gašperlin L., Koron D., Vanzo A. Poklar Ulrih N., Veronika A. (2011): Phenolics in Slovenian Bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 6998-7004.
- Neves A. R., Lúcio M., Lima J. L. C., Reis S. (2012): Resveratrol in Medicinal Chemistry: A Critical Review of its Pharmacokinetics, Drug-Delivery, and Membrane Interactions. *Current Medicinal Chemistry* **19**: 1663-1681.
- Nunes T., Almeida L., Rocha J. F., Falcão A., Fernandes-Lopes C., Loureiro A. I., Wright L., Vaz-da-Silva M., Soares-da-Silva P. (2009): Pharmacokinetics of Trans-resveratrol Following Repeated Administration in Healthy Elderly and Young Subjects. *The Journal of Clinical Pharmacology* **49**: 1477-1482.
- Pandey K. B., Rizvi S. I. (2011): Anti-oxidative action of resveratrol: Implications for human health. *Arabian Journal of Chemistry* **4**, 293-298.
- Pandey K. B., Rizvi S. I. (2012): Ferric Reducing and Radical Scavenging Activities of Selected Important Polyphenols Present In Foods. *International Journal of Food Properties* **15**: 702-708.
- Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A. (2017): Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* ID 8416763: 1-13.
- Preiner D., Karoglan Kontić J., Maletić E., Marković Z., Tomaz I (2014): Sadržaj polifenola u prošek u od hrvatskih autohtonih sorata vinove loze. *Glasnik Zaštite Bilja* **37** (5): 75-80.
- Ratola N., Faria J. L., Alvec A. (2004): Analysis and Quantification of trans-Resveratrol in Wines from Alentejo Region (Portugal) *Food Technology and Biotechnology* **42** (2): 125-130.

- Rotches-Ribalta M., Andres-Lacueva C., Estruch R., Escribano E., Urpi-Sarda M. (2012): Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. *Pharmacological Research* **66**: 375-382.
- Rubiolo J. A., Mithieux G., Vega F. V. (2008): Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: Activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *European Journal of Pharmacology* **591**: 66-72.
- Sato M., Suzuki Y., Okuda T., Yokotsuka K. (1997): Contents of Resveratrol, Piceid, and Their Isomers in Commercially Available Wines Made from Grapes Cultivated in Japan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **61** (11): 1800-1805.
- Sayin O., Arslan N., Guner G. (2012): The protective effects of resveratrol on human coronary artery endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide in vitro. *Acta clinica Croatica* **51** (2): 227-235.
- Shahidi F., Zhong Y. (2015): Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods* **18**: 757-781.
- Siemann E. H., Creasy L. L. (1992): Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **43**: 49-52.
- Skroza D., Generalić Mekinić I., Svilović S., Šimat V., Katalinić V. (2015): Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: A case of binary phenolic mixtures. *Journal of Food Composition and Analysis* **38**: 13-18.
- Smoliga J. M., Blanchard O. (2014): Enhancing the Delivery of Resveratrol in Humans: If Low Bioavailability is the Problem, What is the Solution? *Molecules* **19**: 17154-17172.
- Springer M., Moco S. (2019): Resveratrol and Its Human Metabolites-Effects on Metabolic Health and Obesity. *Nutrients* **11**: 1-17.
- Stervbo U., Vang O., Bonnesen C. (2007): A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry* **101**: 449-457.
- Szkudelski T., Szkudelska K. (2015): Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. *Biochimica et Biophysica Acta* **1852** (6): 1145-54.

- Takaoka M. (1939): Resveratrol, a new phenolic compound from *Veratrum grandiflorum*. Journal of Chemical Society of Japan 60 (11): 1090-1100.
- Taverniers I., De Loose M., Van Bockstaele E. (2004): Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. Trend sin Analytical Chemistry **23** (8): 535-552.
- Tokuşoğlu Ö., Ünal M. K., Yemiş F. (2005): Determination of the Phytoalexin Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilbene) in Peanuts and Pistachios by High-Performance Liquid Chromatographic Diode Array (HPLC-DAD) and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS). Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**: 5003-5009.
- Vuković N., Šegota V., Alegro A., Koletić N. (2016): Flying under the radar – invasive *Reynoutria × bohemica* Chrtek et Chrtkova (Polygonaceae) in Croatia. Book of abstracts of the 5th Croatian Botanical Symposium with international participation 50-51.
- Walle T., Hsieh F., DeLegge M. H., Oatis J. E. Jr, Walle U. K. (2004): High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. Drug Metabolism and Disposition **32** (12): 1377–1382.
- Wang Z., Zou J., Huang Y., Cao K., Xu Y., Wu J. M. (2002): Effect of resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. Chinese Medical Journal **115** (3): 378-380.
- Weiskirchen S., Weiskirchen R. (2016): Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy? Advances in Nutrition **7**: 706-718.
- Wenzel E., Somoza V. (2005): Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. Molecular Nutrition & Food Research **49**: 472-481.
- Whitehead T. P., Robinson D., Allaway S., Syms J., Hale A. (1995): Effect of Red Wine Ingestion on the Antioxidant Capacity of Serum. Clinical Chemistry **41** (1): 32-35.
- Whitsett T., Carpenter M., Lamartiniere C. A. (2006): Resveratrol, but not EGCG, in the diet suppresses DMBA-induced mammary cancer in rats. Journal of Carcinogenesis **5** (5): 1-11.

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 1996.godine. Nakon završene osnovne škole, pohađala sam Klasičnu gimnaziju u Zagrebu. Godine 2015. upisala sam studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, te 2018. godine stekla sam zvanje sveučilišnog prvostupnika znanosti o okolišu. Budući da moji interesi obuhvaćaju široko područje (biologiju, geografiju i geologiju), na istom fakultetu nastavila sam diplomski studij Znanosti o okolišu. U okviru studentske razmjene Erasmus, studiranje sam obogatila pohađanjem 9. semestra na Sveučilištu u Beču.

Tokom studija obavljala sam stručne prakse na Botaničkom zavodu u Laboratoriju za fiziologiju bilja i herbarijskoj zbirci „Herbarium Croaticum“, te volontirala na Welcome Spring Festivalu Udruge Priroda za sve. Pohađani studij, stručne prakse, a posebno sudjelovanje u istraživanju u okviru ovog diplomskog rada potvrdili su moj interes za daljnje usavršavanje i rad u području prirodnih znanosti.