

Učinak sustavne hipertermije na antitumorski potencijal cisplatine i nanokristala resveratrola kod Ehrlichovog ascitesnog tumora u miša

Marinčić, Dragica

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:217:171428>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Dragica Marinčić

**Učinak sustavne hipertermije na antitumorski potencijal
cisplatine i nanokristala resveratrola na Ehrlichov ascitesni
solidni tumor u miša**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno- matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić i neposrednim vodstvom Dyane Odeh, *spec. techn. aliment.* Diplomski rad predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno- matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu s ciljem stjecanja zvanja magistra Molekularne biologije.

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prirodoslovno- matematički fakultet

Biološki odsjek

UČINAK SUSTAVNE HIPERTERMJE NA ANTITUMORSKI POTENCIJAL
CISPLATINE I NANOKRISTALA RESVERATROLA NA EHRLICHOV ASCITESNI
SOLIDNI TUMOR U MIŠA

Dragica Marinčić

Rooseveltove trg, 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti sinergistički učinak sustavne hipertermije uz nanokristale resveratrola i cisplatinu na inhibiciju brzorastućeg EAT, preživljavanje miševa, polarizaciju makrofaga te sposobnost nanokristala resveratrola u smanjenju toksičnih učinaka cisplatinu i hipertermije u jetri i bubregu miševa. Miševima soja Swiss albino izazvan je tumor injiciranjem 1×10^6 stanica EAT subkutano u bedro, a zatim su obrađeni injiciranjem nanokristala resveratrola u dozi 50 mg/kg per os tijekom 5 dana u nizu te cisplatinu u dozi 2,5 mg/kg 10. i 12. dan te u dozi 5 mg/kg 14. dan uz izlaganje sustavnoj hipertermiji pri 41°C. Dobiveni rezultati pokazuju da samostalna primjena nanokristala resveratrola i izlaganje hipertermiji vodi rastu tumora dok primjena nanokristala resveratrola i cisplatinu uz izlaganje sustavnoj hipertermiji ostvaruje izraziti antitumorski učinak inhibicijom rasta EAT u solidnom obliku, ali ne pridonosi znatnijem povećanju preživljavanja životinja. Injiciranje cisplatinu pri hipertermalnim uvjetima povećava životni vijek miševa za 47% u odnosu na kontrolu. Temeljem dobivenih rezultata možemo zaključiti da nanokristali resveratrola mogu polučiti antioksidacije i/ili prooksidacijske učinke u različitim mikrookolišnim uvjetima, ali i sudjelovati u povećanju makrofagne plastičnosti i polarizacije te zaštititi bubreg i jetru od toksičnosti izazvane cisplatinom.

(99 stranica, 27 slika, 6 tablica, 151 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: sustavna hipertermija, cisplatina, nanotehnologija, resveratrol, solidni tumor, 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. Martina Šeruga Musić

Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Rad prihvaćen: 17.2.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Graduation thesis

Faculty of Zagreb

Department of Biology

EFFECT OF SYSTEMIC HYPERTHERMIA ON THE ANTITUMOR POTENTIAL OF CISPLATIN AND RESVERATROL NANOCRYSTALS ON EHRLICH ASCITES SOLID TUMOR IN MOUSE

Dragica Marinčić

Rooseveltovej trg, 6, 10 000 Zagreb, Croatia

The aim of this study was to investigate the synergistic effect of systemic hyperthermia with resveratrol nanocrystals and cisplatin on the inhibition of fast-growing EAT, mouse survival, macrophage polarization, and the ability of resveratrol nanocrystals to reduce the toxic effects of cisplatin and hyperthermia. In Swiss albino mice tumor were induced by injecting 1×10^6 EAT cells subcutaneously into the thigh and then treated by injecting resveratrol nanocrystals at a dose of 50 mg/kg per os for 5 consecutive days and cisplatin at a dose of 2,5 mg/kg day 10 and 12 and at a dose of 5 mg/kg on day 14 with exposure to systemic hyperthermia at 41°C. The results show that the use of resveratrol nanocrystals alone and exposure to hyperthermia leads to tumor growth, while the use of resveratrol and cisplatin nanocrystals with exposure to systemic hyperthermia has a pronounced antitumor effect by inhibiting EAT growth in solid form, but does not significantly increase animal survival. Injection of cisplatin under hyperthermal conditions increased the lifespan of mice by 47% compared to control. Based on the obtained results, we can conclude that resveratrol nanocrystals have antioxidant and/or prooxidative effects in various microenvironmental conditions, but also participate in increasing macrophage plasticity and polarization and protect the kidney and liver from cisplatin-induced toxicity.

(99 pages, 27 figures, 6 tables, 151 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Keywords: systemic hyperthermia, cisplatin, nanotechnology, resveratrol, solid tumor, oxidative stress

Supervisor: PhD Nada Oršolić, Full Professor

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

Reviews: PhD Nada Oršolić, Full Professor

PhD Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.

PhD Maja Matulić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 17th of February, 2021.

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. TUMOR.....	2
1.1.1. Osnovne značajke tumora	2
1.1.2. Podjela i vrste tumora	4
1.1.3. Karcinogeneza.....	5
1.1.4. Molekularna biologija tumora.....	9
1.1.5. Imunologija tumora.....	9
1.2. OKSIDACIJSKI STRES	11
1.2.1. Nastanak i aktivnost slobodnih radikala	11
1.2.2. Antioksidacijska aktivnost	12
1.3. HIPERTERMIJA	13
1.3.1. Sinergistički učinak hipertermije s radioterapijom i kemoterapijom.....	14
1.4. CISPLATINA	15
1.5. RESVERATROL.....	17
1.5.1. Antikancerogeni učinci resveratrola	19
1.5.2. Protuupalno djelovanje resveratrola	20
1.5.3. Ograničenja u korištenju resveratrola u kliničkoj upotrebi.....	21
1.6. NANOTEHNOLOGIJA	22
1.6.1. Nanočestice	23
1.6.2. Toksičnost nanočestica	25
1.6.3. Nanočestice resveratrola	25
1.7. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	26
2. MATRIJALI I METODE.....	27
2.1. MATERIJALI.....	27
2.1.1. Pokusne životinje	27
2.1.2. Tumorske stanice	27
2.1.3. Sustavna hipertermija.....	27
2.1.4. Kemijski spojevi	28
2.1.5. Laboratorijska oprema	28

2.2. METODE	29
2.2.1. Plan pokusa i obrada životinja	29
2.2.2. Praćenje promjene tjelesne mase	30
2.2.3. Praćenje promjene volumena i inhibicija rasta tumora	31
2.2.4. Preživljavanje	31
2.2.5. Mjerenje parametara oksidacijskog stresa	31
2.2.6. Mjerenje dušikovog oksida metodom po Griessu	36
2.2.7. Mjerenje aktivnosti arginaze I	38
2.2.8. Statistička obrada podataka	38
3. REZULTATI	40
3.1. PROMJENA TJELESNE MASE	40
3.1.1. Procjena toksičnosti	40
3.1.2. Promjena mase organa	42
3.2. PROMJENA VOLUMENA TUMORA	44
3.3. INHIBICIJA RASTA TUMORA	45
3.4. PREŽIVLJAVANJE	47
3.5. PARAMETRI OKSIDACIJSKOG STRESA	49
3.5.1. Ukupna koncentracija proteina u uzorcima tkiva bubrega miševa	49
3.5.2. Ukupna koncentracija proteina u uzorcima tkiva jetre miševa	51
3.5.3. Ukupna koncentracija proteina u uzorcima tkiva tumora miševa	52
3.5.4. Razina lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima tkiva bubrega miševa	53
3.5.5. Razina lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima tkiva jetre miševa	55
3.5.6. Razina lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima tkiva tumora miševa	56
3.5.7. Enzimski aktivnost katalaze u uzorcima tkiva bubrega miševa	58
3.5.8. Enzimski aktivnost katalaze u uzorcima tkiva jetre miševa	60
3.5.9. Enzimski aktivnost katalaze u uzorcima tkiva tumora miševa	61
3.5.10. Razina ukupnog glutationa u uzorcima tkiva jetre miševa	63
3.5.11. Razina ukupnog glutationa u uzorcima tkiva tumora miševa	64
3.6. AKTIVNOST DUŠIKOVOG OKSIDA (NO ₂ ⁻) MJERENA INDIREKTNOM METODOM PREMA GRIESSU	66
3.6.1. Aktivnost dušikovog oksida u uzorcima tkiva bubrega miševa	66
3.6.2. Aktivnost dušikovog oksida u uzorcima tkiva jetre miševa	68
3.6.3. Aktivnost dušikovog oksida u uzorcima tkiva tumora miševa	70
3.7. ENZIMSKA AKTIVNOST ARGINAZE 1 (Arg1)	72

4. RASPRAVA.....	74
5. ZAKLJUČAK	84
6. LITERATURA.....	85

POPIS KRATICA

APC- antigen predočne stanice (engl. *antigen presenting cells*)

CAT- enzim katalaza (engl. *catalase*)

EAT- Ehrlichov ascitesni tumor (engl. *Ehrlich ascites tumor*)

EGF- epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*)

EMT- epitelno- mezenhimalna tranzicija (engl. *epithelial- mesenchymal transition*)

FGF- faktor rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor*)

GSH- glutation (engl. *glutathione*)

HIF- hipoksijom inducirani faktor (engl. *hypoxia- inducible factor*)

iNOS- inducibilna dušik oksid sintaza (engl. *inducible nitric oxide synthase*)

MHC- glavni histokompatibilni kompleks (engl. *major histocompatibility complex*)

MDA- malondialdehid (engl. *malondialdehyde*)

MMP- matriks metaloproteinaza (engl. *matrix metalloproteinase*)

RNS- reaktivne dušikove vrste (engl. *reactive nitrogen species*)

ROS- reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

TAM- tumoru pridruženi makrofagi (engl. *tumor associated macrophages*)

TAN- tumoru pridruženi neutrofili (engl. *tumor associated neutrophils*)

TGF- faktor rasta tumora (engl. *tumor growth factor*)

TNF- faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*)

VEGF- vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

1. UVOD

Svake godine desecima milijuna ljudi širom svijeta dijagnosticira se tumor, a više od polovice pacijenata umire od njega. U mnogim zemljama na drugom je mjestu najčešćih uzroka smrti nakon kardiovaskularnih bolesti. Poboljšanjem metoda liječenja i prevencije kardiovaskularnih bolesti, tumor je ili će uskoro postati najčešći uzrok smrti u svijetu (Ma i Yu, 2006). Tumorske stanice rastu autonomno bez kontrole, a morfološki i funkcionalno podsjećaju na normalne stanice od kojih su nastale. Posljedica su promjena u genima koji kontroliraju stanični ciklus, protoonkogeni i tumor-supresora. Danas postoje različite metode njihovog liječenja kao što su kirurško odstranjivanje, radioterapija, sistemska terapija (kemoterapija, imunoterapija, hormonska terapija), hipertermija, gensko liječenje ili kombinacija više navedenih metoda (Grabarević, 2002).

Od kemoterapeutskih sredstava vrlo je poznata cisplatina koja se koristi u liječenju širokog spektra tumora. Ona ne pokazuje selektivnu citotoksičnost za tumorske stanice, pa njezina primjena dovodi i do brojnih nuspojava. Također, tumorske stanice mogu postići rezistenciju na cisplatinu pa se radi bolje učinkovitosti liječenja često koriste kombinirane terapije (Florea i Busselberg, 2011). Antikancerogeni spojevi imaju sposobnost moduliranja onkogenih procesa. U tom kontekstu osobito su bitni prirodni spojevi na koje je stavljen naglasak jer se smatra da bi mogli zamijeniti konvencionalne metode liječenja koje često dovode do uspostavljanja rezistencije (Ko i sur., 2017). Jedan od takvih spojeva je i resveratrol, prirodni polifenol koji ima značajna antitumorska te protuupalna svojstva kako u uvjetima *in vitro* tako i kod eksperimentalnih modelnih životinja te kod ljudi (Udenigwe i sur., 2008). U svrhu povećanja *in vivo* bioraspoloživosti resveratrola, kao i topljivosti u vodi, pozornost se usmjerila ka razvitku nanočestica čime je povećana njegova učinkovitost (Varvandier-Fasseur i Latruffe, 2019). Različita istraživanja ukazala su i na potencijal sustavne hipertermije u terapiji tumora u kombinaciji s kemoterapijom. Ona nudi brojne prednosti kao što su: povećana akumulacija lijekova na mjestu tumora, povećan stanični unos, inhibicija popravljavanja DNA te ubrzana citotoksičnost lijeka (Skitzki i sur., 2009).

Stoga će u ovom radu biti ispitan sinergistički učinak sustavne hipertermije i cisplatine te nanokristala resveratrola na izazvanom solidnom obliku Ehrlichovog ascitesnog tumora (EAT), a zbog sličnosti s ljudskim tumorima upravo se on koristi kao eksperimentalni model

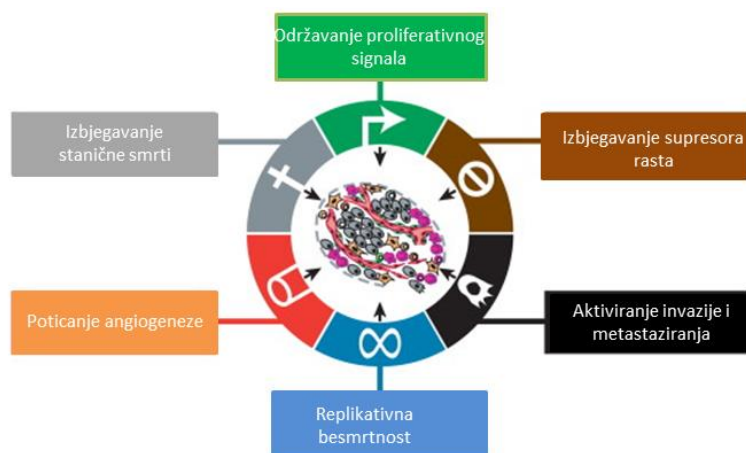
za proučavanje antitumorske i antiangiogenske sposobnosti lijekova i prirodnih komponenti (Abd-Alhaseebisur, 2014).

1.1. TUMOR

Tumori predstavljaju nenormalnu nakupinu stanica monoklonskog porijekla koja se nekontrolirano dijeli te može zahvatiti obližnja tkiva i proširiti se na druge dijelove tijela putem krvi i limfnog sustava. Stanice tkiva *in vivo* kontinuirano osjećaju biokemijsko i mehaničko stanje svoje okoline, prevode izvanstanične signale u unutarstanične signale, integriraju te signale i odgovaraju u skladu s njima. Odgovor na razini stanice može uključivati promjene u metaboličkom stanju, ekspresiji gena, rastu, diferencijaciji, diobi stanica, kretanju stanica ili apoptozi (Adams i sur., 1988). Održavanje homeostaze na razini tkiva uključuje reagiranje na signale iz tkiva i okoline, a poremećaj u bilo kojem koraku detekcije, transdukcije ili odgovora može dovesti do neoplastičnog, tj. abnormalnog, nekontroliranog rasta tkiva, stvarajući neoplaziju ili tumor. Postoji niz čimbenika koji povećavaju rizik nastanka tumora, a možemo ih podijeliti na predodređene (dob, spol i genetska predispozicija) i varijabilne (prehana, okoliš, infekcije, lijekovi i kemoterapije) (Grabarević, 2002).

1.1.1. Osnovne značajke tumora

Hanahan i Weinberg (2000) identificirali su nekoliko bitnih karakteristika tumora prikazanih na Slici 1.



Slika 1. Osnovne značajke tumora

(Preuzeto i prilagođeno prema Hanahan i Weinberg, 2000)

Tumori imaju vlastite signale rasta koje stanice trebaju za ulazak u proliferacijsko stanje, a mnogi onkogeni oponašaju takve signale rasta; neosjetljivi su na inhibitorne signale rasta čime stanice zanemaruju vanjske i unutarnje signale koji reguliraju proliferaciju stanica; izbjegavaju programiranu staničnu smrt (apoptozu); imaju neograničenu sposobnost dijeljenja- dok se normalne stanice dijele obično 50–80 puta (Hayflickova granica), njihova dioba je nekontrolirana čemu pridonosi inaktivacija tumor supresor gena p53; mogu inducirati angiogenezu što dovodi do stvaranja kapilarnih izbojaka iz obližnjih žila, koji ih opskrbljuju hranjivim tvarima; poticati invaziju tkiva i metastaziranje, što je bitno za tumorsku malignost.

Osobitosti maligne stanice također su i genomske promjene, povećana pokretljivost stanica, kemotaksija, promjene na staničnoj površini te lučenje litičkih faktora. One se morfološki razlikuju od normalnih stanica po tome što imaju veliku jezgru nepravilne veličine i oblika te oskudnu citoplazmu s pojavom novih struktura ili nestajanjem normalnih. U određivanju malignosti glavnu ulogu ima jezgra gdje se promatra njena površina, volumen, omjer jezgre i citoplazme, oblik i gustoća te struktura i homogenost. Također se mogu uočiti segmentacije jezgre, invaginacija, promjena u kromatinu, stvaranje inkluzija itd. Zbog povećanog broja mitozu, javljaju se atipični oblici mitoze s defektima mitotskog vretena te često nastaju gigantske stanice ili stanice s više jezgara koje ukazuju na malignost.

Promjene zahvaćaju i druge organele. Dolazi do smanjenja zrnatog endoplazmatskog retikuluma istodobno uz porast slobodnih ribosoma ukazujući na pojačanu proizvodnju proteina potrebnih za proces rasta stanica. Golgijev aparat slabo je razvijen, što uključuje pozitivnu korelaciju s nedostatkom diferencijacije tumorskih stanica, a mitohondriji smanjuju volumen s razvojem tumora, javljaju se i nenormalni procesi glikolize poznati pod nazivom „Warburgov fenomen“. Broj peroksisoma malignih stanica obrnuto je proporcionalan brzini rasta i izražava stupanj gubitka diferencijacije (Baba i Cătoi, 2007).

Tumorski mikrokoliš heterogena je mješavina koja se sastoji od parenhima (neoplastičnih stanica) i strome koja sadrži vezivno tkivo, upalne stanice, endotelne stanice, fibroblaste te krvne i vjerojatno limfne žile. On pridonosi poticanju proliferacije, hipoksije, angiogeneze te metastaziranju (Casey i sur., 2015). Tumorski mikrokoliš ima nisku pH vrijednost i razinu glukoze što može inhibirati aktivnost stanica imunološkog sustava. Niski pH i povećana glikoliza pogoduju napredovanju tumora, izbjegavanju apoptoze i preživljavanju te metastaziranju dok funkcija stanica imunološkog sustava slabi porastom regulatornih stanica T, supresijskih stanica mijeloidnog podrijetla (engl. *myeloid derived*

supresor cells), makrofaga pridruženih tumoru (TAM, engl. *tumor associated macrophags*) te neutrofila pridruženih tumoru (TAN, engl. *tumor associated neutrophils*) (Melvold i Stricca, 2007).

1.1.2. Podjela i vrste tumora

Tumori mogu biti benigni, maligni i semimaligni. Benigni su oni koji ostaju na svom primarnom mjestu bez širenja na druga mjesta u tijelu, obično rastu polako i imaju jasne granice. Ovakvi tumori mogu potiskivati okolna tkiva i vjerojatno se neće vratiti nakon kirurškog uklanjanja. Uobičajeni primjeri ovakvih dobroćudnih tumora su miomi u maternici i lipomi na koži. Neki od njih mogu se pretvoriti u maligne kao što su npr. polipi debelog crijeva. Maligni tumori sadrže stanice koje nekontrolirano rastu i šire se lokalno i/ili na udaljena mjesta krvotokom ili limfnim sustavom (metastaziraju). Metastaze se mogu pojaviti bilo gdje u tijelu, a najčešće se javljaju na jetri, plućima, mozgu i kostima (Patel, 2020). Semimaligni tumori, nazivaju se još i granični (atipično proliferirajući tumori) pokazuju nizak malignitet te nalikuju zloćudnom tumoru niskog histološkog gradusa. Većina tkiva u tijelu može razviti tumor, neka čak razvijaju i nekoliko različitih vrsta, a svaki tumor ima jedinstvene značajke kojima se razlikuje od drugih.

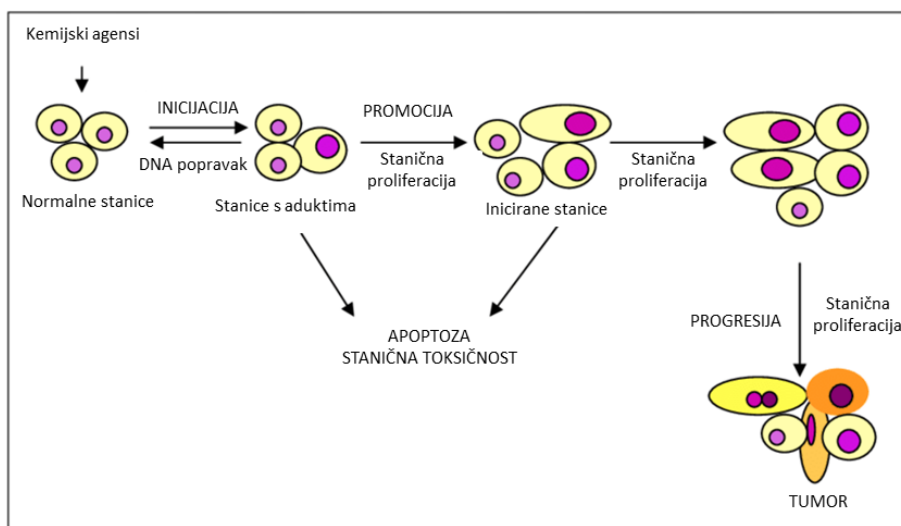
Karcinom je tumor epitelnih stanica koji započinje u koži ili u tkivima koja prekrivaju unutarnje organe te čini 90% od ukupno svih poznatih malignih tumora. Sarkom započinje u kostima, hrskavici, mastima, mišićima, krvnim žilama ili drugom vezivnom ili potpornom tkivu. Leukemije su tumori koji započinju u krvotvornom tkivu, poput koštane srži i uzrokuju stvaranje i ulazak velikog broja nenormalnih krvnih stanica u krv, a limfomi i multipli mijelomi su tumori koji započinju u stanicama imunološkog sustava. Karcinomi središnjeg živčanog sustava su karcinomi koji započinju u tkivima mozga i leđne moždine (Kim i sur. 2011).

1.1.3. Karcinogeneza

Karcinogeneza je proces kojim dolazi to razvitka tumora tijekom duljeg vremenskog perioda kroz korake inicijacije, promocije i progresije (Slika 2). Čimbenici koji utječu na poticanje ovog procesa mogu biti kemijske, fizičke ili biološke prirode, odnosno mogu biti anorganske ili organske tvari, UV i X zračenje te virusne (HPV ili hepatitis B virus) ili bakterijske infekcije (*Helicobacter pylori*). Takvi kancerogeni imaju potencijal izazvati mutacije i genetska oštećenja DNA čime doprinose razvitku tumora. Osim putem ovih kancerogena, mutacije mogu nastati i spontano u organizmu.

Faza inicijacije odvija se brzo i ona je ireverzibilna, no sama po sebi nije dostatna za razvoj tumora. Kemijski spojevi koji pokazuju inicijatorski učinak visoko su reaktivne elektrofilne molekule s manjkom jednog ili više elektrona te reagiraju s elektron bogatim područjima stanice kao što su DNA, RNA i proteini te stvaraju adukte koji se moraju ukloniti mehanizmom za popravak DNA (Grabarević, 2002). Tri važna koraka koja su uključena u inicijaciju su: metabolizam kancerogena, popravak DNA i proliferacija stanica. Mnoga kemijska sredstva moraju se metabolički aktivirati prije nego postanu kancerogena, a ona se većinom metaboliziraju putem citokrom P-450 monooksigenaza. Nepopravljanje kemijskih adukata, praćeno staničnom proliferacijom, rezultira trajnim promjenama ili mutacijama u genomu što može dovesti do aktivacije ili inaktivacije onkogena, gena za supresiju tumora (Minamoto i sur., 1999).

Promocija je reverzibilan korak u kojem kemijska sredstva stimuliraju proliferaciju iniciranih stanica. Uglavnom spojevi za promociju nisu genotoksični, odnosno nisu u stanju stvoriti adukte DNA ili uzrokovati oštećenje DNA, ali su u stanju potaknuti proliferaciju stanica. Stoga izlaganje spojevima koji potiču tumor rezultira brzim rastom iniciranih stanica i stvaranjem neinvazivnih tumora. Slijed kojim se izlaganje odvija važan je jer se tumori ne razvijaju u odsutnosti inicijativnog spoja, čak i ako se sredstvo za promicanje tumora primjenjuje više puta, a zaustavljanje primjene promotora sprječava ili smanjuje učestalost stvaranja tumora. Takva genetska mutacija, uzrokovana pokretačkim sredstvom, ključna je za daljnji neoplastični razvoj pod utjecajem promocijskog sredstva (Martinez i sur., 2003).



Slika 2. Prikaz kemijske karcinogeneze

(Preuzeto i prilagođeno prema: Oliveira i sur., 2008)

Kod stanica izloženih UV i ionizirajućem zračenju karcinogeneza je potaknuta fizički, gdje zračenje direktno oštećuje DNA izbijanjem i eliminacijom baza s jedne ili s obje strane DNA. Također, kao posljedica zračenja dolazi do nakupljanja slobodnih radikala te oslobađanja piramidinskih dimera koji imaju potencijalno mutageno svojstvo (Grabarević, 2002). Progresija se odnosi na postupak stjecanja dodatnih mutacija koje dovode do genomske nestabilnosti, angiogenske aktivnosti, invazije i metastaza. Mnogi inicijatorski spojevi također mogu dovesti do progresije tumora, što rezultira stvaranjem DNA adukata koji, ako se ne poprave, dovode do mutacija (Minamoto i sur., 1999).

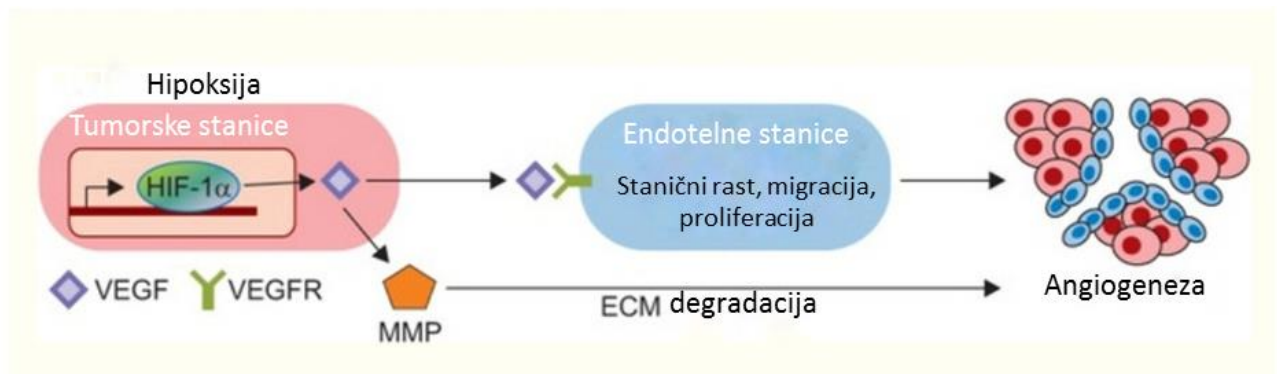
1.1.3.1. Tumorski rast

Tumorski rast odvija se u povoljnim uvjetima tumorskog okoliša, a karakterizira ga povećana proliferacija stanica gdje više stanica ulazi u stanični ciklus te je on učestaliji. Takve stanice imaju duži životni vijek i izbjegavaju proces apoptoze, potiču angiogenezu te sintetiziraju vlastite signale rasta. Također dolazi i do promjene u proteinima koji sudjeluju u kontroli rasta kao što su protoonkogeni. Proliferacija se odvija na način da se faktor rasta veže za svoj receptor na membrani čime se aktiviraju daljnji procesi prijenosa signala u unutrašnjost stanice putem sekundarnih glasnika i kaskadom prijenosnih molekula. Nakon ulaska signala u jezgru aktiviraju se transkripcijski faktori i stanica započinje s proliferacijom. Većina stanica može izlučivati faktore rasta čime potiču dijeljenje susjednih stanica (parakrino djelovanje), no tumorske stanice otpuštaju faktore rasta na koje oni sami reagiraju (autokrino djelovanje) (Lodish i sur., 2000).

1.1.3.2. Tumorska angiogeneza

Proces stvaranja novih krvnih žila naziva se angiogeneza. Njome se stvaraju nove krvožilne mreže za opskrbu hranjivim tvarima, kisikom i imunološkim stanicama te za uklanjanje otpadnih tvari. Rast i metastaze tumora ovise o angiogenezi, ali i limfangiogenezi, koje su potaknute kemijskim signalima iz tumorskih stanica u fazi njegovog brzog rasta (Folkman, 1971). Tumori mogu narasti do otprilike 1–2 mm³ veličine prije nego im se ograniče metaboličke potrebe zbog granice difuzije kisika i hranjivih sastojaka. Za daljnji rast tumor prelazi na angiogeni fenotip i privlači krvne žile iz okolne strome (Carmeliet i Jain, 2000).

Sam proces angiogeneze odvija se u više koraka, a započinje aktiviranjem endotelnih stanica pomoću specifičnih čimbenika rasta koji se vežu za tumorske receptore. Kao rezultat toga, izvanstanični matriks i bazalna membrana (koji okružuju endotelne stanice) lokalno se razgrađuju aktiviranim proteazama. Taj korak omogućuje endotelnim stanicama da invadiraju u okolni matriks i da se dalje razmnožavaju i migriraju kroz matriks. Polarizacijom migracijskih endotelnih stanica stvara se lumen i formira se krvna žila (Ferrara i sur., 2003). Pokretanje tumorske angiogeneze ključna je točka u progresiji tumora i nazvana je "angiogeni prekidač". Ovo obilježje tumora označava pomak od mirovanja ka progresivnom rastu (Hanahan i Patterns, 1996). Taj je proces reguliran raznim pro- i anti-angiogenim čimbenicima, čija ravnoteža određuje tijek angiogeneze. Primjerice, faktor rasta fibroblasta (FGF) i vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) identificirani su kao pozitivni regulatori angiogeneze, dok prva generacija inhibitora angiogeneze uključuje interferon- α , angiostatin i endostatin, a spojevi poput bevacizumaba, sunitiniba i erlotiniba koriste se u kliničkim uvjetima (Kerbel i Folkman, 2002). Kao što je prikazano na Slici 3, kada se u tumorskim stanicama pojavi hipoksični stres, aktivira se transkripcija hipoksija inducirajućeg faktora (HIF) -1 α , što pospješuje ekspresiju VEGF-a. Izlučeni VEGF veže se za receptor VEGFR na površini endotelnih stanica i povećava ekspresiju matriks metaloproteinaza (MMP) u stanicama tumora.



Slika 3. Prikaz indukcije angiogeneze putem VEGF-a

(Preuzeto i prilagođeno prema: Lee i sur., 2015)

Kao rezultat lučenja VEGF-a povećana je angiogeneza tumora, proliferacija i migracija endotelnih stanica (Lee i sur., 2015). Također, mnoge stanice unutar tumorskog mikrookoliša, osim tumorskih stanica, mogu lučiti angiogene čimbenike koji uzrokuju pojačanu vaskularizaciju kao što su fibroblasti i makrofagi povezani s tumorom (Orimo i Weinberg, 2006).

Pored angiogeneze, u tumorima je identificirano i nekoliko drugih mehanizama neovaskularizacije, uključujući intususceptivnu angiogenezu, regrutiranje endotelnih progenitornih stanica, koopciju krvnih žila, vaskulogenu mimikriju i limfangiogenezu. Proces angiogeneze nije važan samo u primarnim tumorima nego i kod stvaranja metastaza i njihovom daljnjem širenju (Ferrara i sur., 2003).

1.1.3.3. Metastaziranje tumorskih stanica

Sposobnost metastaziranja je obilježje malignih tumora i glavni je uzrok smrtnosti kod onkoloških pacijenata. Metastaziranje je proces kojim se stanice tumora odvajaju i šire po tijelu uspostavljajući tako nove kolonije na mjestima udaljenijima od primarnog tumora (Bacac i Stamenovic, 2008). Metastatske stanice ponašaju se genetski i biokemijski drugačije od stanica primarnog tumora iz kojeg su emigrirale (Eccles i Welch, 2007).

Proces metastaziranja je višestupanjski proces koji započinje kada neoplastične stanice rastu, novače upalne stanice, induciraju angiogenezu i započinju uspostavljanje povoljnog mikrookoliša. Neoplastične stanice tada počinju napadati okolno tkivo putem različitih mehanizama djelujući kao pojedinačne stanice (putem EMT) ili kolektivnom migracijom (invazija). Zatim dolazi do prodiranja u limfni ili krvni optjecaj (intravazacija), a pojedinačne stanice koje su ušle u krvožilni sustav mogu tvoriti homotipske (tumorska stanica – tumorska

stanica) ili heterotipske (tumorska stanica – imuna stanica / trombociti) embolije. Tumorske stanice selektivno prijanjaju na endotel ili se zaustavljaju kada je promjer žile premali da bi ga uspješno prošle. Tada adhezijske tumorske stanice izlaze iz žila (ekstravazacija) i stupaju u interakciju s mikrookolišem kako bi stvorile uvjete za proliferaciju i kolonizaciju sekundarnih mjesta. Kolonizacija ovisi o kombinaciji tumorskih stanica i faktora specifičnih za tkivo. Koloniziranjem različitih tkiva može se dogoditi i proces daljnjeg širenja (tj. metastaziranje iz metastaza) (Welch i Hurst, 2019).

1.1.4. Molekularna biologija tumora

Normalni stanični rast i proliferacija regulirani su protoonkogenima. Njihovi mutirani oblici nazivaju se onkogeni i dovode do trajne aktivnosti unutarstaničnih proteina, bez poticaja izvanstaničnim faktorom rasta, što uzrokuje stalnu proliferaciju tumorskih stanica. Pretvorba protoonkogena u onkogen može biti posljedica točkastih mutacija, genetskih amplifikacija ili translokacija. Osobito su poznati onkogeni iz porodice RAS.

Odluke o ulasku u S fazu i proliferaciju, kao i zaustavljanje u G0/G1 fazi staničnog ciklusa ili o diferencijaciji i supresiji metastaziranja temelje se na višestrukim unutarnjim i vanjskim podražajima iz okoline. Ti su procesi regulirani tumor supresor genima od kojih su najpoznatiji RB-1 i p53. Oni su dobro uravnoteženi kod normalnih stanica. Kod tumorskih stanica ravnoteža ovih procesa je poremećena gubitkom ili mutacijom oba alela tumor supresor gena zbog čega su sklone nekontroliranoj proliferaciji i uspostavi genetske nestabilnosti. U normalnim stanicama u slučaju oštećenja DNA stanični ciklus se zaustavlja i stanice se usmjeravaju u apoptozu ili stanično starenje, dok kod tumora stanice s oštećenom DNA, zbog gubitka kontrole, mogu ići dalje u fazu mitoze (Senderowicz i Sausville, 2000).

1.1.5. Imunologija tumora

Imunološki sustav domaćina može razlikovati tumorske stanice kao strane prepoznavanjem različitih vrsta tumorskih antigena. Tumorske antigene tumorske stanice stvaraju na različite načine, uključujući mutaciju normalnih proteina, prekomjernu ekspresiju ili aberantnu ekspresiju proteina, glikoproteina ili glikolipida i proteinskih produkata onkogenih virusa. Antigenska sposobnost aktiviranja imunološkog odgovora domaćina ovisi o čimbenicima kao što su imunogenost, stupanj ekspresije i dostupnost stanicama imunološkog sustava.

Urođena i stečena imunost sudjeluju u uništavanju tumorskih stanica. NK stanice urođene imunosti mogu ubiti ciljane stanice zaražene virusom i izložene stresu, ali također i maligne stanice (koje se mogu smatrati stanicama u stresu). Mnogi tumori gube ekspresiju molekula MHC klase I tijekom maligne transformacije, dok nastavljaju ekspimirati antigene, što ih čini osjetljivima na ubijanje NK stanicama. Također i makrofagi mogu prepoznati neke tumorske antigene i tumoricidno djelovati putem unutar- ili izvanstaničnog oslobođenja lizosomskih enzima. Oni mogu lučiti faktor nekroze tumora (TNF), koji aktivira endotelne stanice i uzrokuje koagulaciju, što dovodi do nekroze tumora i izravno stimulira apoptozu. Osim TNF- α bitni citokini su još i IL-12, IL-15 i interferoni tipa I (IFN- α , IFN- β) koji stimuliraju NK stanice.

Imunološki odgovor stečene imunosti na tumorske stanice odvija se preko T limfocita (CD8⁺) specifičnih za tumorske antigene. Oni zahtijevaju suradnju s antigen predodnim stanicama (APC) (ili dendritičnim stanicama) kako bi se tumorski antigen predstavio T stanicama u sklopu MHC kompleksa. T pomoćničke stanice (CD4⁺) potiču lučenje citokina koji omogućuju razvoj CD8⁺ te citotoksičnu aktivnost makrofaga. Imunološki sustav domaćina može djelovati i preko B limfocita putem specifičnih protutijela protiv tumorskih antigena. Protutijela se mogu vezati za širok spektar tumorskih antigena, uključujući polisaharide, lipide i proteine, za razliku od receptora antigena T-stanica koji prepoznaju samo proteinske antigene. Mehanizmi ubijanja stanica posredovanih antitijelima uključuju staničnu citotoksičnost i citotoksičnost posredovanu komplementima.

Maligni tumori razvili su različite mehanizme za izbjegavanje domaćinskog imunološkog odgovora kao što su neizražavanje potrebnih kostimulacijskih molekula za poticanje imunološkog odgovora ili selektivni gubitak ekspresije imunogenih antigena (zbog njihove genetske nestabilnosti). Gubitak antigena može dati prednost u rastu sve dok antigenska molekula nije potrebna za rast stanica. Tumorski antigeni također mogu povećati imunološku toleranciju u imunološkom sustavu ili se zaštititi od imunološkog prepoznavanja postupkom koji se naziva maskiranje antigena. Stanice tumora mogu lučiti ili ekspimirati faktore koji potiskuju ili blokiraju imunološki odgovor, uključujući transformirajući faktor rasta β (TGF- β), koji inhibira limfocite i makrofage, i Fas ligand, koji dovodi do smrti stanica limfocita (Melvold i Stricca, 2007).

1.2. OKSIDACIJSKI STRES

Kisik je neophodan za proizvodnju energije putem lanca prijenosa elektrona u živim organizmima, a mehanizam kojim se energija (ATP) oslobađa omogućit će stanici da izvrši svoje normalne fiziološke funkcije (Barja, 2004). Većina kisika kojeg stanice uzimaju veže se u vodu djelovanjem staničnih enzima. Neki od ovih enzima propuštaju elektrone u molekulama kisika i dovode do biokemijske reakcije kojom se stvaraju slobodni radikali (Tandon i sur., 2005). Najčešći slobodni radikali su reaktivne kisikove vrste (ROS) ili reaktivne dušikove vrste (RNS), a oni pokazuju afinitet za lipide, proteine i nukleinsku kiselinu (DNA) (Sivanandham, 2011). Pripadnici reaktivnih vrsta kisika uključuju singletni kisik, superoksidni anion (O_2^-), vodikov peroksid (H_2O_2), peroksilni radikal (ROO) i vrlo reaktivni hidroksilni radikal (OH) (Droge, 2002; Van den i sur., 2011). Slobodni radikali nastali iz reaktivnog dušika uključuju dušikov oksid (NO) i peroksitnitritni anion (ONOO) (Victor i sur., 2004).

U normalnim stanicama prisutna je ravnoteža između stvaranja i uklanjanja slobodnih radikala. Međutim, ponekad se može dogoditi da se stvara više slobodnih radikala ili da se razina antioksidacijskih enzima smanjuje, čime se naruši ravnoteža. Nastalo stanje naziva se "oksidacijski stres" i ono može dovesti do razvoja različitih kroničnih i degenerativnih bolesti kao što su tumor, artritis, starenje, autoimuni poremećaji, neurodegenerativne i kardiovaskularne bolesti (Lian i sur., 2008).

1.2.1. Nastanak i aktivnost slobodnih radikala

Do stvaranja slobodnih radikala mogu dovesti normalni stanični metabolizmi poput mitohondrijskog elektronskog transportnog lanca, oksidacije u endoplazmatskom retikulumu i mnogih enzimskih aktivnosti (Tandon i sur., 2005). Također, do njihovog stvaranja mogu dovesti i vanjski čimbenici kao što su zračenja, oksidacija ispušnih plinova motora, tetraklorida i cigaretnog dima (Slater, 1985). Slobodni radikali stvaraju nove slobodne radikale u lančanoj reakciji. Primjerice, kemijska reaktivnost superoksidnog radikala relativno je slaba jer ne može proći kroz lipidnu membranu, ali on ima sposobnost pretvorbe u vodikov peroksid pomoću superoksid dismutaze (SOD). H_2O_2 dalje dovodi do stvaranja još reaktivnije molekule, hidroksilnog radikala, u reakciji sa željezom u Fentonovoj reakciji (Viktor i sur., 2004).

Niske koncentracije slobodnih radikala bitne su za normalne fiziološke funkcije kao što su ekspresija gena, stanični rast i obrana organizma pri infekcijama (Droge, 2002). ROS mogu sudjelovati u biosintezi molekula kao što su tiroksin i prostaglandin koji potiču razvojne procese. Makrofagi i neutrofilni stvaraju ROS kako bi ubili bakterije koje su unijeli putem fagocitoze (Schreck i Baeuerle, 1991).

S druge pak strane, oni su visokoreaktivni zbog nesparenih elektrona i sposobni oštetiti sve tipove biomolekula (proteine, lipide, ugljikohidrate i nukleinske kiseline). Višak slobodnih radikala prilikom oksidacijskog stresa može oštetiti stanične membrane i lipoproteine procesom lipidne peroksidacije čime dolazi do strukturnih promjena i gubitka aktivnosti enzima (Halliwell, 2007). Također, oni mogu oštetiti DNA te tako pridonositi mutagenosti i citotoksičnosti zbog čega imaju bitnu ulogu u karcinogenezi. Vjeruje se da ROS inducira stvaranje mutacija i inhibira DNA popravak što rezultira inaktivacijom određenih gena bitnih za suzbijanje tumora. Krajnji produkt peroksidacije lipida, MDA (malondialdehid), zbog visoke citotoksičnosti i inhibitornog djelovanja na enzime sa zaštitnom ulogom smatra se promotorom i karcinogenom u nastanku tumora (Diplock i sur., 1994).

1.2.2. Antioksidacijska aktivnost

Kao i slobodni radikali, antioksidansi mogu biti proizvedeni endogeno kao što su npr. superoksid dismutaza (SOD), reducirani glutation (GSH) i katalaza ili se mogu uvesti u biološki sustav egzogeno, obično putem prehrane (npr. vitamin C, E, karatenoidi, flavonoidi, likopen) (Halliwell, 2011; Amber i sur., 2013). Antioksidansi djeluju na tri glavna načina: izdvajaju bjelančevine s prijelaznim metalima i tako ih čine nedostupnima za reakciju sa slobodnim radikalima čime se inhibira njihov štetan učinak, neutraliziraju višak slobodnih radikala i sudjeluju u popravku nastale štete pomoću posebnih mehanizama i čime sprječavaju nastanak bolesti (Foyer, 2005). Glavne poznate namirnice s antioksidacijskim kapacitetom su voće i povrće, vino, kava i čaj (Qureshi i sur., 2014). Polifenolni spojevi, kao što je resveratrol, također se istražuju u svrhu ispitivanja njihovih učinaka u antioksidacijskim mehanizmima.

1.3. HIPERTERMIJA

Naziv hipertermija potječe od grčkih riječi *hiper-* više, iznad i *therme-* toplina. To je stanje kojim se označava povišena tjelesna temperatura u usporedbi s normalnom temperaturom. Istraživanja su pokazala da se u liječenju tumora temperatura viša od 41°C smatra učinkovitom (Šamija i sur., 2006). Hipertermija se definira kao primjena egzogenog izvora topline (41- 45 °C) koji izravno ubija tumorske stanice ili povećava učinkovitost drugih terapijskih sredstava npr. radioterapije i kemoterapije (van der Zee, 2002; Hidelbrandt i sur., 2002). Za razliku od groznice, pri čemu dolazi do porasta zadane fiziološke temperature specifičnim termoeffektorima, hipertermija povisuje tjelesnu temperaturu bez promjene fiziološki zadane vrijednosti (Skitzki i sur., 2009). Učinak hipertermije ovisi o dužini njenom izlaganju i stupnju primjenjivane temperature. Ona se može postići grijaćim pokrivačima, mikrovalovima, radiovalovima, ultrazvukom, implantantima, IR zračenjem, zagrijanom tekućinom, elektromagnetskom metodom i nanočesticama. Na temperaturama nižim od 41°C lako se uspostavlja termotolerancija, na temperaturama od 43°C razaraju se stanice mozga te bjelančevine prisutne u svim tkivima podliježu denaturaciji, a na temperaturi od 45°C stvaraju se ireverzibilna oštećenja stanica (Hahn, 1982; Field i Hand, 1990).

Obzirom na način primjenjivanja hipertermije, razlikuju se sustavna (opća), regionalna i lokalna hipertermija. Sustavna hipertermija primjenjuje se na čitavom tijelu u slučaju prisutnosti metastaza, a osobito u liječenju leukemija i limfoma. Ona se provodi na temperaturi 41,5-42°C, tijekom jednog sata u vrućim kupkama, gdje osobito treba paziti da temperatura ne prijeđe 42°C kako bi se izbjegla ireverzibilna oštećenja organa kao što su mozak i jetra. Regionalna hipertermija, kao i lokalna, uspostavlja se najčešće frekvencijama od 3000 kHz- 3 MHz pomoću ultrazvuka. One se međusobno razlikuju u tome što se regionalna primjenjuje u slučaju lokalno uznapredovalog tumora koji se proširio i na regionalne limfne čvorove te tako zahvatio veću površinu tijela, dok se lokalna primjenjuje u svrhu liječenja solidnih tumora koji se nalaze uz površinu tijela ili malo ispod površine. Za regionalnu i lokalnu hipertermiju može se koristiti nešto veća temperatura u odnosu na sustavnu te se ona održava između 42 i 45°C (Šamija i sur., 2006).

Iako se hipertermija koristi još od vremena starih Grka u svrhu liječenja tumora, ova metoda naišla je na brojna ograničenja u svojoj upotrebi. Naime, glavni problemi bili su neuspjeh zagrijavanja tumorskog tkiva bez oštećenja obližnjih, zdravih stanica te nemogućnost ciljanja nevidljivih mikrometastaza. Posljednjih godina došlo je do napretka u

termičkoj terapiji razvojem nanočestica čime su se prevladali ovi problemi. I dalje se ne zna u potpunosti koje negativne učinke donosi upotreba nanočestica, ali se zna da normalna tkiva pokazuju pojačanu termotoleranciju u usporedbi s tumorskim, iako sam mehanizam kojim se to kontrolira nije poznat (Habash i sur., 2006). Novi pristup ovakvom liječenju tako pružaju magnetske nanočestice (MNP) u kombinaciji s toplinom. Nanočestice željezovog oksida unose se u ciljno tkivo, a magnetsko polje koristi se za zagrijavanje, a to pruža priliku za zagrijavanje tumora smještenih u dubokim dijelovima tijela poput lubanje (za liječenje čestih glioblastoma) ili zdjelice (za liječenje karcinoma prostate i vrata maternice) (Franckena i sur., 2006). Nuspojave sustavne i regionalne hipertermije mogu se pojaviti u vidu mučnina, povraćanja i proljeva, a tek u težim slučajevima može doći do problema sa srcem, krvnim žilama te drugim organima (van der Zee, 2002). Poboľšanom tehnologijom negativni učinci svedeni su na minimum te uglavnom problemi uzrokovani njome nisu ozbiljni (van der Zee, 2002).

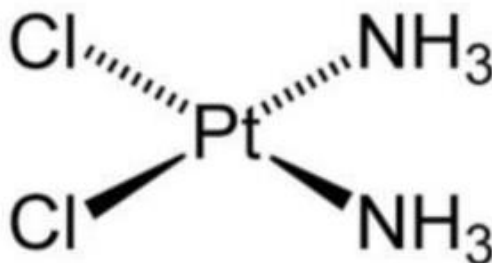
1.3.1. Sinergistički učinak hipertermije s radioterapijom i kemoterapijom

Hipertermija ima izravan učinak na stanice tumora i to uglavnom u S fazi staničnog ciklusa, pri kiselom pH, kada su stanice radiootporne. Stoga su radioterapija i hipertermija komplementarne u svom djelovanju: radioterapijom nastaju slobodni radikali koji oštećuju DNA tumorskih stanica, a hipertermija inhibira njezin oporavak. Prije X-zračenja, zagrijane stanice pokazale su učinak inhibicije loma DNA lanaca kao i popravka izrezivanja oštećenih baza (Kampinga i Konings, 1987). Također, hipertermija uspješno vraća osjetljivost tumorskih stanica na neke lijekove na koje su ranije uspostavili rezistenciju, uglavnom na alkilirajuća sredstva. Ona pojačanom perfuzijom tkiva olakšava apsorpciju kemoterapeutika (API- engl. *active pharmaceutical ingredients*) kroz staničnu membranu te se kemijska reakcija ubrzava. Na ovaj način kemoterapija postaje učinkovitija i manje toksična (Shrivastava i sur., 1989). Tumorsko tkivo sadrži aerobne i anaerobne stanice različite osjetljivosti na cisplatinu. Kod aerobnih stanica lako se uspostavlja sinergistički učinak cisplatine i hipertermije, budući da one pokazuju osjetljivost i na jedno i na drugo, dok s druge strane anaerobne stanice pokazuju osjetljivost na hipertermiju, ali i rezistenciju na cisplatinu. Stoga kod njih nije moguće ostvariti sinergistički učinak. Mehanizmi kojim temperatura poboljšava svojstva kemoterapeutika karakteristična su za svaku pojedinu skupinu. Alkilirajući lijekovi, kao što je cisplatina, stvaraju jednolančane, ali i dvolančane lomove DNA koji se pod djelovanjem temperature popravljaju s manjom učinkovitošću

(Turić i sur., 1996). Ispitivanja su pokazala da najpovoljniji citotoksični učinak ostvaruje blaga hipertermija (unutar raspona groznice, 39-41°C) i umjerena hipertermija (41°C), a ona kad je združena s kemoterapijom u nanoplatformama nudi brojne prednosti kao što su: povećana akumulacija lijekova na mjestu tumora, povećan stanični unos, inhibicija popravljavanja DNA te ubrzana citotoksičnost lijeka (Skitzki i sur., 2009).

1.4. CISPLATINA

Cisplatina, odnosno *cis*- diamindikloroplatina (II), je dobro poznati kemoterapeutski lijek cistatičkog djelovanja. To je žuta kristalinična krutina, koja pokazuje slabu topljivost u vodi dok je u većini otapala netopiva, osim u N,N- dimetilformamidu. Pri 270°C dolazi do njenog raspada pri čemu se oslobađaju toksične pare klora i dušikovog oksida (Cepeda i sur., 2007). Prvi put sintetizirao ju je Michele Peyrone 1844. godine, a njenu kemijsku strukturu objasnio je Alfred Werner 1893. godine (Slika 4). Tek 1960-ih radila su se istraživanja o utjecaju električnog polja na bakterijski rast kojima je potvrđeno da nastale platinske mreže mogu inhibirati staničnu diobu bakterije *Echerichia coli* te se tada pojavio interes za ispitivanje učinkovitosti ovog spoja protiv tumora (Rosenberg i sur., 1965).



Slika 4. Kemijska struktura cisplatine

(Preuzeto od: Dasari i Tchounwou, 2014)

Cisplatina je prvi spoj platine koji je odobrila FDA za liječenje tumora 1978. godine (Kelland, 2007). Koristi se za liječenje brojnih tumora uključujući tumore mokraćnog mjehura, glave, vrata, pluća, jajnika, zametnih stanica te karcinoma, sarkoma i limfoma (Dasari i Tchounwou, 2014). Njeno djelovanje popraćeno je toksičnim nuspojavama i tumorskom rezistencijom zbog čega može doći i do sekundarnih malignosti (Chen i sur., 2009).

Predloženi mehanizmi rezistencije na cisplatinu su promjene u staničnom primanju i otpremanju ovog lijeka, povećana biotransformacija i detoksifikacija u jetri te povećana

sposobnost mehanizama za DNA popravak i anti-apoptotskih mehanizama (Gottesam i sur., 2002). Neka istraživanja *in vitro* pokazuju da rezistencija na cisplatinu može biti i posljedica epigenetskih promjena na molekularnoj i staničnoj razini, promjena u statusu metilacije DNA, transportu membranskih proteina, neispravne organizacije citoskeleta, prekomjerne ekspresije šaperona, uzvodno ili nizvodno regulirane ekspresije mikroRNA (miRNA1) te transkripcijskih faktora i malih GTP-aza (Shen i sur., 2012).

Zbog rezistentne osobitosti ovog lijeka rade se istraživanja u svrhu pronalaska drugih kompleksa s platinom koji će imati smanjenu toksičnost, nedostatak rezistencije te poboljšane farmakološke značajke u usporedbi s cisplatinom (Lebwohl i Canetta, 1998). Također, cisplatina se često koristi u kombinaciji s drugim lijekovima za bolji sinergijski učinak čime se pribjegava uspješnom uništavanju tumorskih stanica, a izbjegavanju dodatnih nuspojava (Desoize i Madoulet, 2002).

Intravenoznim unosom cisplatine ona brzo difundira u tkiva, a tamo se veže na proteine plazme što je posljedica reakcije platine i sumpora tiolnih skupina aminokiselina, primjerice cisteina. Na takav način se inaktivira čak 90% molekula cisplatine, a kako bi se cisplatina uspješno vezala za DNA ona mora izgubiti kloridne ligande. Izvan stanice koncentracija iona klora je približno 100mM, dok je u njenoj unutrašnjosti 2-30mM. Stoga se cisplatina aktivira tek kada uđe u stanicu gdje molekule vode u citoplazmi istiskuju atome klora na cisplatinu pri čemu nastaju kationi $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}(\text{NH}_3)_2]^+$ i $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$. Mehanizmi ulaska cisplatine u stanicu nerazjašnjeni su, ali se smatra da je u pitanju pasivna difuzija ili da se taj prijenos odvija preko proteina (Jamieson i Lippard, 1999). Sada je ovakav hidrolizirani produkt jak elektrofil i može reagirati s bilo kojim nukleofilom, uključujući sulfhidrilne skupine na proteinima i donore dušikovih atoma na nukleinskim kiselinama. Vezanje cisplatine s purinskim bazama najčešće je u obliku 1,2 d(GpG) adukta (90%) ili u obliku 1,2 d(ApG) adukta (10%) i oni doprinose toksičnosti cisplatine (Beck i Brubaker, 1973; Fraval i sur., 1978). Pretpostavlja se da je izostanak farmakološke aktivnosti *trans*-izomera povezan sa stvaranjem drugačijih DNA adukta. Zbog steričkih razloga ovaj izomer ne može stvoriti 1,2- unutarlančane adukte između susjednih purina istog DNA lanca već stvara 1,3- unutarlančane adukte. Popravak izrezivanjem nukleotida učinkovitije uklanja 1,3- unutarlančane adukte u usporedbi s 1,2 aduktima, a smatra se da je upravo stvaranje 1,2- unutarlančanih adukta ključno za citotoksičnu aktivnost cisplatine (Cepeda i sur., 2007).

Glavni mehanizmi kojima ovaj lijek suzbija tumore je sposobnost vezanja na N7 reaktivni centar purinskih ostataka na DNA i ometanje mehanizama popravka DNA.

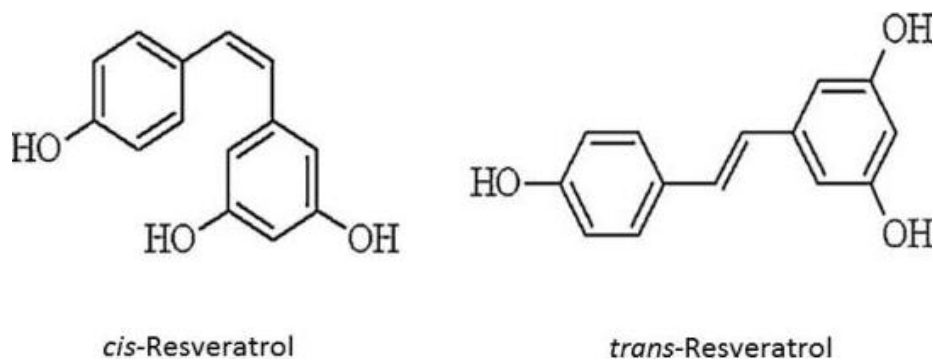
Posljedično dolazi do nagomilavanja DNA oštećenja, zaustavljanja staničnog ciklusa, inhibicije transkripcije te induciranja smrti tumorskih stanica (apoptoza ili nekroza) (Dasari i Tchounwou, 2014). Budući da DNA pokazuje najveću osjetljivost tijekom diobe, kad su lanci razdvojeni i skloni alkiliranju, citotoksičnost cisplatine se više vidi na tumorskim stanicama koje se češće dijele u usporedbi s normalnima (Cepeda i sur., 2007), ali se vidi i na zdravim stanicama koje se intenzivno dijele kao što su stanice koštane srži, sluznica i epitela. Jedan od važnijih mehanizama uključenih u toksičnost cisplatine je i oksidacijski stres. Primarno mjesto oksidacijskog stresa je mitohondrij gdje pod cisplatinskim učincima dolazi do gubitka sulfhidrilne skupine mitohondrijskih proteina, inhibicije unosa kalcija i smanjenja potencijala mitohondrijske membrane (Saad i sur., 2004). Ovaj se lijek akumulira u ljudskim stanicama jetre i bubrega, a kao rezultat toga dolazi do povećanog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i smanjene razine antioksidacijskih enzima (Dasari i Tchounwou, 2014). Stvaranje reaktivnih vrsta kisika ovisi o koncentraciji *cis*-diamindikloroplatine (II) i duljini izloženosti, a stanična smrt nastaje trenutnom aktivacijom brojnih signalnih putova (Bozovic i sur., 2010). Cisplatina remeti homeostazu kalcija i tako dovodi do događaja kao što su lipidna peroksidacija i enzimska inhibicija. Ovi događaji oštećuju stanice oštećivanjem njihovih mitohondrija, inhibicijom funkcije mitohondrija te crpljenjem adenozin trifosfata (ATP) što dovodi do apoptoze ili nekroze. Stoga, povišene razine kalcija mogu utjecati na zaštitu stanica jer se natječu za ista vezna mjesta kao i cisplatina te na takav način smanjuju toksičnost povezanu s ovim lijekom (Dasari i Tchounwou, 2014).

Liječenje cisplatinom povezano je s nekoliko toksičnih nuspojava, uključujući nefrotoksičnost (de Jongh i sur., 2003), hepatotoksičnost i kardiotoksičnost (Al-Majed, 2007). Nuspojave liječenja cisplatinom su anemija, gubitak kose i oslabljen imunološki sustav, a može uzrokovati i akutno otkazivanje bubrega, koji je sadrže u većoj koncentraciji u usporedbi s drugim organima, jer se putem njih vrši njeno izlučivanje (Lau, 1999).

1.5. RESVERATROL

Resveratrol (3, 4', 5-trihidroksistilben) je spoj iz skupine aromatičnih fitoaleksina koji je prvi put izoliran iz biljke *Veratrum grandiflorum* (bijeli kukolj) 1940-ih. On u biljkama ima važnu ulogu u obrani prilikom biotičkih infekcija, ali i tijekom abiotičkog stresa. Pretežito se pojavljuje u grožđu, kikirikiju, bobičastom voću i kurkumi. Naziv resveratrol vjerojatno potječe od fragmenata riječi res - ime komponente, rezorcinola, koja je derivat resveratrola; -

veratr - prema biljci *Veratrum* odakle je izoliran i -ol - što ukazuje na prisutnost hidroksilnih skupina (Catalgol i sur., 2012; Varvandier-Fasseur i Latruffe, 2019). Kemijska struktura resveratrola identificirana je u dvije izomerne forme, *cis*- i *trans*- resveratrol (Slika 5), s tim da je *trans* oblik dominantan u pogledu rasprostranjenosti i bioloških učinaka, a on pri izlaganju UV zračenju može prijeći u *cis* oblik (Salehi i sur., 2018).



Slika 5. Kemijska struktura *cis* i *trans*- resveratrola (*cis* i *trans*- 3, 4', 5- trihidroksistilbena)

(Preuzeto od: Salehi i sur., 2018)

Na stabilnost i topljivost resveratrola utječu pH vrijednost i temperatura. Povećavajući pH ovaj stilben se eksponencijalno degradira zbog čega se najstabilnijim smatra u tekućoj formi, pri niskom pH i temperaturi uz ograničeno izlaganje kisiku i svjetlu. Nakon otapanja u vodi resveratrol je stabilan na sobnoj i tjelesnoj temperaturi (Zupančić i sur., 2015). Ovaj spoj pokazuje povoljne učinke na kardiovaskularni sustav, živčani sustav, ali i antikancerogeno, antimikrobno i protuupalno djelovanje, kako u uvjetima *in vitro* tako i kod eksperimentalnih životinja, ali i ljudi. Također, ima svojstva snižavanja šećera u krvi i učinke produženja života (Salehi i sur., 2018). Zanimljivo je da Francuzi, unatoč tome što im je prehrana bogata zasićenim mastima, imaju neočekivano nisku stopu srčanih bolesti, a kao rješenje za taj "francuski paradoks" smatra se bitnim prisutnost resveratrola u crnom vinu (koncentracije od 0,1-14,3 mg/L) kojeg konzumiraju u većim količinama (Renaud i sur. 1992). Pokazano je i da ima sposobnost pojačavanja učinaka stanične smrti, kemoterapijskih sredstava i γ -zračenja, a glavni ciljni organi djelovanja resveratrola su jetra i bubrezi gdje se on koncentrira nakon apsorpcije i pretvara u sulfatirani oblik i glukuronidni konjugat. Osim kemopreventivnih učinaka resveratrol blokira proces karcinogeneze djelujući na svaki stupanj njenog procesa (Aggarwal i sur., 2004). Budući da ne pokazuje štetne učinke kada se konzumira u nešto većim koncentracijama on predstavlja potencijal u dodatnom ili alternativnom liječenju

tumora, ali i upalnih bolesti (Udenigwe i sur., 2008). Zbog toga se istraživanja sve više baziraju na strukturnim analogima resveratrola s boljom biološkom dostupnošću u svrhu poboljšanja terapijskog učinka u liječenju tumora (Aggarwal i sur., 2004).

1.5.1. Antikancerogeni učinci resveratrola

Brojna istraživanja *in vitro* i *in vivo* pokazala su antikancerogeno djelovanje ovog spoja, kao i njegove antiproliferativne sposobnosti koje se i dalje aktivno istražuju budući da maligne stanice imaju deregulirane signalne puteve zbog čega dolazi do nekontrolirane proliferacije stanica, izbjegavanja programirane stanične smrti te poticanja angiogeneze i metastaziranja (Singh i sur., 2015). Antikancerogeno djelovanje prvenstveno se temelji na indukciji apoptoze, kao i promjeni ekspresije gena što posljedično utječe na smanjenje inicijacije nastanka tumora te njegove promocije i progresije (Udenigwe i sur., 2008).

Vjeruje se da resveratrol cilja na komponente unutarstaničnog signalnog puta kao što su regulatori preživljavanja, proupalni medijatori, tumorski angiogeni i metastatski prekidači mijenjajući tako set transkripcijskih faktora, uzvodnih kinaza i njihovih regulatora (Kundu i sur., 2008). Uzvodnu regulaciju vrši preko proteina p21Cip1/WAF1, p53 i Bax, a nizvodnu preko survivina, ciklina D1 i E, Bcl-2, Bcl-xL, cIAP i aktivacije kaspaza. Resveratrol može spriječiti aktivaciju transkripcijskih faktora (NF- κ B, AP-1 i Egr-1) i inhibirati različite protein kinaze (npr. JNK, MAPK, Akt i kazein kinazu II) što će posljedično utjecati na smanjenje regulacije proizvoda gena kao što su COX-2, 5-LOX, VEGF, IL-1, IL-6, IL-8, AR i PSA čime dolazi do supresije angiogeneze. Inaktivacijom transkripcijskog faktora NF- κ B osobito se poboljšava učinkovitost kemoterapije onemogućavajući tumorskim stanicama njegovo korištenje za kontrolu ekspresije određenih gena (Shukla i sur., 2011).

Povoljno djelovanje tako ovaj stilben pokazuje u liječenju širokog spektra tumora uključujući limfoidne i mijeloidne tumore, multiple mijelome, tumor dojke, prostate, želuca, debelog crijeva, gušterače, štitnjače, melanome te karcinome jajnika i vrata maternice (Aggarwal i sur., 2004). Na temelju provedenih eksperimentalnih i kliničkih ispitivanja te s obzirom na molekularne osobitosti resveratrola on bi se mogao koristiti kao: a) neoadjuventno kemoterapijsko sredstvo prije operacije u svrhu smanjenja volumena tumora (zahvaljujući sposobnosti inhibicije proliferacije te poticanju apoptoze), b) pomoćni kemoterapijski lijek za inhibiranje rane invazije i metastaziranja nakon operacije, c) sredstvo za pojačavanje osjetljivosti tumorskih stanica na radioterapiju i kemoterapiju, d) preventivna zaštita kod ljudi

s visokim rizikom za nastanak raka, e) zaštitno sredstvo za smanjenje štetnih posljedica liječenja radioterapijom (Salehi i sur., 2018).

Resveratrol pokazuje različit efektivni raspon doza u uvjetima *in vitro* (mikromolarni raspon u medijima staničnih kultura) u usporedbi s bioraspoloživošću u uvjetima *in vivo* (nanomolarni raspon u krvi) što otežava određivanje stvarne, biološki učinkovite, koncentracije ovog spoja (Bottner i sur., 2006). Kako navode Williams i sur. (2009) kod štakora doza od 750 mg/kg tjelesne težine dnevno ne pokazuje toksične učinke. Iako se smatralo da resveratrol ne pokazuje štetne učinke, odgovori na obradu resveratrolom u uvjetima *in vitro* i *in vivo* uvelike ovise o njegovoj dozi, gdje pri malim dozama dolazi do pozitivnih odgovora, a pri većim dozama mogu se javiti i negativni učinci kao posljedica toksičnosti (Calabrese i sur., 2010).

1.5.2. Protuupalno djelovanje resveratrola

Resveratrol pokazuje značajnu protuupalnu aktivnost, a ona se najviše očituje modulacijom enzima i putova u kojima se stvaraju posrednici upalnog procesa te indukcijom programirane stanične smrti i aktivacijom stanica imunološkog sustava (Udenigwe i sur., 2008). Ovaj stilben vrlo učinkovito uklanja reaktivne kisikove i dušikove vrste (ROS i RNS), kao i sekundarne organske radikale koji su nastali kao posljedica reakcija biomolekula s ROS i RNS (Ordova- Gomez i sur., 2013). Svojstvo jake sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala povezano je s prisutnošću tri hidroksilne skupine na položajima 3, 4' i 5 kao i prisutnošću aromatskih prstenova te dvostruke veze u molekuli (Iuga i sur., 2012). Zamjena hidroksilne grupe s – OCH₃ grupom rezultira gubitkom antioksidacijskih sposobnosti ovog spoja, a 4' hidroksilna skupina reaktivnija je od preostale dvije (Caruso i sur., 2004).

Resveratrol povećava ekspresiju određenih enzima odgovornih za održavanje oksidacijsko-redukcijske ravnoteže u stanici, kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza, hem oksigenaza i glutation peroksidaza (Robb i sur., 2008). Primjer takvog učinka resveratrola primijećen je u mišjim stanicama hipokampusa (HT22) obrađenim visokim koncentracijama glutamata, što je uzrokovalo povećani oksidacijski stres, gdje je dokazano da resveratrol inducira ekspresiju mitohondrijske superoksid dismutaze aktiviranjem signalnog puta PI3K/AKT i GSK-3β-β-katenina (Fukui i sur., 2010). Prema navodima Kavas i sur. (2013), slično kao i drugi polifenoli, resveratrol djeluje kao kelator za metalne ione i sprječava stvaranje slobodnih radikala u Fentonovoj reakciji. Mete djelovanja resveratrola su

ciklooksigenaza (COX), 5- lipooksigenaza (5-LOX) i protein kinaza B što je povezano s inhibicijom COX-1 i COX-2 aktivnosti preko inhibiranja aktivnosti transkripcijskih faktora koji su direktno uključeni u COX regulaciju (Dvorakova i sur., 2017). Svaki antioksidans također je i redoks sredstvo zbog čega resveratrol može postati prooksidans i ubrzavati peroksidaciju lipida te izazivati oštećenja DNA pri određenim okolnostima. Takvo prooksidacijsko djelovanje važan je mehanizam kojim resveratrol ostvaruje antikancerogene i apoptotičke učinke (De la Lastra i Villegas, 2007).

Proces upale ključan je u razvoju tumora, posebno u kroničnim upalnim stanjima, a protuupalno djelovanje resveratrola dobro je dokumentirano u brojnim tumorskim stanicama i temelji se na različitim mehanizmima što ide u prilog objašnjenju mnoštva putova u borbi protiv tumora posredovanih ovim polifenolom (Varoni i sur., 2016).

1.5.3. Ograničenja u korištenju resveratrola u kliničkoj upotrebi

Resveratrol ne pokazuje toksične nuspojave ako se odredi prikladna doza i način primjene (Van Ginkel i sur., 2007). Oralno konzumiranje u visokim dozama od 20 mg/kg kod štakora ne pokazuje toksične učinke, a ova doza je tisuću puta veća nego se nalazi u jednoj čaši vina kojeg ljudi konzumiraju dnevno (Juan i sur., 2002). Odsutnost toksičnosti pokazana je i kod ljudi koji su primili jednu dozu od 5 g resveratrola (Boocock i sur., 2007). Iako nedostatak toksičnosti ovog spoja zvuči obećavajuće u njegovom kliničkom korištenju postoje ograničenja koja to ometaju. Najvažnija od njih su slaba bioraspoloživost i topljivost te brzo metaboliziranje. Oralni unos 25 mg resveratrola pokazao je nisku bioraspoloživost jer su se u plazmi mogli otkriti samo tragovi (<5,0 ng/mL) nemetaboliziranog resveratrola (Walle i sur., 2004). Na topljivost i stabilnost resveratrola utječe uvelike pH, a topljivost u vodi (<0,05 mg/mL) utječe na njegovu apsorpciju. Istraživanja su otkrila da topljivost resveratrola pri pH 1,2 iznosi 64 µg/mL, a ona postaje 61, odnosno 50 µg/mL pri pH 6,8 i iznad 7,4 (Zupančić i sur., 2015). Resveratrol pokazuje visoku osjetljivost na razgradnju u ovisnosti o svjetlu, temperaturi, kisiku i oksidacijskim enzimima gdje lako prelazi u *cis*-formu koja je slabije biološke aktivnosti (Davidov- Pardo i McClements, 2015).

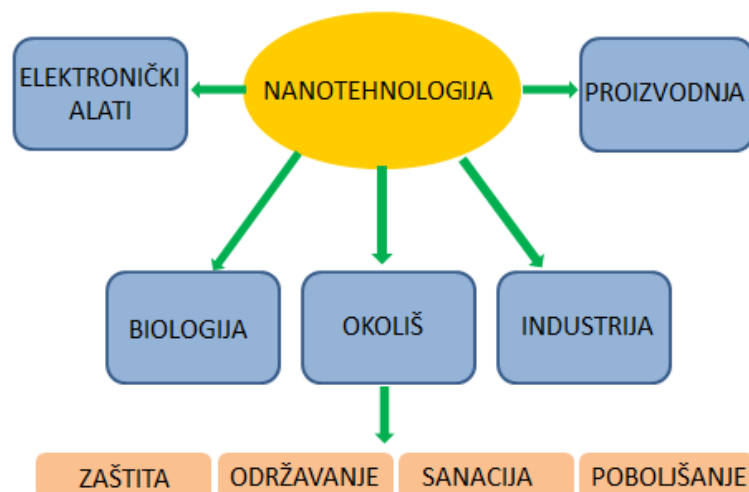
Nakon oralnog uzimanja ovaj spoj se podvrgava pasivnoj difuziji te stvara komplekse s prijenosnicima kao što su integrini, albumin i lipoprotein male gustoće (LDL) (Delmas i sur., 2011). Nadalje, crijevne bakterije rastavljaju ga do benzojeve, feniloctene i propionske kiseline gdje od njih u jetri, u fazi metabolizma II nastaju glukuronizirani, sulfatirani i

metilirani proizvodi koji imaju biološke aktivnosti (Burkon i Somoza, 2008). Resveratrol ima sposobnost pojačavanja vlastitog metabolizma pojačavajući aktivnost enzima jetre faze II metabolizma (Lancon i sur., 2004).

Unatoč slaboj biorasploživosti te brzom metabolizmu i uklanjanju iz organizma (zbog čega je nemoguće održavati relevantnu koncentraciju u krvi), resveratrol pokazuje bitnu biološku aktivnost (Vitaglione i sur., 2005). Predlažu se brojni načini za poboljšanje biorasploživosti ovog spoja kao što su kombiniranje s drugim prirodnim spojevima, koji mogu inhibirati njegov metabolizam *in vivo*, upotreba sintetskih analoga te isporuka resveratrola posredstvom nanočestica (Ndiaye i sur., 2011).

1.6. NANOTEHNOLOGIJA

Nanotehnologija se bavi manipulacijom i kontrolom tvari u nanorazmjernoj dimenziji korištenjem znanstvenog znanja iz industrijskih i biomedicinskih primjena (Jeevanandam i sur., 2018). Začetnikom moderne nanotehnologije smatra se nobelovac Richard P. Feynman koji je 1959. godine pod izrazom "ima dovoljno mjesta na dnu" predstavio koncept manipulacije materijom na atomskoj razini (Iijima, 1991). Ova tehnologija svakodnevno utječe na ljudski život te su njene potencijalne koristi brojne. Slika 6 prikazuje neke od primjena nanotehnologije (Jalaja i sur., 2016).



Slika 6. Primjena nanotehnologije

(Preuzeto i prilagođeno prema: Mobasser i Firoozi, 2016)

Osobito su bitni doprinosi medicinskih nanomaterijala koji se, osim za poboljšanu isporuku lijekova, koriste i za stvaranje antibakterijskih obloga medicinskih pribora, smanjenje upale, bolje zacjeljivanje tkiva, otkrivanje slobodnih tumorskih stanica u cirkulaciji i sl. Zbog nedostatka dovoljno informacija o toksičnosti, potencijal negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje i dalje je upitan (Chen i Schluesener, 2008).

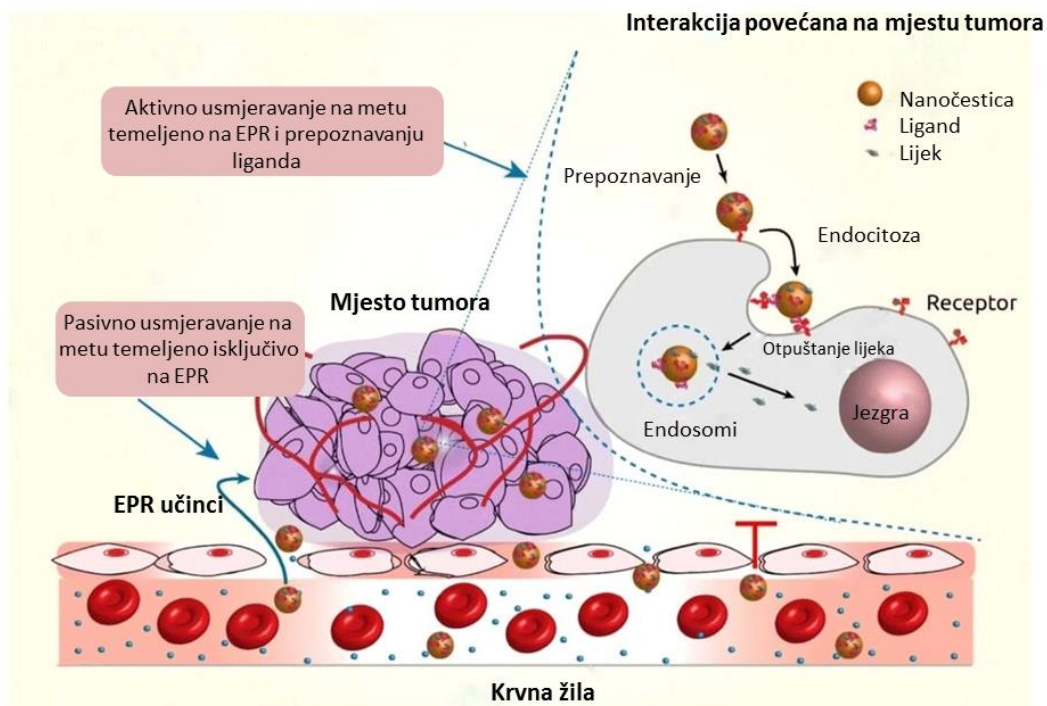
1.6.1. Nanočestice

Definicija nanočestica jest da su to koloidne čestice sfernog oblika čija se veličina razmatra u jednoj, dvije ili tri dimenzije, s promjerom veličine 1–100 nm (Sajid i sur., 2015). Isporukom lijeka u obliku nanočestica koje imaju malu veličinu, a veliku površinu poboljšana je topljivost te bioraspoloživost lijeka (Kohane, 2007). One mogu biti izrađene od zlata, platine, srebra i paladija (Dreaden i sur., 2012). Prema nastanku, nanočestice se mogu podijeliti na: prirodne, one nastaju bez čovjekovog utjecaja, npr. morska sol i vulkanska prašina, antropogene, nastale čovjekovim indirektnim utjecajem na okoliš, npr. čađa te sintetizirane, dizajnirane umjetnim putem s posebnom svrhom (Weisner i Bottero, 2007). Dizajnirane se sastoje od tri sloja: površinski sloj, koji se može vezati s brojnim malim molekulama, metalnim ionima, tenzidima i polimerima; sloj ljuske, koji je kemijski drugačijeg materijala od jezgre te jezgra, koja je središnji dio same nanočestice i obično podrazumijeva ono što nanočestica jest (Shin i sur., 2016). Nanomaterijali mogu biti organskog, anorganskog, proteinskog i lipidnog sastava, a kontrola funkcionalnosti ovih materijala u dopremanju lijeka na ciljno mjesto radi se pomoću veličine i oblika (morfologije) nanočestica. Uporaba nanonosača za isporuku lijekova nudi brojne prednosti kao što su zaobilazak problema topljivosti i stabilnosti lijekova protiv tumora, sprječavanje razgradnje lijeka proteazama i drugim enzimima te povećanje poluživota lijeka u sistemske cirkulaciji, poboljšavanje raspodjele i usmjeravanja lijekova, kontinuirano oslobađanje lijeka ciljanjem određenih mjesta na tumoru i isporuka veće količine lijeka, a time i smanjenje rezistencije na lijekove (Slika 6) (Navya i Daima, 2016).

Liposomi se često koriste kao potencijalni nosači lijeka zbog njihovih jedinstvenih prednosti koje uključuju sposobnost zaštite lijekova od razgradnje, ciljanja na mjesto djelovanja i smanjenja štetnosti i drugih nuspojava. Međutim, rad na liposomskim lijekovima ograničen je zbog problema lošeg skladištenja i stabilnosti. S druge strane, polimerne nanočestice obećavaju neke prednosti u odnosu na liposome kao što je posjedovanje prikladnih svojstava kontroliranog otpuštanja lijeka. Većina poluvodičkih i metalnih

nanočestica imaju neizmjeran potencijal u dijagnostici i terapiji tumora zbog njihove površinske plazmonske rezonancije (SPR), pojačanog rasipanja i apsorpcije svjetlosti. Nanočestice izrađene od zlata učinkovito pretvaraju jaku apsorbiranu svjetlost u lokaliziranu toplinu koja se može iskoristiti za selektivnu lasersku fototermalnu terapiju tumora (Prashant i Ivan, 2007).

Najčešći način primjene antikancerogenih lijekova na bazi nanomaterijala je intravenska injekcija. Ovaj pristup zaobilazi korak apsorpcije kroz crijevni epitel potreban nakon oralne primjene (Zhao i Castranova, 2011). Na mjestima tumora vaskularna barijera je poremećena, a to omogućava nanonosaičima da se akumuliraju u tkivu tumora, kako je prikazano na Slici 7 (Maeda i sur., 2013). Zbog slabe limfne funkcije, nanočestice se ne otklanjaju brzo već se nakupljaju u intersticiju tumora što je poznato kao učinak pojačane propusnosti i zadržavanja (EPR), a to je je osnova pasivnog ciljanja (Hobbs i sur., 1998).



Slika 7. Prikaz pasivnih i aktivnih strategija ciljanja lijeka

(Preuzeto i prilagođeno prema: Navya i Daima, 2016)

U pasivnom ciljanju, nanonosaiči prolaze kroz propusne zidove i akumuliraju se na mjestu tumora pojačanim učinkom propusnosti i zadržavanja (EPR). Aktivno ciljanje može se postići korištenjem specifičnih liganada koji se vežu za receptore na stanicama tumora (Navya i Daima, 2016).

1.6.2. Toksičnost nanočestica

Nanočestice ulaze u okoliš vodom, tlom i zrakom te ljudskim aktivnostima. Međutim, kod njihove primjene u pročišćavanju okoliša namjerno se odlažu projektirane nanočestice u tlo ili vodene sustave. Primjerice, prednosti magnetskih nanočestica kao što su njihova mala veličina, visoka reaktivnost i veliki kapacitet mogu postati potencijalni smrtonosni čimbenici izazivanjem toksičnih staničnih učinaka. Istraživanja su također pokazala da nanočestice mogu ući u organizme tijekom gutanja ili udisanja te se mogu translocirati unutar tijela u različite organe i tkiva gdje mogu djelovati toksično. Upotreba Ag nanočestica u brojnim proizvodima dovodi do njihovog ispuštanja u vodeni okoliš i postaju izvor otopljenog Ag i tako vrše toksične učinke na vodene organizme, uključujući bakterije, alge i ribu (Navarro i sur., 2008). Očekuje se da će se utjecaj nanočestica na okoliš još više povećati u budućnosti (Xia i sur., 2008).

1.6.3. Nanočestice resveratrola

U želji za povećanjem bioraspoloživosti *in vivo* resveratrola kao i poboljšanju njegove topljivosti u vodi, što su glavni nedostaci ovog prirodnog i netoksičnog polifenola, pozornost se usmjerila ka razvitku nanočestica. Time se nepromijenjenom zadržala struktura resveratrola, ali su se poboljšala njegova svojstva. Resveratrol se veže za liposome, ciklodekstrine, lipidne nanočestice, mezoporozne silikatne nanočestice ili metalne nanočestice te se tako bolje isporučuje meti, bolje akumulira, poboljšana mu je topljivost i bioraspoloživosti te samim time dolazi do pojačanih antioksidacijskih i antitumorskih učinaka u ovakvom terapijskom pristupu (Varvandier- Fasseur i Latruffe, 2019). Od poznatih nanoformulacija, osobito je jednostavna za primjenu forma nanokristala koju karakterizira veći kapacitet unosa učinkovite veličine čestica, mogućnost unosa na različite načine te smanjena pojavnost negativnih učinaka (Singh i sur., 2017). U ovom istraživanju korišteni su nanokristali resveratrola koji su nastali smanjivanjem slabo topljive tvari do nano veličina postupcima mljevenja ili visokotlačnog homogeniziranja, odnosno povećanjem površine takve čestice u odnosu na volumen kako bi se u konačnici uspješno povećala topljivost, kao i bioaktivna sposobnost resveratrola.

1.7. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je istražiti sinergistički učinak sustavne hipertermije i cisplatine te nanokristala resveratrola na inhibiciju brzorastućeg, solidnog Ehrlichovog ascitesnog tumora (EAT), preživljavanje obrađenih miševa, polarizaciju makrofaga te potencijalnu toksičnost cisplatine i hipertermije u jetri i bubregu kao i mogućnost smanjenja posljedica toksičnosti prouzročene cisplatinom i hipertermijom primjenom nanokristala resveratrola u jetri i bubregu.

2. MATRIJALI I METODE

2.1 MATERIJALI

2.1.1. Pokusne životinje

U istraživanju su se koristili visokosrodni miševi soja Swiss albino koji su uzgajani na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, starosti 2-3 mjeseca i težine 20-25 g. Miševi su se držali u kavezima i hranjeni su standardnom hranom za laboratorijske životinje (4RF 21 Mucedola S.R.L., Italija) uz stalnu dostupnost vode. Uvjeti u kojima su životinje držane uključivali su dnevni ritam od 12 sati svjetla i 12 sati mraka te temperaturu od 24 °C uz kontroliranu vlažnost zraka. Istraživanje se provodilo sukladno etičkim načelima Republike Hrvatske prema Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (Narodne Novine br. 19/1999; Zakon o zaštiti životinja te Narodne novine br. 102/17). Također se postupalo u skladu s Vodičem za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS Publ. (NIH) # 86-23, 1985).

Istraživanje je provedeno na ukupno 80 jedinki podijeljenih u 4 skupine po 20 životinja prema načinu obrade.

2.1.2. Tumorske stanice

Ehrlichov ascitesni tumor (EAT) jest spontani karcinom mliječne žlijezde koji se pojavljuje kod miševa. To je brzorastući, agresivni, zloćudni tumor izgrađen od stanica koje su različito diferencirane, osjetljive te izrazito heterogene. U ovom istraživanju ovakav tip tumora izazvan je kod miševa injiciranjem 1×10^6 stanica EAT subkutano (*sc*) u bedro miševa kako bi se formirao solidni tumor EAT.

2.1.3. Sustavna hipertermija

U ovom istraživanju sve četiri skupine životinja izlagane su sustavnoj hipertermiji. Sustavna hipertermija provedena je prema protokolu Duhani i sur. (2012) s malim promjenama u temperaturi i vremenu izlaganja. Životinjama je neposredno prije izlaganja sustavnoj hipertermiji primjenjena intraperitonealna hipertermija davanjem *ip* 0,5 mL

fiziološke otopine prethodno zagrijane u vodenoj kupelji pri 41°C. Intraperitonealna hipertermija provedena je neposredno poslije davanja cisplatine ili nanokristala resveratrola. Nakon primjene intraperitonealne hipertermije, životinje su izložene sustavnoj hipertermiji gdje su životinje stavljene u inkubator pri 41°C tijekom 15 minuta.

2.1.4. Kemijski spojevi

Cisplatina

U radu je korištena cisplatina proizvođača Pliva (Zagreb, Hrvatska) injicirana intraperitonealno (*ip*) u dozi od 2,5 mg/kg desetog i dvanaestog dana, te dozom od 5 mg/kg četrnaestog dana.

Nanokristali resveratrola

Resveratrol u obliku nanokristala pripremljen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju. U tu svrhu korištena je modificirana metoda prema Romero i sur. (2016) primjenjujući mljevenje u minijaturnom mjerilu (engl. *top-down approach*). Prvi korak u tom procesu bio je pripremiti 5%-tnu suspenziju resveratrola (w/w) proizvođača Evolva SA, Švicarska te 1%-tnu suspenziju stabilizatora Pluronic F127 (Sigma-Aldrich, SAD). Nadalje, suspenzija se podvrgnula mljevenju u minijaturnom mjerilu u okrugloj bočici čije su dimenzije 12 x 35 mm i koja sadrži pet cilindričnih magneta dimenzija 10 x 6 mm. Smjesa kuglica cirkonijevog oksida stabiliziranog itrijem različitih veličina (0,1 mm; 0,2 mm te 0,4 - 0,6 mm) pomiješanih u jednakim omjerima, korištena je kao medij pri mljevenju suspenzije. Sam postupak mljevenja provodio se na miješalici Magnetic stirrer MIX 15 eco, Berlin, Njemačka. Ovako pripremljena suspenzija nanokristala resveratrola davala se u dozi od 50 mg/kg per os (*po*).

2.1.5. Laboratorijska oprema

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

Homogenizator: Sonopuls mini (proizvođač: Bandelin, Njemačka)

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

2.2. METODE

2.2.1. Plan pokusa i obrada životinja

Pokusnim miševima izmjerena je tjelesna težina te su sukladno tjelesnoj težini podijeljeni u četiri skupine po 20 životinja. Nadalje, svim miševima je injicirano subkutano (*sc*) 1×10^6 EAT stanica što označava 0. dan pokusa. Drugog dana od injiciranja stanica tumora, započeta je obrada životinja davanjem nanokristala resveratrola u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu te kada je tumor postao vidljiv (otprilike 500 mm³, oko 10 dana) injicirana je cisplatina u dozi od 2,5 mg/kg (*ip*) 10. i 12. dana te dozom od 5 mg/kg 14. dana. Također, životinje su izložene sustavnoj hipertermiji kako je već opisano u poglavlju 2.1.3. Kontrolna skupina obrađena je *ip* s fiziološkom otopinom (F.O.) i izložena sustavnoj hipertermiji, a podjela ostalih skupina i način obrade prikazani su u Tablici 1. Doza 50 mg/kg odabrana je sukladno literaturi (Carter i sur., 2015; Kim i sur., 2017; Alobaedi i sur., 2017; Davatgaran-Taghipour i sur., 2017). Žrtvovanje životinja (N=10 po skupini) provelo se 24 h nakon zadnje obrade (15. dan) uz intraperitonealnu (*ip*) primjenu kombinacije Narketana® Vetoquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska (djelatna tvar Ketamin) i Xylapana® Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska (djelatna tvar Ksilazin) u dozi od 25 mg/kg nakon čega su prikupljeni organi jetre, bubrega i tumora za daljnje analize. Drugi dio životinja (N=10 po skupini) ostavljen je za praćenje veličine tumora i preživljavanja.

Tablica 1. Prikaz obrade životinja unutar pokusa

Miševi nositelji EAT u solidnom obliku (1x10⁶, sc)	
SKUPINA	TRETMAN
Kontrola	Primjena fiziološke otopine <i>ip</i> + izlaganje sustavnoj hipertermiji pri 41°C
Cisplatina + sustavna hipertermija	Primjena 2,5 mg/kg cisplatine 10. i 12. dana <i>ip</i> te 5 mg/kg 14. dana + izlaganje sustavnoj hipertermiji pri 41°C
Nanokristali resveratrola + sustavna hipertermija	Primjena 50 mg/kg nanokristala resveratrola <i>per os</i> + izlaganje sustavnoj hipertermiji pri 41°C
Cisplatina + nanokristali resveratrola + sustavna hipertermija	Primjena 2,5 mg/kg cisplatine 10. i 12. dana <i>ip</i> te 5 mg/kg 14. dana i 50 mg/kg nanokristala resveratrola <i>per os</i> + izlaganje sustavnoj hipertermiji pri 41°C

2.2.2. Praćenje promjene tjelesne mase

Prije početka pokusa i podjele životinja u skupine izmjerila sam tjelesnu masu svake pojedine životinje pomoću digitalne vage. Sukladno sličnim masama (± 3 g) miševe sam podijelila u skupine te izračunala dozu pojedinačnih pripravaka koje su date tijekom obrade životinja. Praćenje promjene mase životinja nastavila sam pratiti i bilježiti i tijekom izvođenja pokusa.

2.2.2.1. Procjena toksičnosti

Procjenu toksičnosti na nivou čitavog organizma pratila sam vaganjem životinja tijekom eksperimenta i praćenjem promjene mase. Pokazatelj toksičnosti je gubitak mase tijekom perioda eksperimenta. Gubitak tjelesne mase za svaku pojedinu životinju izračunala sam formulom:

$$\% \text{ gubitka mase} = \left(\frac{\text{masa prvog dana} - \text{minim. masa tijekom ispitivanja}}{\text{masa prvog dana}} \right) \times 100$$

2.2.2.2. Relativna masa organa

Relativnu masu organa izraženu u g/100g izračunala sam prema navedenoj formuli:

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

2.2.3. Praćenje promjene volumena i inhibicija rasta tumora

Praćenje rasta tumora mjerila sam pomoću kalipera, a volumen tumora izračunala sam formulom:

$$\text{Volumen tumora (mm}^3\text{)} = \frac{\text{širina tumora}^2 \times \text{dužina tumora}}{2}$$

Iz dobivenih podataka izračunala sam postotak inhibicije tumora (%TVI) prema sljedećoj formuli:

$$\%TVI = \frac{\text{sred. vrij. vol. tumora}_{(kontr.)} - \text{sred. vrij. vol. tumora}_{(tret. grupa)} \times 100}{\text{sred. vrij. vol. tumora}_{(kontr.)}}$$

2.2.4. Preživljavanje

Preživljavanje pokusnih životinja pratila sam praćenjem spontane smrti nakon obrade miševa. Bilježila sam dan i broj uginulih jedinki unutar svake tretirane skupine od nultog dana pokusa. Iz dobivenih podataka izračunala sam postotak povećanja životnog vijeka. Povećanje životnog vijeka (% ILS, engl. *increased lifespan*) izračunala sam prema formuli:

$$\%ILS = \frac{(T - C)}{C} * 100$$

gdje je T srednja vrijednost vremena preživljavanja obrađene skupine životinja, a C srednja vrijednost vremena preživljavanja kontrolne skupine životinja.

2.2.5. Mjerenje parametara oksidacijskog stresa

2.2.5.1. Izolacija i priprema tkiva

Tkiva jetre, bubrega i tumora nakon izolacije pohranjena su u zamrzivač na -80°C do ponovne upotrebe. Uzorke sam pripremila na način da sam odvagala 75 – 100 mg tkiva te

dodala PBS pufer u omjeru 1:10. Zatim sam tkiva homogenizirala pomoću ultrazvučnog homogenizatora, a dobivene homogenate centrifugirala 15 minuta pri 4°C na 15000 okretaja. Poslije centrifugiranja odvojila sam nadtalog te sam dobivene uzorke pohranila na -80°C do daljnjih analiza.

2.2.5.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-ju

Koncentraciju proteina određivala sam metodom po Lowry-ju koja se bazira na činjenici da u lužnatim uvjetima divalentni ion bakra tvori kompleks s peptidnim vezama. Uzorke jetre sam za ovu metodu razrijedila 40x, a bubrega i tumora 10x. U epruvetu sam dodala 100 µL uzorka i 2 mL otopine D (Tablica 2.). Nakon inkubacije od 10 minuta dodala sam 200 µL otopine E (Tablica 2). Uzorke sam pomiješala na vorteksu i stavila na inkubaciju 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije mjerila sam apsorbanciju na spektrofotometru pri valnoj duljini od 600 nm.

Tablica 2. Priprema otopina za mjerenje koncentracije proteina metodom po Lowry-ju

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

Albumin goveđeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*, BSA) koristila sam kao standard u ovoj metodi (Tablica 3) gdje sam 20 mg BSA otopila u 10 mL dH₂O (2 mg/mL). Napravila sam serijska razrjeđenja otopine proteina poznate koncentracije (20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 i 0 mg/mL).

Tablica 3. Priprema albumina goveđeg seruma kao standarda za mjerenje proteina po Lowryju

BSA	STOCK OTOPINA
20	1000 μ L BSA (2 mg/mL)
10	500 μ L 20 BSA + 500 μ L dH ₂ O
5	500 μ L 10 BSA + 500 μ L dH ₂ O
2,5	500 μ L 5 BSA + 500 μ L dH ₂ O
1,25	500 μ L 2,5 BSA + 500 μ L dH ₂ O
0,625	500 μ L 1,25 BSA + 500 μ L dH ₂ O
0,312	500 μ L 0,625 BSA + 500 μ L dH ₂ O
0,156	500 μ L 0,312 BSA + 500 μ L dH ₂ O
0	1 mL dH ₂ O

Iz dobivene standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA odredila sam nagib pravca. Preko nagiba pravca izračunala sam koncentraciju proteina (mg proteina/mL) prema sljedećoj formuli:

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

2.2.5.3. Mjerenje razine lipidne peroksidacije

Mjerenje razine lipidne peroksidacije odredila sam prema modificiranoj metodi koju su opisali Jayakumar i sur. (2007). Metoda se bazira na mjerenju koncentracije jednog od glavnih produkata lipidne peroksidacije - monodialdehida (MDA). Metoda koja se najčešće koristi za određivanje koncentracije MDA u biološkom uzorku je derivatizacija MDA s 2-tiobarbituratnom kiselinom (TBA) pri čemu MDA reagira s dva ekvivalenta TBA i dolazi do nastanka MDA-(TBA)₂ kompleksa. Ova reakcija odvija se u kiselim uvjetima i pri visokoj temperaturi pri čemu nastaje fluorescentni MDA-(TBA)₂ kompleks crvene boje čija se koncentracija mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 532 nm.

U ovoj metodi koristila sam homogenate tkiva bubrega, jetre i tumora. U Eppendorf epruvetu stavila sam 100 μ L uzorka i 1,6 mL prethodno pripremljenog reagensa A (Tablica 4). Uzorke u epruveti stavila sam na stalak, omotala aluminijskom folijom te inkubirala u vodenoj kupelji tijekom sat vremena pri temperaturi od 95°C. Nakon toga uzorke sam naglo ohladila na ledu i centrifugirala 5 minuta pri 4°C na 15000 okretaja. Folikule koje su nastale

miješanjem uzoraka s reagensom A ostale su na dnu, a supernatant sam izdvojila u kivetu za mjerenje apsorbancije na spektrofotometru pri valnoj duljini od 532 nm.

Tablica 4. Priprema otopina za određivanje koncentracije MDA

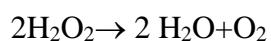
Otopina	Priprema
8,1% SDS	0,81 g SDS-a + 10 mL dH ₂ O
20% octena kiselina	20 mL 99,5% octene kiseline + 2,31 mL HCl, nadopuni se do 50 mL dH ₂ O i podesi pH na 3,5 te nadopuni s dH ₂ O do 100 mL
0,8% TBA	0,8 g TBA + 40 mL dH ₂ O uz lagano zagrijavanje; nakon što se otopi dodaje se 500 μL 5M NaOH te se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

Ukupnu koncentraciju MDA izrazila sam kao nmol MDA po mg proteina, a izračunala sam je pomoću ekstincijskog koeficijenta za MDA ($\epsilon = 1,56 \times 10^5/\text{M}$) prema formuli:

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

2.2.5.4. Mjerenje aktivnosti katalaze

Spektrofotometrijskom metodom pratila sam enzimsku aktivnost katalaze metodom po Aebiju (1984). Ona se određuje se kao količina potrošenog vodikovog peroksida tijekom jedne minute.



Za utvrđivanje aktivnosti katalaze koristila sam uzorke bubrega razrijeđene 10x, uzorke jetre razrijeđene 100x te nerazrijeđene uzorke tumora U kivetu sam dodala 20 μL uzorka i 980 μL 10mM H₂O₂ (113 μL 30% H₂O₂ + 99,887 mL PBS). Aktivnost katalaze mjerila sam spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 240 nm u trajanju od jedne minute te izračunala prema formuli:

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

pri čemu ekstinkcijski koeficijent H_2O_2 (ε) iznosi 39,4 m/M cm, a broj 1 predstavlja put koji zraka svjetlosti prođe pri prolasku kroz kivetu (1 cm). Kao rezultat dobivenu koncentraciju izrazila sam kao U/mg proteina što je jednako μ molu razgrađenog H_2O_2 po minuti po miligramu proteina.

2.2.5.5. Određivanje koncentracije ukupnog glutaciona

Određivanje koncentracije ukupnog glutaciona u uzorcima bubrega, jetre i tumora radila sam korištenjem modificirane metode prema Tietzu (1969). Metoda se zasniva na reakciji sulfhidrilne grupe GSH s tiolnim reagensom 5,5- ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DNTB, Ellmanov reagens) čime nastaje kromofor žute boje (5-tionitrobenzojeva kiselina, TNB) te se pri valnoj duljini od 415 nm mjeri porast apsorbancije. Uz nastali TNB također nastaje i miješani disulfid, GS-TNB, a njegovom daljnjom redukcijom pomoću GSH reduktaze i NADPH nastaje TNB i reciklira se GSH. Brzina kojom nastaje TNB proporcionalna je reciklirajućoj reakciji, a ona je proporcionalna koncentraciji GSH sadržanoj u analiziranim uzorcima. Sav oksidirani GSH, tj. disulfid GSSG, brzo se reducira do GSH te se u konačnici rezultat ukupne koncentracije GSH u uzorku odnosi i na oksidirani i na reducirani GSH. Ovu metodu provela sam u mikrotitarskoj pločici. Razrjeđenja uzoraka bila su 40x za uzorke jetre, a za uzorke bubrega i tumora 10x. U svaku jažicu dodala sam 20 μ L uzorka, 40 μ L 0,035M HCl i 40 μ L 10 mM DTNB (Tablica 4). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi, tijekom 10 minuta, izmjerila sam apsorbanciju pri valnoj duljini od 415 nm. Nakon isteka inkubacije dodala sam 100 μ L reakcijske smjese B te izmjerila apsorbanciju tijekom 5 minuta.

Tablica 5. Priprema otopina za određivanje koncentracije ukupnog glutationa

Otopine	Priprema
0,035M HCl	7 mL 0,1M HCl + 193 mL dH ₂ O
0,5M (50 mM) pufer PBS	17 mL 1M Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (3 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O do 17 mL dH ₂ O) + 183 mL 1M Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O (65,5 g Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O do 183 mL dH ₂ O)
0,5M EDTA	37,2 g EDTA u 200 mL dH ₂ O
0,5M pufer PBS s 0,5M EDTA	200 mL 0,5M PBS + 200 mL 0,5M EDTA
Reakcijska smjesa A	20 mg DTNB + do 5 mL 0,5M pufer PBS s 0,5M EDTA
Reakcijska smjesa B	9980 μL 0,8mM NADPH* + 20 μL glutation reduktaze * 0,8mM NADPH (6,67 mg NADPH + 10 mL 0,5M pufer PBS s 0,5M EDTA)

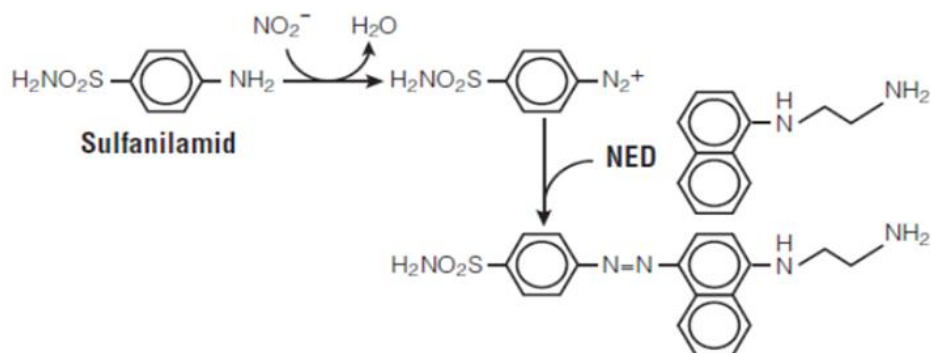
Za standarde nacrtala sam pravce kao promjenu apsorbancije u vremenu, očitala njihove nagibe te nacrtala pravac kao ovisnost nagiba pravca o koncentraciji GSH. Dobiveni pravac koristila sam za izračun koncentracije ukupnog GSH (μM GSH po mL proteina) prema zadanoj formuli:

$$c = \frac{\text{nagib pravca} - \text{nagib pravca}_{(\text{slijepa proba})}}{\text{nagib pravca}_{(\text{standard})}} \times \text{razrjeđenje}$$

2.2.6. Mjerenje dušikovog oksida metodom po Griessu

Griess je 1879. opisao metodu koja je utemeljena na kemijskoj reakciji u kojoj sudjeluju sulfanilamid i N-1-naptiletilendiamin dihidroklorid (NED) u kiselim uvjetima koje osigurava fosforna kiselina (Slika 8). Za mjerenje dušikovog oksida korišten je *Griess reagent system* kit proizvođača Promega (SAD). Sulfanilamid i NED natječu se za nitrit te je

osjetljivost metode bolja ukoliko se ove dvije komponente dodaju u jednakim volumenima. Na ovakav način detektira se NO_2^- u različitim eksperimentalnim uzorcima, a razina detekcije nitrita iznosi $2,5 \mu\text{M}$.



Slika 8. Reakcija sulfanilamida i NED-a u kiselim uvjetima (Preuzeto sa: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/griess-reagent-system-protocol.pdf?la=en>)

U prvom koraku ove metode napravila sam standardnu krivulju gdje se nitrit koristio kao standard razrijeđen u istom puferu koji se koristio i kod eksperimentalnih uzoraka. Standardnu krivulju napravila sam u mikrotitrarskoj pločici u stupcima 11 i 12 u redovima od A do H, a zatim sam napravila seriju dvostrukih razrjeđenja u duplikatima. Standardna nitritna krivulja sastojala od koncentracija 100; 50; 25, 12,5; 6,25; 3,13 i $1,56 \mu\text{M}$. Posljednja jažica u stupcima 11 i 12, a redu H je služila mi je kao slijepa proba. Ukupan volumen u svakoj jažici bio je $50 \mu\text{L}$, a nitritna koncentracija varirala je u rasponu 0-100 μM .

Nakon pripreme standarda, dodala sam $50 \mu\text{L}$ uzorka u duplikatu, a onda sam dodala $50 \mu\text{L}$ sulfanilamidne otopine u sve jažice te provela inkubaciju na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta. Poslije inkubacije od 10 minuta, gdje sam uzorke zaštitila od svjetla, dodala sam $50 \mu\text{L}$ NED otopine u sve jažice. Ponovno sam provela inkubaciju od 10 minuta nakon čega se pojavilo ružičasto obojenje. U zadnjem koraku ove metode izmjerila sam apsorbanciju pri valnoj duljini od 540 nm. Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji nitrita odredila sam nagib pravca, a preko nagiba pravca izračunala sam koncentracija NO_2^- u uzorcima koju sam izrazila u μM .

2.2.7. Mjerenje aktivnosti arginaze I

Za mjerenje aktivnosti arginaze I koristila sam ELISA kit (Sigma- Aldrich, SAD). Koristila sam homogenate tkiva bubrega razrijeđene 10x. Mjerenje aktivnosti arginaze zasniva se na konverziji L-arginina do uree i ornitina. Dalje urea reagira specifično sa supstratom pri čemu nastaje obojenje proporcionalno aktivnosti arginaze. Količina enzima koja je dovoljna za pretvorbu 1 μ M L-arginina do uree i ornitina pri pH 9,5 i temperaturi 37°C odgovara jednoj jedinici arginaze. Standard za ovu metodu pripremila sam dodatkom 24 μ L urea standarda (50 mg/dL) i 176 μ L dH₂O te na takav način dobila 1mM standardnu radnu otopinu uree. U duplikatima sam u mikrotitarsku pločicu dodavala 40 μ L uzorka u jažice u duplikatima u kojima sam mjerila uzorak i slijepu probu. Isti volumen dodala sam u jažice za standardnu radnu otopinu uree i dH₂O. Zatim sam u sve uzorke, osim uzoraka slijepih proba, dodala 5x razrijeđeni supstratni pufer koji sam dobila miješanjem 8 μ L arginin pufera i 2 μ L otopine Mn. Nakon inkubacije od 2 sata pri 37°C dodala sam 200 μ L prethodno pripremljenog urea reagensa (100 μ L reagens A + 100 μ L reagens B, sadržanih u kitu) u svaku jažicu uključujući i slijepu probu. Nakon dodatka urea reagensa u uzorke slijepa probe dodala sam još 10 μ L 5x razrijeđenog supstratnog pufera kako bi se nadopunio volumen do 50 μ L. Nakon inkubacije od sat vremena pri sobnoj temperaturi izmjerila sam apsorbanciju pri 430 nm na Ao Absorbance Microplate Reader uređaju (proizvođač: Azure Biosystems, SAD). U konačnici, aktivnost arginaze izračunala sam prema formuli:

$$\text{Aktivnost arginaze} = \left(\frac{A_{(\text{uzorka})} - A_{(\text{slijepa proba})}}{A_{(\text{standard})} - A_{(\text{dH}_2\text{O})}} \right) \times \left(\frac{1 \text{ mM} \times 50 \times 10^3}{V \times T} \right)$$

gdje T predstavlja reakcijsko vrijeme u minutama, V volumen uzorka u jažici (μ L), koncentracija standarda uree je 1mM, reakcijski volumen je 50 (μ L), a 10³ odnosi se na konverzijski faktor pretvorbe mM u μ M. Aktivnost arginaze iskazala sam u jedinici/L.

2.2.8. Statistička obrada podataka

Pomoću STATISTICA 13 programa (StatSoft, Tulsa, OK, USA) provedena je statistička analiza podataka pri čemu statistička točnost iznosi $P < 0,05$. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška (SV \pm SP), a podaci su analizirani koristeći Kruskal-Wallis ANOVA test. Također je napravljena i višestruka usporedba srednjih vrijednosti svih skupina kako bi se analizirale razlike između skupina. Krivulja preživljavanja

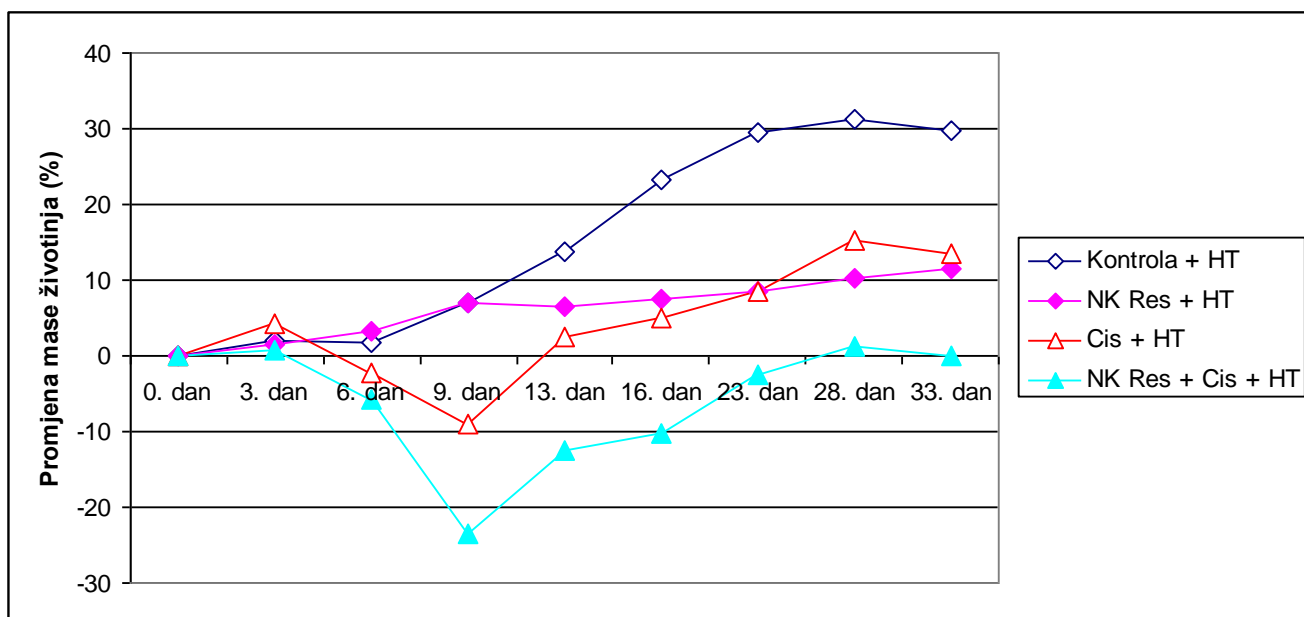
napravljena je prema Kaplan-Meierovoj metodi (Kaplan i Meier, 1958), a usporedba između krivulja preživljavanja određena je log-rank testom ($\alpha = 5\%$) (Mantel i Haenszel, 1959). Dobiveni rezultati prikazani su u obliku grafova i tablica pomoću box-plot prikaza, a za pripremu podataka te izračun koncentracija korišten je Microsoft Excel 2016 računalni program.

3. REZULTATI

3.1. PROMJENA TJELESNE MASE

3.1.1. Procjena toksičnosti

Procjena toksičnosti predstavlja gubitak tjelesne mase životinja tijekom perioda obrade miševa. Ona daje uvid u brzinu rasta mase tumora kod pojedine skupine, pri čemu je rast tumora izračunat kao postotak u odnosu na početnu masu tumora unutar skupine. Rezultati prikazani na Slici 8 prikazuju linearni porast u masi životinja kontrolne skupine, koji je osobito izražen od 6. do 25. dana trajanja eksperimenta. Skupina obrađena nanokristalima resveratrola uz izlaganje hipertermiji pokazuje kontinuirani, ali blagi (do 10%) porast u tjelesnoj masi do kraja trajanja eksperimenta. S druge strane, kod skupine obrađene cisplatinom uz izlaganje hipertermiji od 5. do 10. dana dolazi do gubitka tjelesne mase, a onda od 10. do 29. dana dolazi do njenog povećanja. Skupina obrađena nanokristalima resveratrola i cisplatinom uz sustavnu hipertermiju bilježi najveći gubitak tjelesne mase i to od 3. do 10. dana gdje kasnije dolazi do blagog povećanja 28. dana koje je, sveukupno gledajući, najmanje u usporedbi s ostalim skupinama. Sve obrađene skupine od 10. dana bilježe porast tjelesne mase, no vrijednosti tjelesne mase i dalje su ostale ispod najviše postignute vrijednosti kontrolne skupine.



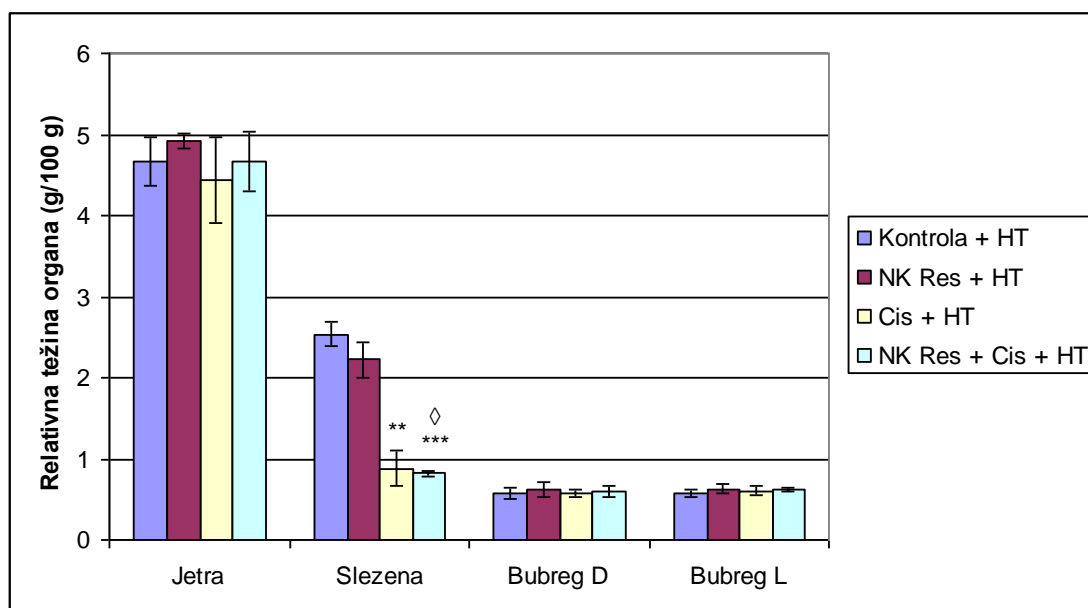
Slika 8. Promjena tjelesne mase miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg *per os* (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatina injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Gubitak mase (%) izračunat je prema formuli: $(\text{masa prvog dana} - \text{masa tijekom ispitivanja}) / \text{masa prvog dana} \times 100$.

Kratice: HT- hipertermija; NK Res- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatina u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.1.2. Promjena mase organa

Rezultati promjene mase jetre i bubrega ne pokazuju statistički značajnu razliku između obrađenih skupina (Slika 9), dok rezultati mase slezene pokazuju statistički značajnu razliku. Skupine obrađene cisplatinom i hipertermijom ($P \leq 0,01$) te nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom ($P \leq 0,001$) pokazuju statistički značajno smanjenje mase slezene u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom (Slika 9). Također, postoji statistički značajno smanjenje mase slezene u skupini obrađenoj nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom u odnosu na skupinu obrađenu nanokristalima resveratrola i hipertermijom ($P \leq 0,05$).



Slika 9. Promjena relativne težine organa (jetra, slezena, lijevi i desni bubreg) u miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

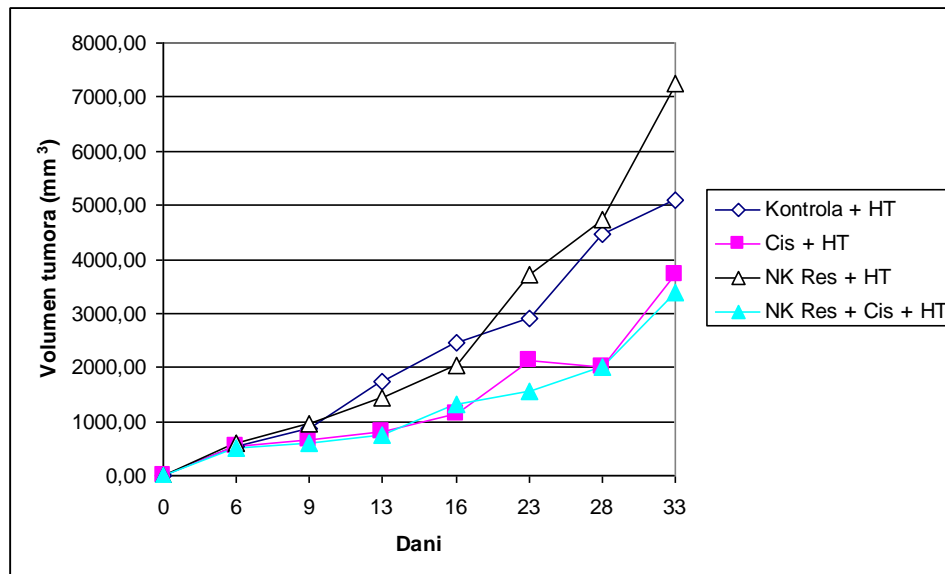
Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatin injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Relativna masa organa (g/100 g) izračunata je prema formuli: ukupna masa organa x 100/konačna tjelesna masa.

*Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$); \diamond Statistički značajno u odnosu na NK Res + HT ($\diamond P \leq 0,05$)

Kratice: HT- hipertermija; NK Res- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatin u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.2. PROMJENA VOLUMENA TUMORA

Mjerenja volumena tumora prikazani su na Slici 10. Rezultati pokazuju nagli porast volumena tumora kod svih skupina 13. dana od početka pokusa, ali ukazuju i na to da je volumen tumora bio smanjen kod svih obrađenih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom. Najveće smanjenje zabilježeno je kod skupine obrađene nanokristalima resveratrola i cisplatinom uz izlaganje hipertermiji.



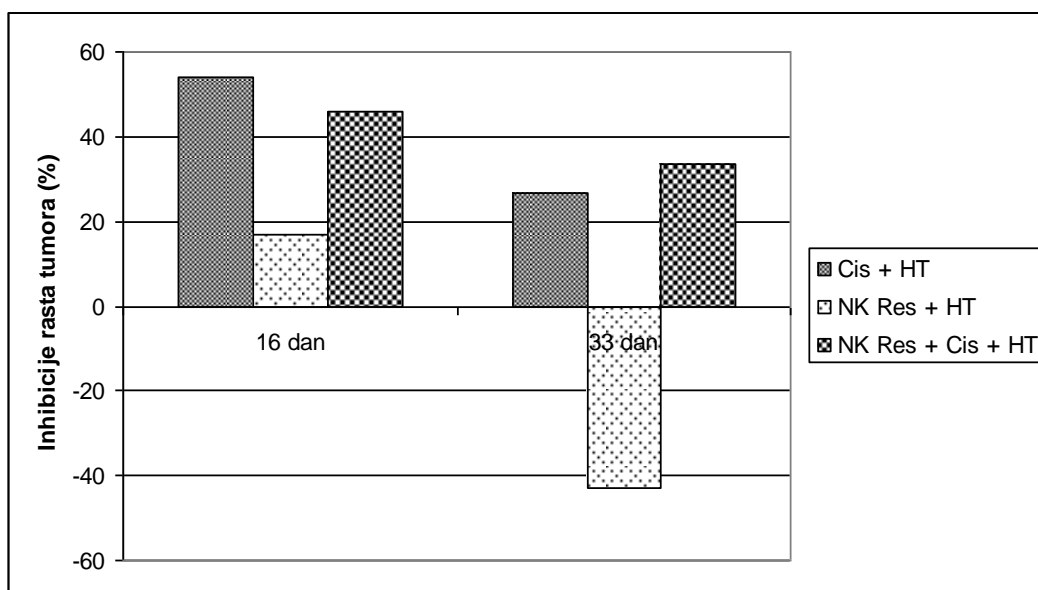
Slika 10. Promjena ukupnog volumena tumora u miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatin injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Ukupni volumen tumora dobiven je mjerenjem volumena tumora kaliperom prema formuli: $\text{Volumen tumora} = (\text{širina tumora}^2 \times \text{dužina tumora})/2$.

Kratice: HT- hipertermija; NK Res- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatin u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.3. INHIBICIJA RASTA TUMORA

Inhibicija rasta tumora veća je u svim obrađenim skupinama 16. dana u usporedbi s 33. danom u odnosu na kontrolu. Najveća inhibicija rasta tumora zabilježena je u skupini obrađenoj cisplatinom i hipertermijom 16. dana i ona je iznosila preko 50%, a nešto je manja kod skupine obrađene nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom i ona je iznosila oko 45%. Najmanja inhibicija zabilježena je 16. dana u skupini obrađenoj nanokristalima resveratrola i hipertermijom te je ona nešto manja od 20%. Najveću inhibiciju rasta 33. dana bilježi skupina obrađena nokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom (35%), nešto manju skupina obrađena cisplatinom i hipertermijom (25%), dok obrada s nanokristalima resveratrola i hipertermijom 33. dana vodi povećanom rastu tumora u odnosu na kontrolu (preko -40%) (Slika 11).



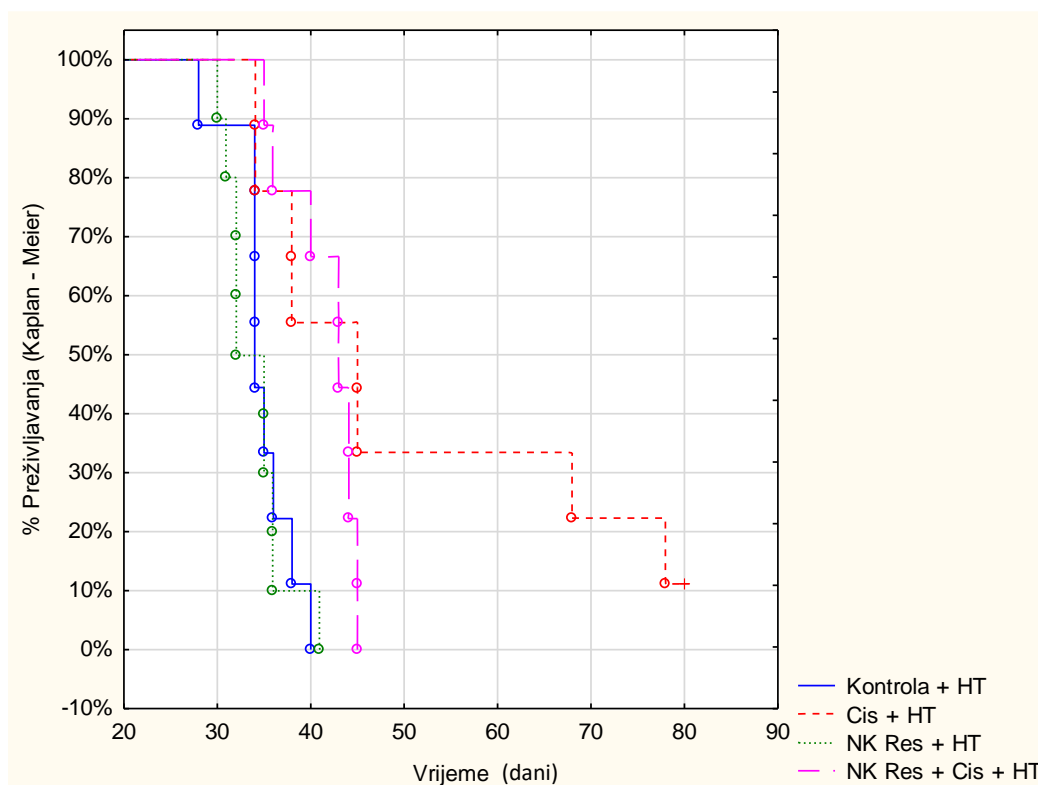
Slika 11. Postotak inhibicije rasta tumora u miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg *per os* (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatin injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Iz dobivenih vrijednosti volumena tumora izračunat je postotak inhibicije rasta (% TVI) prema formuli: $\text{sred.vrijed.vol.tumora (kontr.)} - \text{sred. vrijed. vol. tumora (tret.grupa)} \times 100 / \text{sred. vrijed. vol.tumora (kontr.)}$.

Kratice: **HT**- hipertermija; **NK Res**- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; **Cis**- cisplatin u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.4. PREŽIVLJAVANJE

Učinak cisplatine u dozama 2,5 mg/kg 10. i 12. dana i 5 mg/kg 14. dana te nanokristala resveratrola u dozi 50 mg/kg, tijekom 5 dana s početkom 2 dana od injiciranja tumora, te njihove kombinacije uz hipertermalne uvjete (41°C) na miševe nositelje EAT-a istražio se praćenjem vremenskog perioda preživljavanja životinja što je prikazano na Slici 12 i u Tablici 6. Skupina obrađena cisplatinom i hipertermijom pokazuje najbolje rezultate u pogledu povećanja životnog vijeka (% ILS) i iznosi 46,99%, dok je najmanje povećanje životnog vijeka prisutno u skupini obrađenoj nanokristalima resveratrola uz izlaganje sustavnoj hipertermiji i iznosi -2,22% (Slika 12, Tablica 6). Kod skupine obrađene nanokristalima resveratrola i cisplatinom uz izlaganje hipertermiji vidljivo je nešto manje povećanje životnog vijeka i iznosilo je 19,81%.



Slika 12. Kaplan-Meier krivulja preživljavanja miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

Tablica 6. Preživljenje miševa s Ehrlichovim solidnim tumorom nakon obrade s nanokristalima resveratrolom i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

Skupina ^a	Raspon preživljavanja (dani)	Srednja vrijednost preživljavanja (SV±SP dani)	Median preživljavanja (dani)	% T/C ^b	% ILS ^c	Broj preživjelih životinja
Kontrola + HT	28 - 40	34,77 ± 1,10	34,00	/	/	0
NK Res + HT	30 - 41	34,00 ± 1,03	33,50	97,78	-2,22	0
Cis + HT	34 - 80	51,11 ± 6,28	45,00	146,99	46,99	0
NK Res + Cis + HT	30 - 49	41,66 ± 1,27	43,00	119,81	19,81	0

^aMiševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatin injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C.

^b $\% \frac{T}{C} = \left(\frac{T}{C} \right) \times 100 \%$; T - srednja vrijednost vremena preživljavanja obrađene skupine životinja; C - srednja vrijednost vremena preživljavanja kontrolne skupine životinja.

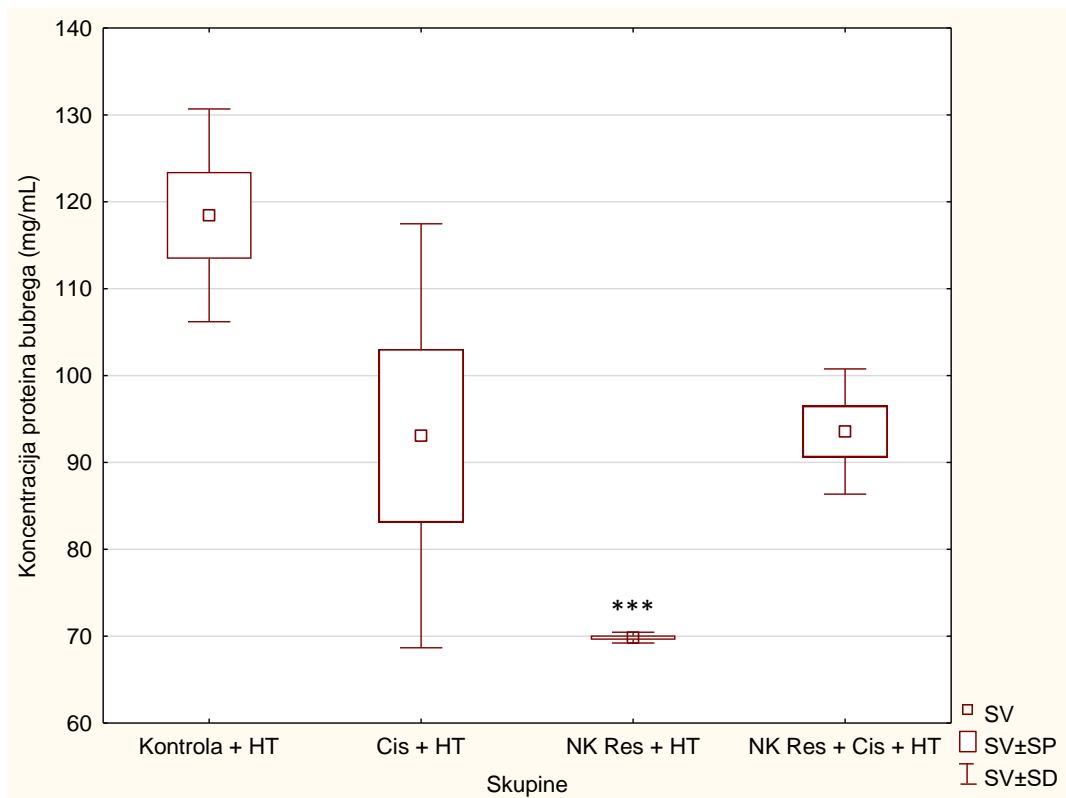
^c $\% ILS = \left(\frac{T-C}{C} \right) \times 100 \%$; postotak povećanja životnog vijeka (% ILS); T - srednja vrijednost vremena preživljavanja obrađene skupine životinja; C - srednja vrijednost vremena preživljavanja kontrolne skupine životinja.

Kratice: HT- hipertermija; NK Res- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatin u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.5. PARAMETRI OKSIDACIJSKOG STRESA

3.5.1. Ukupna koncentracija proteina u uzorcima tkiva bubrega miševa

Rezultati mjerenja ukupne koncentracije proteina u uzorcima tkiva bubrega prikazani su na Slici 13. Iz rezultata se vidi statistički značajno smanjenje koncentracije proteina kod skupine obrađene s nanokristalima resveratrola uz izlaganje hipertermiji u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ($P \leq 0,001$).



Slika 13. Koncentracija ukupnih proteina u tkivu bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

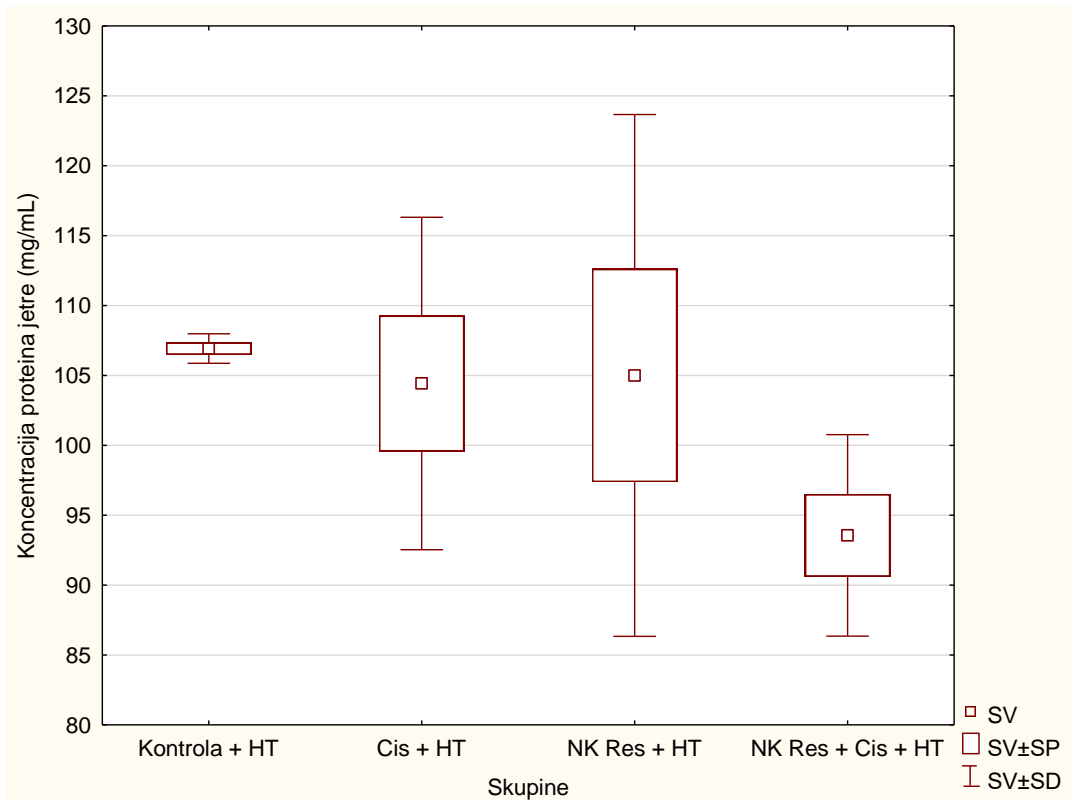
*Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (** $P \leq 0,001$).

Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatin injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: HT- hipertermija; NK Res- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatin u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.5.2. Ukupna koncentracija proteina u uzorcima tkiva jetre miševa

Rezultati mjerenja ukupne koncentracije proteina u uzorcima tkiva jetre, prikazani na Slici 14, pokazuju da nema statističke značajnosti u ukupnoj koncentraciji proteina između obrađenih skupina.



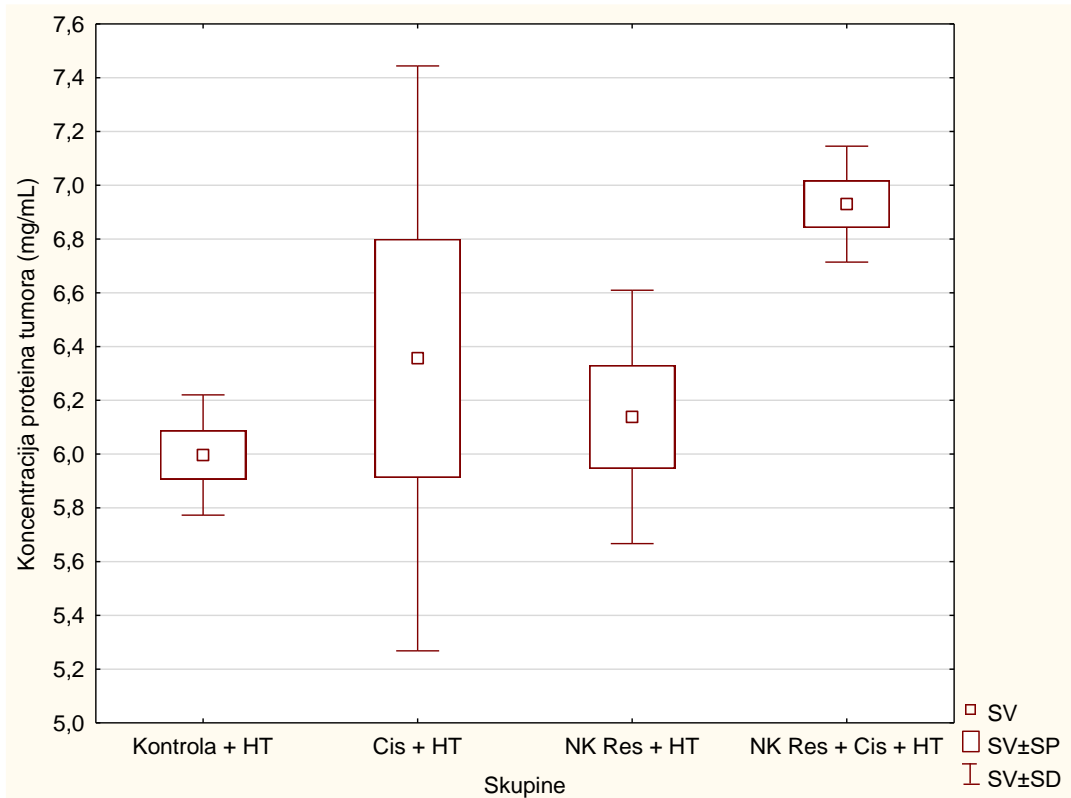
Slika 14. Koncentracija ukupnih proteina u tkivu jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatin injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Kratice: HT- hipertermija; NK Res- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatin u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.5.3. Ukupna koncentracija proteina u uzorcima tkiva tumora miševa

Rezultati mjerenja ukupne koncentracije proteina u uzorcima tkiva tumora, prikazani na Slici 15, pokazuju da nema statističke značajnosti u ukupnoj koncentraciji proteina između obrađenih skupina.



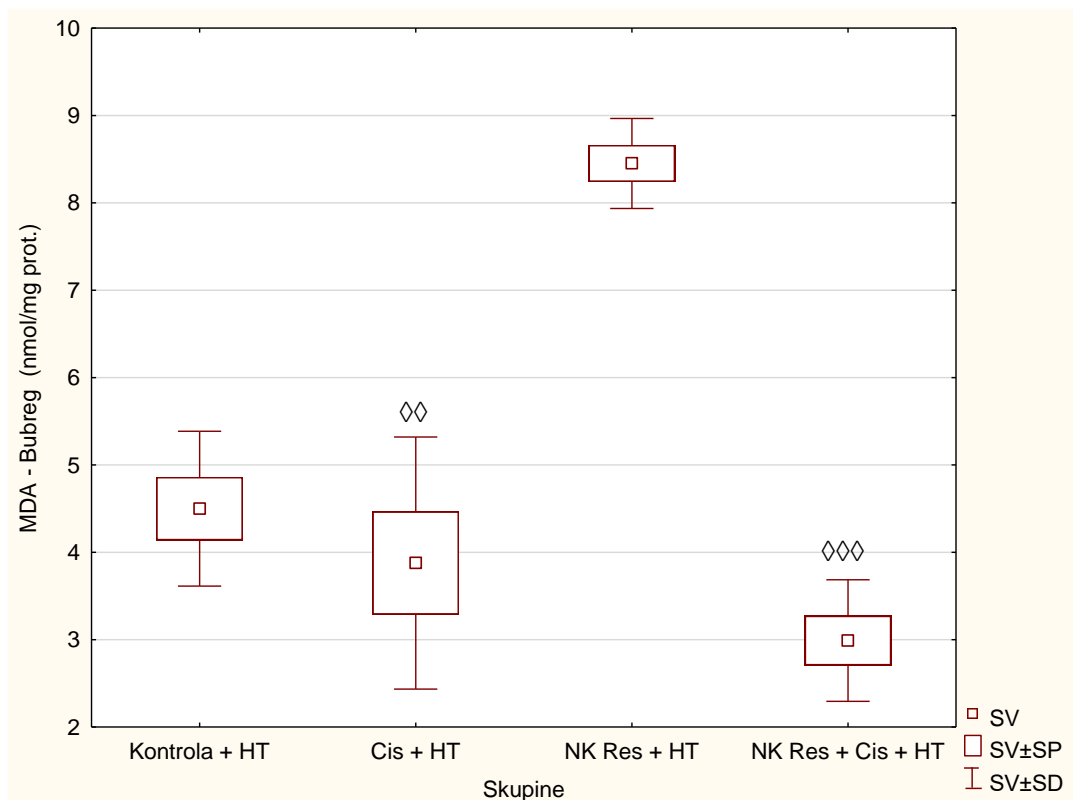
Slika 15. Koncentracija ukupnih proteina u tkivu tumora miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatin injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Dobiveni rezultati prikazani su kao $SV \pm SD$ (SP).

Kratice: HT- hipertermija; NK Res- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatin u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.5.4. Razina lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima tkiva bubrega miševa

Rezultati mjerenja koncentracije MDA u uzorcima tkiva bubrega prikazani su na Slici 16. Rezultati ukazuju na statistički značajno niže vrijednosti MDA u skupinama obrađenim cisplatinom i hipertermijom ($P \leq 0,01$) te nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom ($P \leq 0,001$) u odnosu na skupinu obrađenu nanokristalima resveratrola uz izlaganje hipertermiji.



Slika 16. Koncentracija MDA u tkivu bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

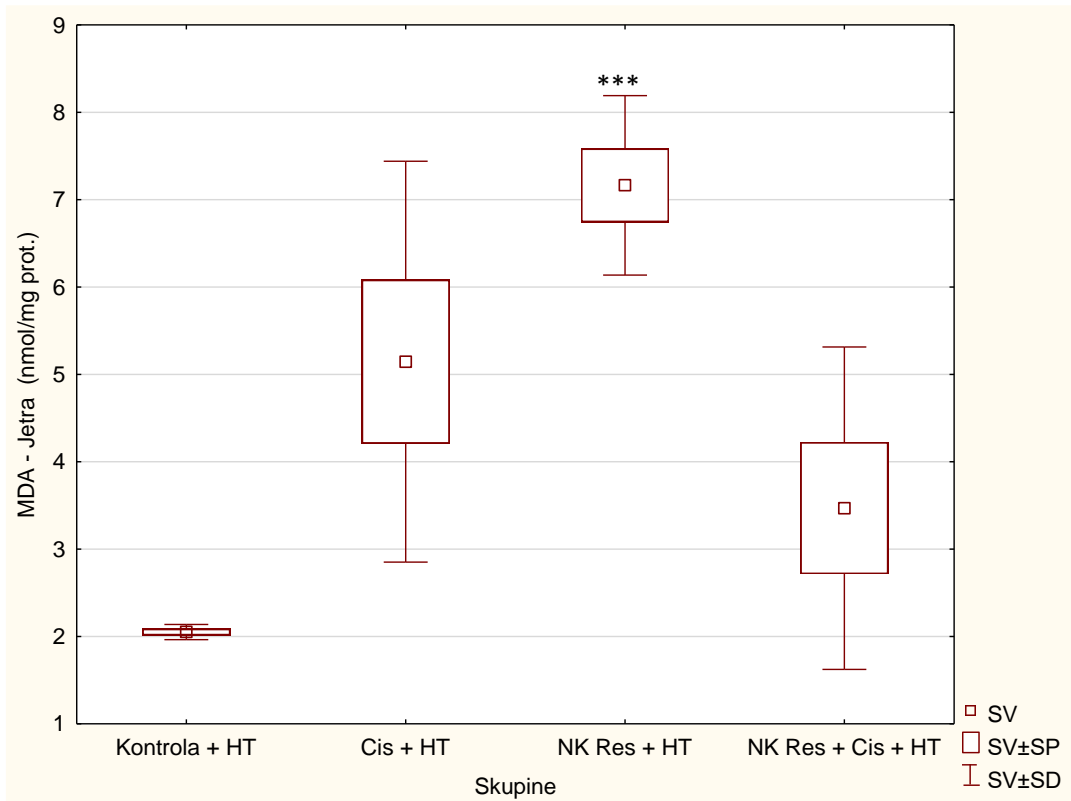
◊Statistički značajno u odnosu na NK Res + HT (◊◊ $P \leq 0,01$; ◊◊◊ $P \leq 0,001$).

Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatina injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: HT- hipertermija; NK Res- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatina u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.5.5. Razina lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima tkiva jetre miševa

Rezultati mjerenja koncentracije MDA u uzorcima tkiva jetre prikazani su na Slici 17. Iz rezultata je vidljivo statistički značajno povećanje vrijednosti MDA u skupini obrađenoj nanokristalima resveratrola i hipertermijom u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ($P \leq 0,001$).



Slika 17. Koncentracija MDA u tkivu jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

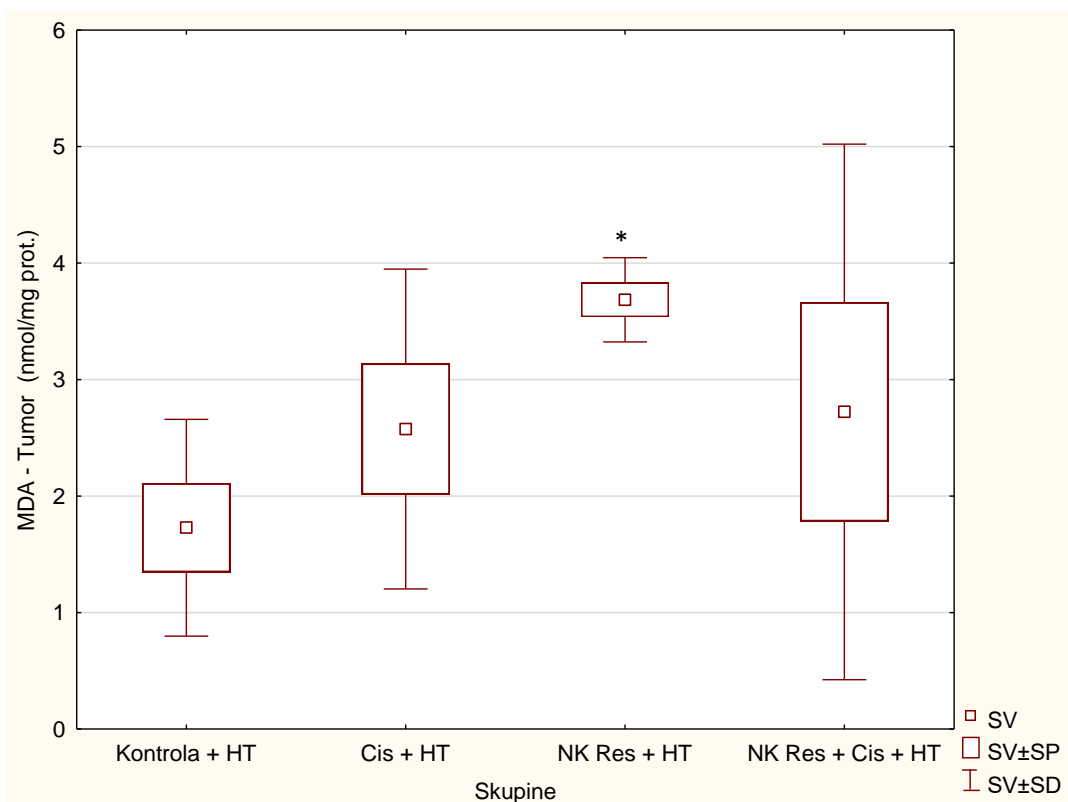
*Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (***) $P \leq 0,001$.

Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatin injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: HT- hipertermija; NK Res- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatin u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.5.6. Razina lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima tkiva tumora miševa

Na Slici 18 prikazani su rezultati mjerenja koncentracije MDA u uzorcima tkiva tumora. Rezultati ukazuju na statistički značajno povećanje vrijednosti MDA u skupini obrađenoj nanokristalima resveratrola i hipertermijom u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ($P \leq 0,05$).



Slika 18. Koncentracija MDA u tkivu tumora miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

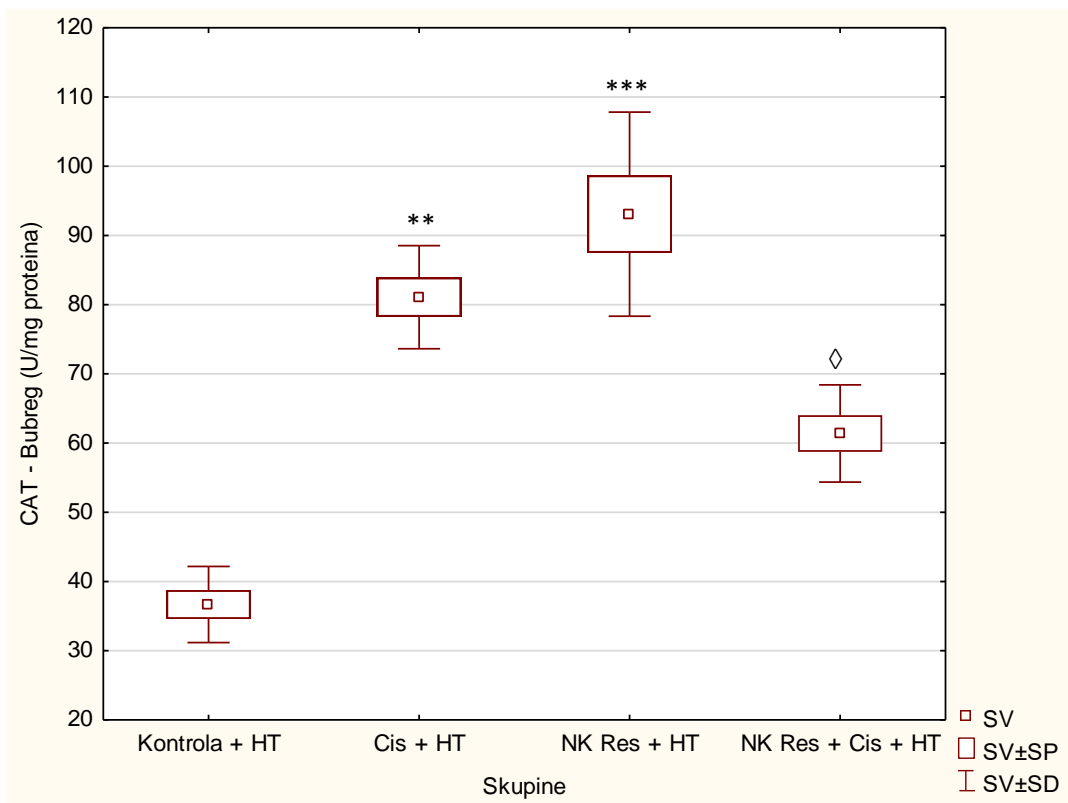
*Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ($P \leq 0,05$).

Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatina injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: **HT**- hipertermija; **NK Res**- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; **Cis**- cisplatina u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.5.7. Enzimska aktivnost katalaze u uzorcima tkiva bubrega miševa

Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti katalaze u uzorcima tkiva bubrega (Slika 19) ukazuju na statistički značajno povećanje aktivnosti katalaze u skupinama obrađenima cisplatinom i hipertermijom ($P \leq 0,01$) te nanokristalima resveratrola i hipertermijom ($P \leq 0,001$) u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom. Statistički značajno smanjenje aktivnosti katalaze vidljivo je u skupini obrađenoj nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom u odnosu na skupinu obrađenu nanokristalima resveratrola i hipertermijom ($P \leq 0,05$).



Slika 19. Aktivnost katalaze u tkivu bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

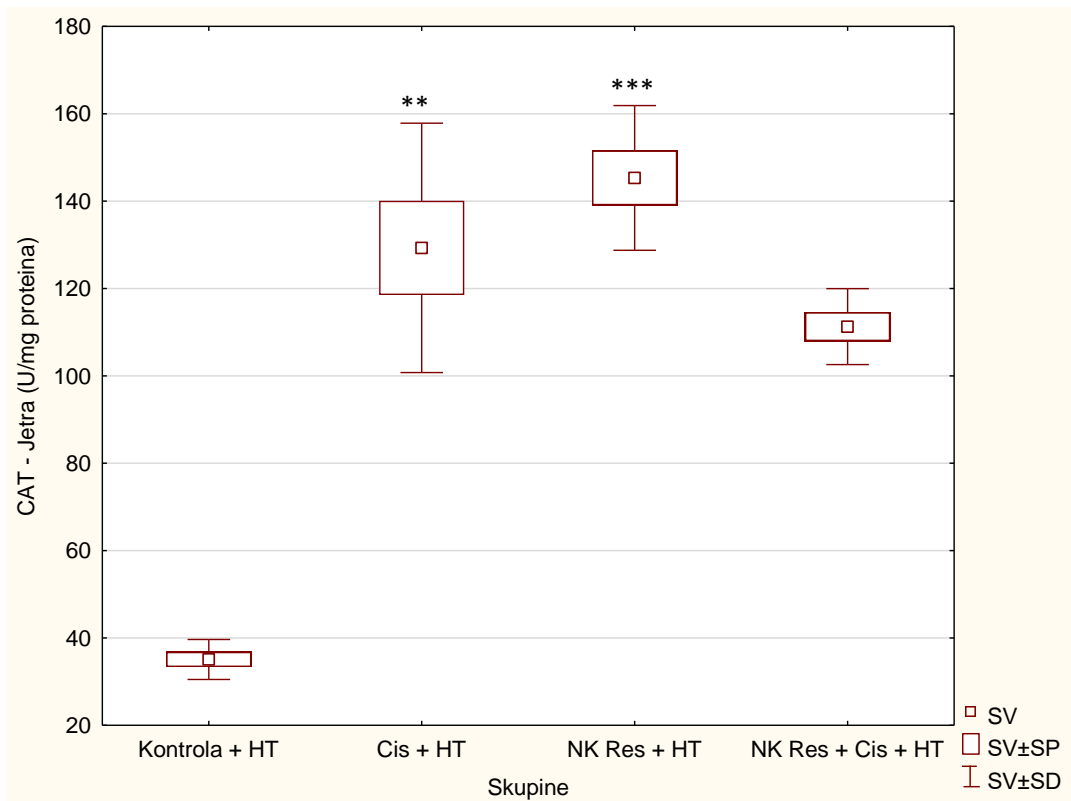
*Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$); ◊Statistički značajno u odnosu na NK Res + HT (◊ $P \leq 0,05$).

Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatin injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: HT- hipertermija; NK Res- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatin u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.5.8. Enzimski aktivnost katalaze u uzorcima tkiva jetre miševa

Rezultati mjerenja enzimski aktivnosti katalaze u uzorcima tkiva jetre (Slika 20) ukazuju na statistički značajno povećanje aktivnosti katalaze u skupinama obrađenim cisplatinom i hipertermijom ($P \leq 0,01$) te nanokristalima resveratrola i hipertermijom ($P \leq 0,001$) u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom.



Slika 20. Aktivnost katalaze u tkivu jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

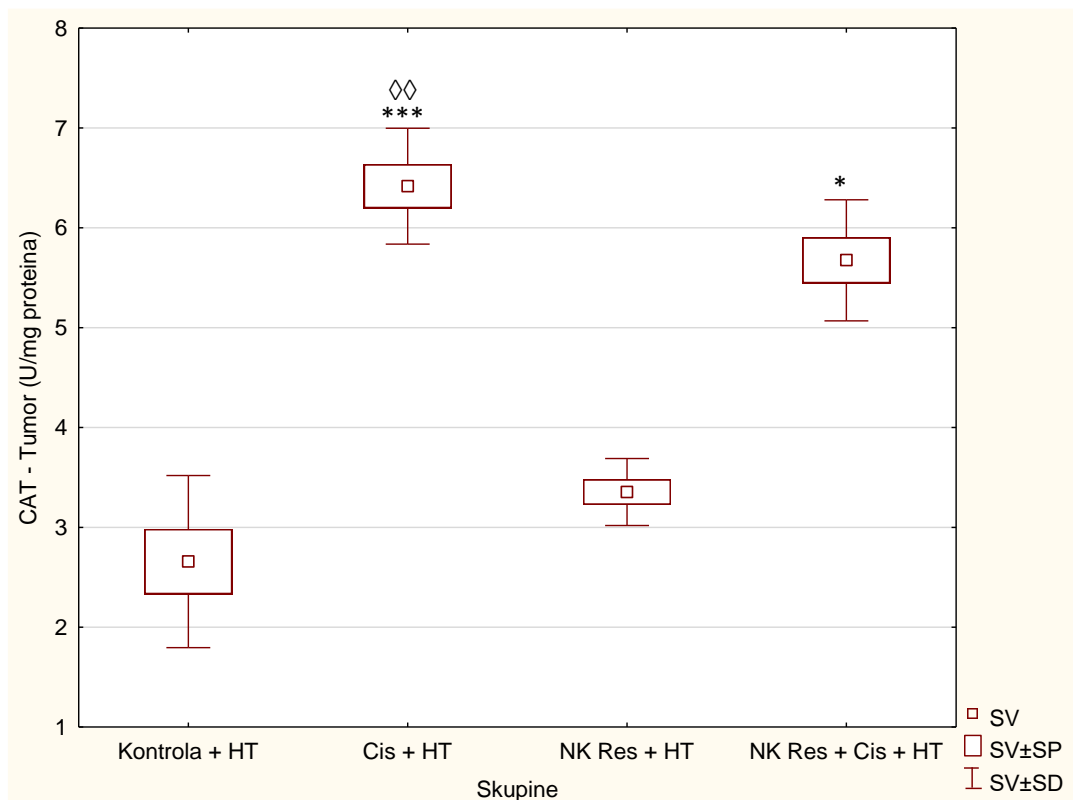
*Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$).

Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatin injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: HT- hipertermija; NK Res- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatin u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.5.9. Enzimska aktivnost katalaze u uzorcima tkiva tumora miševa

Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti katalaze u uzorcima tkiva tumora (Slika 21) ukazuju na statistički značajno povećanje aktivnosti katalaze u skupinama obrađenim cisplatinom i hipertermijom ($P \leq 0,001$) te nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom ($P \leq 0,05$) u odnosu na kontrolu s hipertermijom. Također, zabilježeno je statistički značajno povećanje aktivnosti katalaze u skupini obrađenoj cisplatinom i hipertermijom u odnosu na skupinu obrađenu nanokristalima resveratrola i hipertermijom ($P \leq 0,01$).



Slika 21. Aktivnost katalaze u tkivu tumora miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

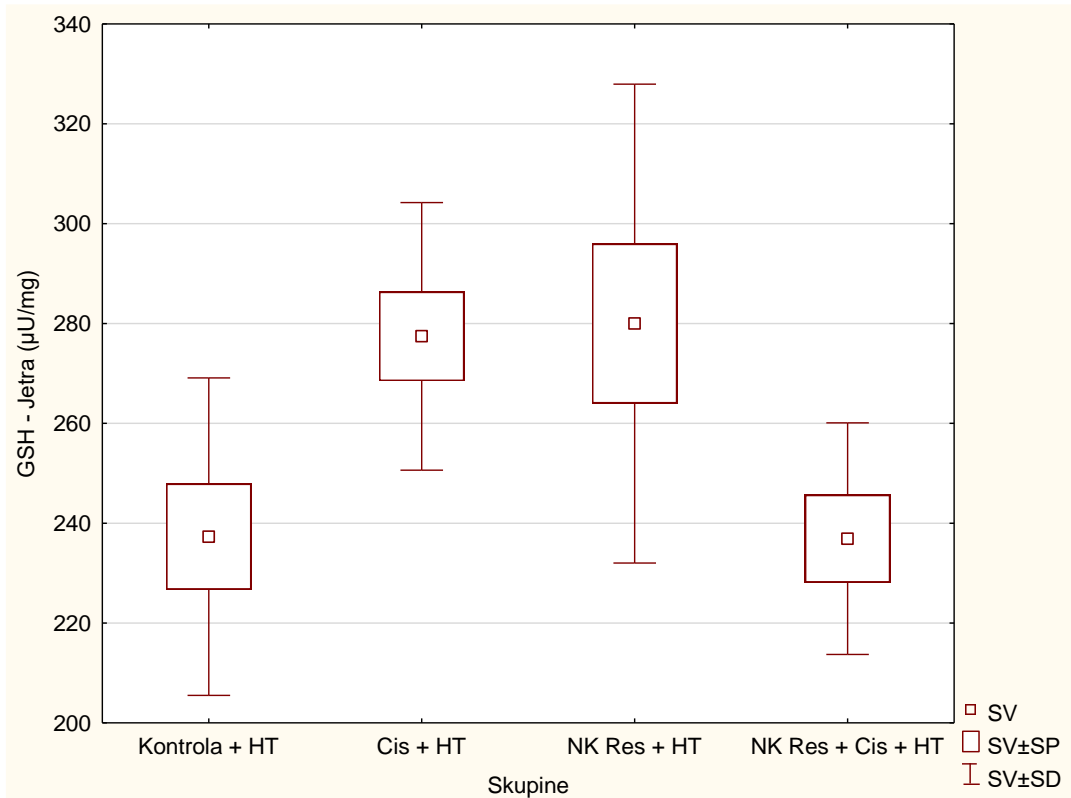
*Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ($*P \leq 0,05$; $***P \leq 0,001$); ◇Statistički značajno u odnosu na NK Res + HT (◇◇ $P \leq 0,01$).

Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatina injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: HT- hipertermija; NK Res- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatina u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.5.10. Razina ukupnog glutaciona u uzorcima tkiva jetre miševa

Rezultati mjerenja koncentracije ukupnog glutaciona u uzorcima tkiva jetre (Slika 22) pokazuju da nema statistički značajne razlike u koncentraciji ukupnog glutaciona između obrađenih skupina.



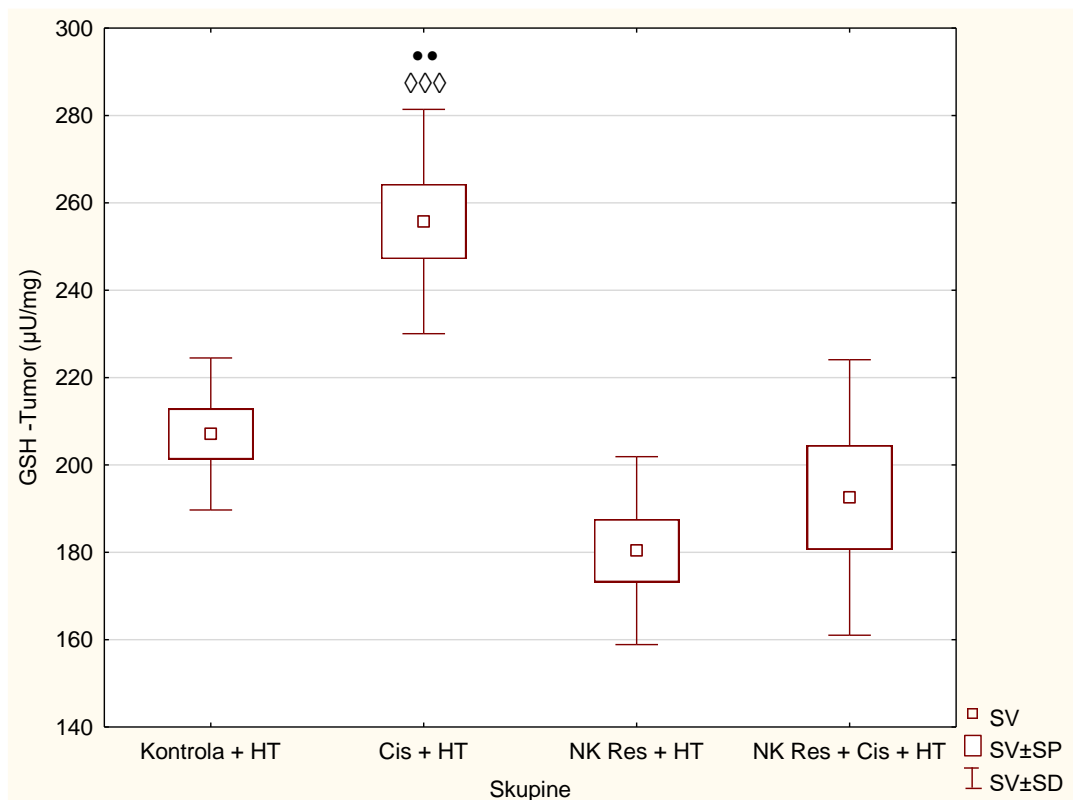
Slika 22. Koncentracija ukupnog glutaciona u tkivu jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatin injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: HT- hipertermija; NK Res- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatin u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.5.11. Razina ukupnog glutaciona u uzorcima tkiva tumora miševa

Rezultati mjerenja koncentracije ukupnog glutaciona u uzorcima tkiva tumora (Slika 23) pokazuju da postoji statistički značajno povećanje koncentracije ukupnog glutaciona u skupini obrađenoj cisplatinom i hipertermijom u odnosu na skupinu obrađenu nanokristalima resveratrola i hipertermijom ($P \leq 0,001$), kao i na skupinu obrađenu nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom ($P \leq 0,01$).



Slika 23. Koncentracija ukupnog glutationa u tkivu tumora miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

◊Statistički značajno u odnosu na NK Res + HT (◊◊◊ $P \leq 0,001$); *Statistički značajno u odnosu na NK Res + Cis + HT (** $P \leq 0,01$).

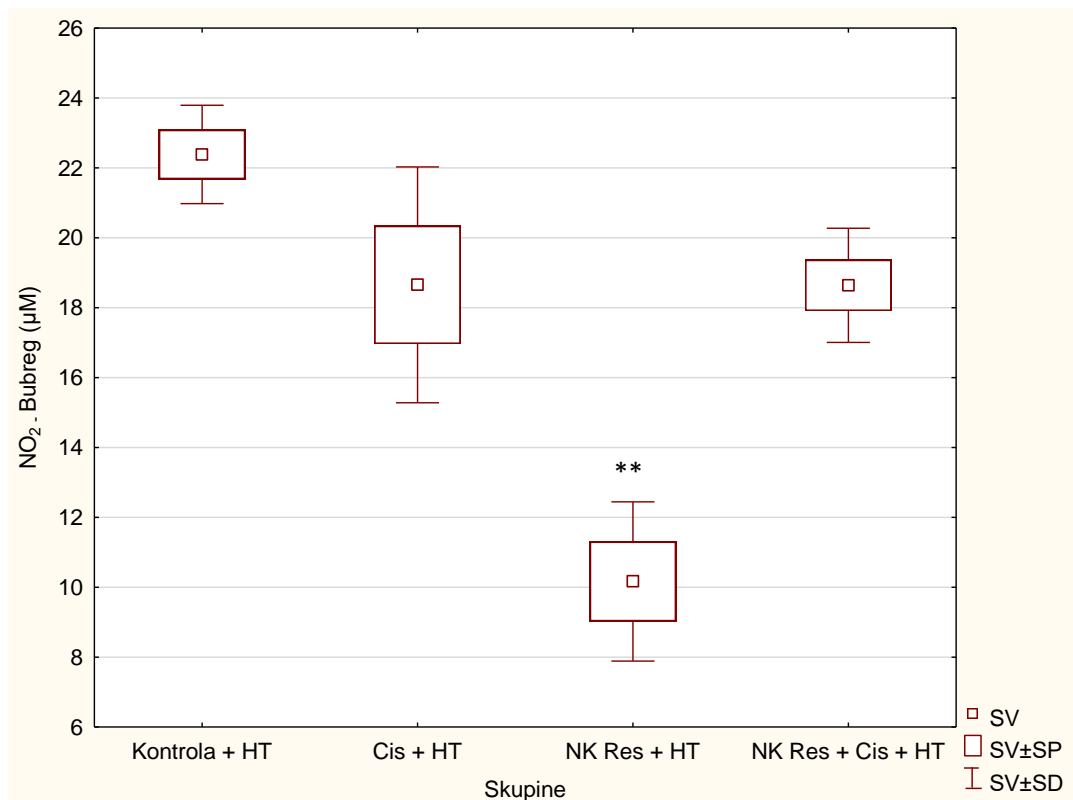
Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatin injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: HT- hipertermija; NK Res- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatin u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.6. AKTIVNOST DUŠIKOVOG OKSIDA (NO₂⁻) MJERENA INDIREKTNOM METODOM PREMA GRIESSU

3.6.1. Aktivnost dušikovog oksida u uzorcima tkiva bubrega miševa

Na Slici 24 prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti dušikovog oksida u uzorcima tkiva bubrega. Rezultati pokazuju statistički značajnu nižu aktivnost NO₂⁻ kod skupine obrađene nanokristalima resveratrola i hipertermijom u odnosu na kontrolu s hipertermijom ($P \leq 0,01$).



Slika 24. Koncentracija dušikovog oksida u tkivu bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

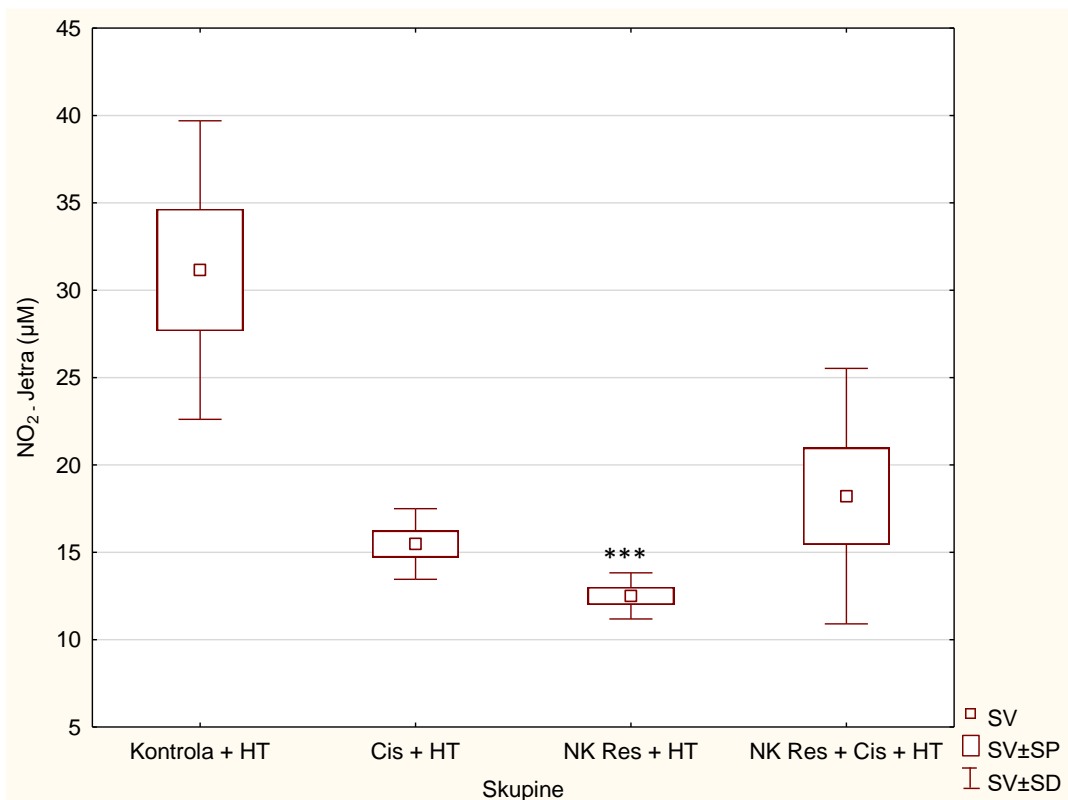
*Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (** $P \leq 0,01$).

Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatina injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: **HT**- hipertermija; **NK Res**- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; **Cis**- cisplatina u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.6.2. Aktivnost dušikovog oksida u uzorcima tkiva jetre miševa

Rezultati mjerenja aktivnosti dušikovog oksida u uzorcima tkiva jetre prikazani su na Slici 25. Iz rezultata je vidljiva statistički značajna niža aktivnost NO_2^- kod skupine obrađene nanokristalima resveratrola i hipertermijom u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ($P \leq 0,001$).



Slika 25. Koncentracija dušikovog oksida u tkivu jetre miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

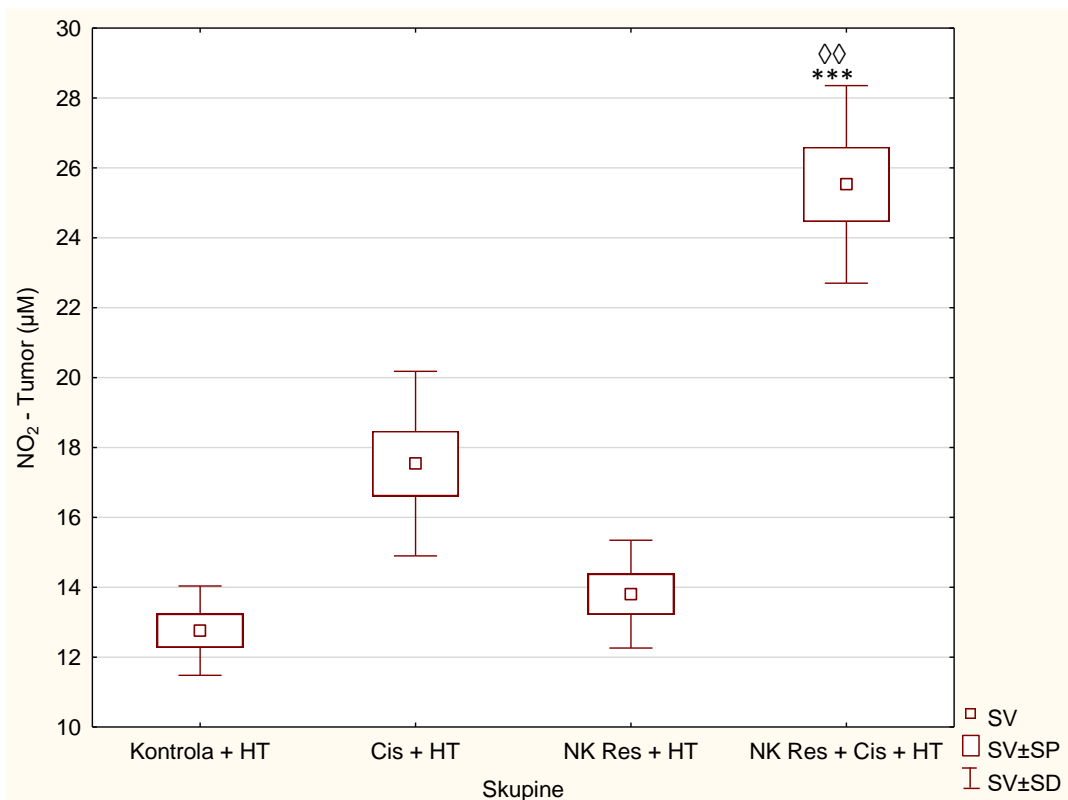
*Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (** $P \leq 0,001$).

Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatina injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: **HT**- hipertermija; **NK Res**- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; **Cis**- cisplatina u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.6.3. Aktivnost dušikovog oksida u uzorcima tkiva tumora miševa

Rezultati mjerenja aktivnosti dušikovog oksida u uzorcima tkiva tumora ukazuju na statistički značajnu višu aktivnost NO_2^- u skupini obrađenoj nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom u odnosu na kontrolu s hipertermijom ($P \leq 0,001$) i skupinu obrađenu nanokristalima resveratrola i hipertermijom ($P \leq 0,01$) (Slika 26).



Slika 26. Koncentracija dušikovog oksida u tkivu tumora miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

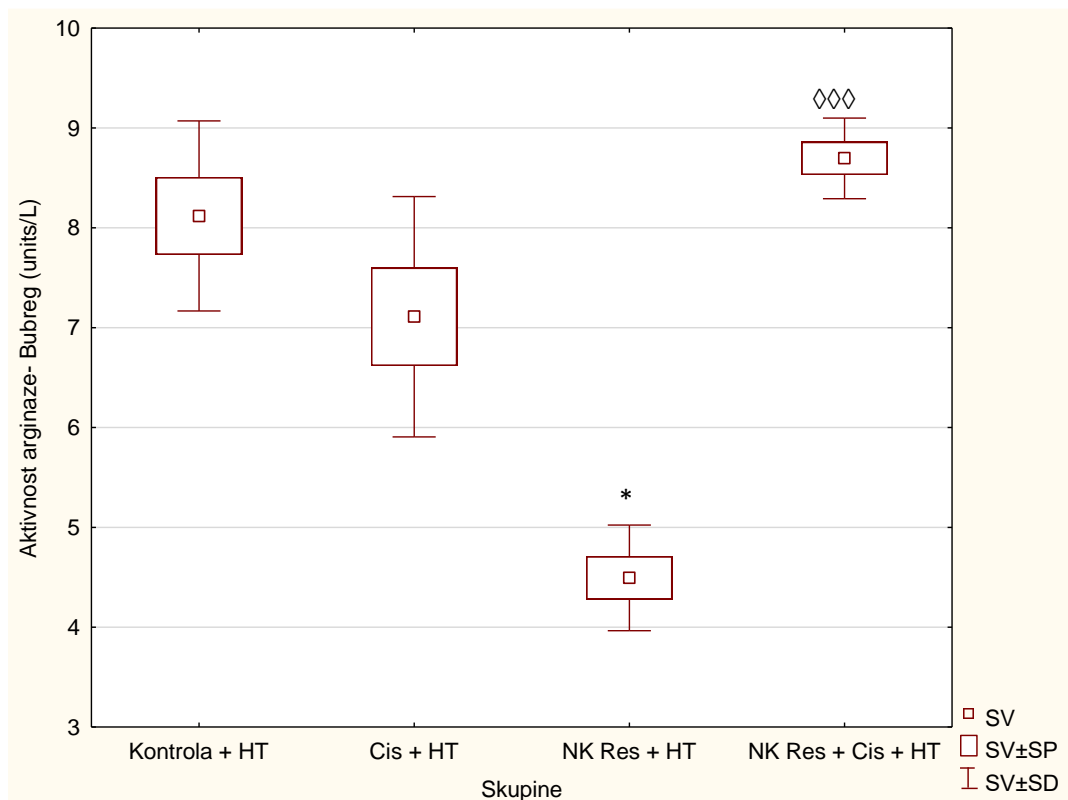
*Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT (** $P \leq 0,001$); \diamond Statistički značajno u odnosu na NK Res + HT ($\diamond\diamond P \leq 0,001$).

Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatin injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: HT- hipertermija; NK Res- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatin u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

3.7. ENZIMSKA AKTIVNOST ARGINAZE 1 (Arg1)

Rezultati enzimske aktivnosti arginaze u uzorcima tkiva bubrega prikazani su na Slici 27. Rezultati pokazuju statistički značajno smanjenje Arg 1 u skupini obrađenoj nanokristalima resveratrola i hipertermijom u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ($P \leq 0,05$). Kod skupine obrađene nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom postoji statistički značajno povećanje u arginaznoj aktivnosti u odnosu na skupinu obrađenu nanokristalima resveratrola i hipertermijom ($P \leq 0,001$).



Slika 27. Aktivnost arginaze u tkivu bubrega miševa nositelja EAT-a obrađenih nanokristalima resveratrola i cisplatinom te njihovom kombinacijom u hipertermalnim uvjetima

*Statistički značajno u odnosu na kontrolu + HT ($P \leq 0,05$); ◊Statistički značajno u odnosu na NK Res + HT (◊◊◊ $P \leq 0,001$).

Miševi (N=10) nakon subkutanog (*sc*) unosa 1×10^6 EAT stanica obrađeni su resveratrolom u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu s početkom 2 dana od injiciranja tumora dok je cisplatin injicirana u dozi od 2,5 mg/kg *ip* 10. i 12. dan te dozom od 5 mg/kg 15. dan. Životinje su izložene sustavnoj hipertermiji tijekom 15 minuta pri temperaturi od 41°C. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: HT- hipertermija; NK Res- nanokristali resveratrola u dozi od 50 mg/kg; Cis- cisplatin u dozi 2,5 i/ili 5 mg/kg

4. RASPRAVA

Tumor je jedan od osnovnih uzroka smrti u svijetu zbog čega se posljednjih desetljeća sve više radi na pronalaženju novih terapija, a njihov je cilj nuspojave izazvane konvecionalnim terapijama smanjiti na minimum. Heterogenost tumorskih stanica, odnosno njihove različite molekularne osobitosti i različite reakcije na terapije, odgovorna je za razvitak otpornosti na lijekove. U svrhu terapijskog napretka razvila se i nanomedicina utemeljena na biokompatibilnim i biorazgradivim sustavima koji su sposobni isporučiti kemoterapijske lijekove *in vivo* te povećati njihovu bioraspoloživost (Dagogo-Jack i Shaw, 2018; Martinelli i sur., 2019).

Brojna istraživanja usmjerena su i na pojedinačne polifenole kako bi se bolje razumjeli biološki i stanični mehanizmi njihovih antikancerogenih sposobnosti. Oni mogu imati antioksidacijski učinak, sudjelovati u detoksifikaciji ksenobiotika, inducirati apoptozu, potaknuti funkciju imunološkog sustava, protuupalna svojstva te njihov daljnji učinak na stanično signaliziranje (Shen i sur., 2007). Osobito važan prirodni polifenol je resveratrol koji ima sposobnost mijenjanja signalnih putova koji kontroliraju stanični rast, apoptozu, angiogenezu te proces metastaziranja tumora. Osim toga pokazuje i antioksidacijska svojstva, a utječe i na metabolizam glukoze (Srivastava i sur., 2010).

Često se različite tumorske terapije kombiniraju s blagom hipertermijom (39-42°C) u svrhu učinkovitijeg liječenja. Različita osjetljivost normalnih i tumorskih tkiva na toplinski stres pospješuje antitumorske učinke u tumorskim tkivima bez da se pri tome izazove šteta zdravog tkiva (Song, 1984).

Model tumora EAT pogodan je za proučavanje protutumorskih, antiangiogenih i protuupalnih učinaka prirodnih sastavnica. Pokazuje agresivno ponašanje i može rasti u brojnim mišjim sojevima. Sposoban je izazvati lokalnu upalnu reakciju, pojačano lučiti VEGF faktor te potaknuti brzi rast krvožilja neophodnog za dostavu nutritivnih komponenti za brzi rast tumora. (Oršolić i sur. 2016).

Ovo istraživanje rađeno je u svrhu ispitivanja učinka sustavne hipertermije (41°C) na antitumorske sposobnosti lijeka cisplatine u dozi 2,5 odnosno, 5 mg/kg te nanokristala resveratrola u dozi 50 mg/kg na inhibiciju brzorastućeg Ehrlich ascitesnog solidnog tumora u miševa, njihovo preživljavanje, polarizaciju makrofaga te potencijalnu toksičnost nastalu u

jetri i bubregu kao i mogućnost smanjenja posljedica toksičnosti u jetri i bubregu, prouzročene cisplatinom i hipertermijom, primjenom nanokristala resveratrola.

Obrada životinja podijeljenih u četiri skupine od dvadeset životinja započela je injiciranjem 1×10^6 EAT stanica subkutano (*sc*). Drugog dana od injiciranja tumorskih stanica, životinje su obrađene nanokristalima resveratrola u dozi od 50 mg/kg per os (*po*) tijekom 5 dana u nizu. Kada je tumor postao vidljiv (oko 10. dana) injicirana je cisplatina u dozi od 2,5 mg/kg (*ip*) 10. i 12. dana te dozom od 5 mg/kg 14. dana. Također, sve životinje bile su izložene sustavnoj hipertermiji pa tako i kontrolna skupina koja je primala samo fiziološku otopinu. Za provjeru učinka sustavne hipertermije na antitumorski potencijal cisplatine i nanokristala resveratrola u inhibiciji rasta Ehrlichovog ascitesnog solidnog tumora, kao i na toksičnost cisplatine i hipertermije te potencijalnu zaštitu od toksičnosti nanokristalima resveratrola istraženo je sljedeće: promjena tjelesne mase, promjena volumena tumora i inhibicija rasta tumora, preživljavanje, oksidacijski stres (proteini, MDA, CAT, GSH) u uzorcima tkiva jetre, bubrega i tumora, polarizacija i aktivnost makrofaga [analiza dušikovog oksida (NO) u jetri, bubregu i tumoru te analiza arginaze 1 (Arg 1) u bubregu].

Praćenjem promjene volumena tumora i tjelesne mase miševa uz određivanje inhibicije rasta tumora istraženi su antikancerogeni učinci cisplatine i nanokristala resveratrola te njihove kombinacije u hipertermalnim uvjetima. Iz priloženih rezultata vidi se da je kod svih obrađenih skupina došlo do smanjenja volumena tumora 13. dana u odnosu na kontrolu s hipertermijom. Smanjenje tjelesne mase prisutno je, također, u svim obrađenim skupinama, u usporedbi s kontrolnom s hipertermijom, a najveće smanjenje zapaženo je u skupini obrađenoj cisplatinom i nanokristalima resveratrola u hipertermalnim uvjetima. Najveća inhibicija rasta tumora zabilježena je u skupini obrađenoj cisplatinom i hipertermijom 16. dana i ona iznosi preko 50%. Sve ostale obrađene skupine bilježe porast inhibicije 16. i 33. dana, a izuzetak su skupine obrađene nanokristalima resveratrola u hipertermalnim uvjetima gdje je 33. dana zapažen rast tumora (-42%). Obrada životinja s istraživanim pripravcima ukazuje na inhibiciju rasta tumora u usporedbi s kontrolom s hipertermijom s tim da je u skupinama obrađenim nanokristalima resveratrola u hipertermalnim uvjetima takav učinak prisutan samo u početku, odnosno do jedne vremenske točke (Slike 8,10,11). Dobiveni rezultati u skladu su s literaturnim podacima koji ukazuju na sposobnost resveratrola u pojačavanju učinaka cisplatine, kod raka pluća ne-malih stanica u *in vitro* uvjetima, kao i na njegovu antikancerogenu sposobnost i učinka na metabolizam glukoze u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima na mišjem modelu karcinoma jajnika (Ma i sur., 2015; Tan i

sur., 2015). Njihov sinergistički učinak dodatno pospješuje hipertermija koja pridonosi narušavanju cjelovitosti stanične membrane čime omogućuje lakši unos ovih terapijskih sredstava, a budući da pojačava protok krvi omogućuje i njihovo nakupljanje u tumorskom tkivu. To su potvrdila *in vitro* i *in vivo* istraživanja na kolorektalnom karcinomu miševa koja su proveli Kuo i sur. (2020). Njihovi rezultati ukazuju na smanjenje volumena i težine tumora, kao i na povećanu ekspresiju Hsp70, specifičan odgovor T-limfocita i povećanu stopu apoptoze i nekroze tumorskih stanica onih skupina miševa obrađenih kurkuminom i resveratrolom uz hipertermiju (elektro-hipertermija pri 42°C) u odnosu na ostale skupine (kontrola, samo hipertermija te samo kurkumin i resveratrol).

Svi mehanizmi antikancerogenog učinka resveratrola nisu u potpunosti razjašnjeni. Zna se da resveratrol može smanjiti regulaciju NF-kB faktora čija se nepravilna aktivacija može javiti kao odgovor na podražaje citokinima, čimbenicima rasta te kao posljedica fiziološkog, fizičkog i oksidacijskog stresa, ali i određenih farmakoloških lijekova te tako spriječiti neoplastičnu transformaciju i širenje tumora. Resveratrol može inducirati apoptozu nizvodnim signalima i aktivatorom transkripcijskog faktora 3 (STAT3) te genskim produktima anti-apoptoze i preživljavanja stanica, kao što je BCL-2 i regulacijom ekspresije ciklooksigenaze. Također, pospješuje regulaciju tumor supresor gena p53 i citokina (MIC-1, engl. *macrophage inhibitory cytokine*) koji posjeduju antitumorsku aktivnost, a cilj mu je transformirajući faktor rasta-beta (TGF- β) te epidermalni faktor rasta (EGF) i njegov receptor (EGF-R), transmembranska tirozin kinaza, koja je prekomjerno eksprimirana u nekim tumorima i potiče proliferaciju (Wong i Fiscus, 2015). Citotoksično djelovanje cisplatine temelji se na akumulaciji cisplatine u stanicama jetre i bubrega čime se pojačava oksidacijski stres, remeti homeostazu kalcija, smanjuje funkcija mitohondrija i potiče apoptozu ili nekrozu stanica. Združeni učinak cisplatine i resveratrola potiče pojačanu smrt tumorskih stanica, ali utječe i na pojačani imunosni zaštitni učinak domaćina na što ukazuje smanjeni volumen tumora i povećano preživljavanje domaćina. Svakako, ovi mehanizmi djelovanja resveratrola i cisplatine ukazuju na sinergistički odgovor za dobivene rezultate ovog istraživanja (Slike 8,10,11). Rezultati praćenja preživljavanja ukazuju na povećanje životnog vijeka kod skupine obrađene cisplatinom i hipertermijom (46,99%) i one obrađene nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom (19,81%). Smanjenje životnog vijeka zabilježeno je u skupini obrađenoj nanokristalima resveratrola i hipertermijom (-2,22%) (Slika 12, Tablica 6). Čini se da hipertermija u kombinaciji s nanokristalima ima negativan učinak na tumor. Lijekovi od platine u kombinaciji s resveratrolom zbog sinergističkog djelovanja i/ili kompenzacije štetnih

učinaka mogu pospješiti ubijanje tumorskih stanica. Takvo liječenje rezultira smanjenjem sustavne toksičnosti uzrokovane kemoterapijama ili radioterapijama zbog potrebnih nižih doza lijeka čime se daje prednost kombiniranim terapijama u odnosu na monoterapije (Sarkar i Li, 2006; Dasari i Tchounwou, 2014).

Jedan od čimbenika koji pridonosi mutagenosti, citotoksičnosti te karcinogenezi je i oksidacijski stres. Poznato je da su reaktivne vrste kisika (ROS), kao i reaktivne vrste dušika (RNS), uključene u mnoge fiziološke procese kao što su redoks signalizacija i imunost, ali i u patološke procese kao što je razvoj tumora, promicanje genetske nestabilnosti, abnormalna proliferacija stanica i angiogeneza. Fiziološki putovi koji uključuju ključne enzime poput glutation-reduktaze, glutation peroksidaze, katalaze i superoksid dismutaze troše slobodne radikale i druge oksidanse, pomažući tako u održavanju oksidacijske ravnoteže. Superoksid (O_2^-) i vodikov peroksid (H_2O_2) predstavljaju najpoznatije i najčešće ROS, pri čemu prvi uklanjaju superoksid dismutaze (SOD), a drugi katalaza (CAT). Kada se ovi procesi prevladaju, nastupa stanje oksidacijskog stresa što vodi oštećenju komponenti stanica, uključujući proteine, lipide i DNA. Tumorske stanice mogu iskoristiti prednosti tih procesa kako bi izbjegle odgovor imunološkog sustava, apoptozu te kako bi razvile otpornost na kemoterapiju (Belotte i sur., 2014; Lei i sur., 2016).

Učinci sustavne hipertermije kao i cisplatine i nanokristala resveratrola na antioksidacijsku aktivnost u uzorcima tkiva bubrega, jetre i tumora ispitani su mjerenjem ukupne razine proteina, MDA te aktivnosti antioksidacijskih enzima CAT i GSH.

Peroksidacija lipida smatra se obilježjem oksidacijskog stresa u kojem ROS stupaju u međureakciju s višestruko nezasićenim masnim kiselinama i dovode do stvaranja lipidnih produkata kao što su MDA i 4-HNE (4-hidroksinonenal) koji uzrokuju oštećenja membranskih komponenata stanice te nekrozu i upalu (Srivastava i sur., 1995). U jetri miševa, nositelja EAT, dolazi do znatnog povećanja lipidne peroksidacije te do smanjenja količine antioksidacijskih enzima, a takve značajke čine EAT pogodnim modelom za istraživanje antioksidacijske učinkovitosti prirodnih sastavnica (Oršolić i sur. 2016). Analiza razine lipidne peroksidacije u uzorcima tkiva bubrega, jetre i tumora pokazala je statistički značajno povećanje razine MDA u tkivu jetre i tumora kod skupine obrađene nanokristalima resveratrola i hipertermijom u odnosu na kontrolu s hipertermijom ($P \leq 0,001$; $P \leq 0,05$) (Slike 17,18). Čini se da nanokristali resveratrola osim pozitivnog antioksidacijskog učinka mogu imati i negativni prooksidacijski učinak pri hipertermalnim uvjetima. Jedno od objašnjenja

moglo bi se temeljiti na pojačanoj aktivnosti makrofaga kao ključnih stanica u proizvodnji ROS-a (respiracijski prasak) koji u nazočnosti povećane razine metala, poput Fe, mogu dovesti do prooksidacijskog mikrokoliša koji potiče angiogenezu i rast tumora i makrofagnu polarizaciju prema M2 fenotipu (Slika 11, i 12, Tablica 6). Smanjena razina NO nakon obrade s nanokristalima i hipertermijom ukazuje na M2 polarizaciju makrofaga. Polarizacija M2 makrofaga kod bubrega i jetre može imati zaštitni učinak potičući regeneraciju oštećenog tkiva na što ukazuje i povećana aktivnost arginaze u bubregu nakon primjene nanokristala resveratrola, cisplatine i hipertermije. Nasuprot tome, kod tumora u kombinaciji nanokristala resveratrola, cisplatine i hipertermije imamo pojačanu NO aktivnost što ovisno o razini NO može imati različite učinke. Primjerice, osim citokinskog profila, ključna je razlika između M1 i M2 makrofaga i u njihovom metabolizmu aminokiselina, što ima ključne uloge u njihovim funkcijama. M1 makrofage karakterizira povećana ekspresija iNOS (NOS2) te proizvodnja NO, koji je bitan efektor njihove mikrobiocidne, ali u visokoj razini i protutumorske aktivnosti. Inducibilna iNOS sintetizira NO koji se zadržava danima u mikromolarnoj koncentraciji (Vahora i sur., 2016). Sinteza NO odvija se u dva koraka; u prvom djelovanjem NOS dolazi do hidroksilacije L-arginina u N-hidroksi-L-arginin (NOHA) koji se potom u drugom koraku oksidira u L-citrulin i NO. Uloge NO u razvoju i progresiji tumora su višestruke; u niskim koncentracijama (<100 nM) potiče proliferaciju i angiogenezu, u srednjim (100-500 nM) potiče povećanu invazivnost, metastaziranje, te supresiju apoptoze, dok u višim (>500 nM) zbog stvaranja peroksinitrita potiče oštećenje DNA, oksidacijski stres, citotoksičnost i apoptozu. Čini se da kombinacija nanokristala resveratrola, cisplatine i hipertermije ide u prilog pozitivnog protutumorskog učinka izazvanog pojačanom citotoksičnošću i apoptozom tumorskih stanica na što ukazuje smanjenje tjelesne mase, volumen tumora i inhibicija rasta tumora (Slike 8, 10 i 11).

Razina MDA u uzorcima tkiva bubrega snižena je kod skupine obrađene cisplatinom u hipertermalnim uvjetima ($P \leq 0,01$) te nanokristalima resveratrola i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima ($P \leq 0,001$) u odnosu na onu obrađenu nanokristalima resveratrola u hipertermalnim uvjetima (Slika 16). Sniženim razinama MDA pokazujemo u tkivu bubrega antioksidacijski potencijal resveratrola. Rezultati drugih istraživanja pokazuju da primjena cisplatine kod štakora uzrokuje značajno povećanje lipidne peroksidacije u želučanoj sluznici (262%), bubrezima (185%) i jetri (134%) u usporedbi s kontrolom (fiziološkom otopinom) (Srivastava i sur., 1995). Njeni toksični učinci najviše se osjete u bubregu, a resveratrol ima sposobnost smanjiti povećanje takve lipidne peroksidacije smanjenjem slobodnih radikala i infiltrata upalnih stanica (Do Amaral i sur. 2007). Temeljem navedenog možemo zaključiti da

različiti okolišni uvjeti igraju važnu ulogu u oksido-redukcijskom statusu nanokristala i hipertermije.

Analizom oksido-redukcijskog statusa vidljivo je da niti u jednoj obrađenoj skupini nije došlo do statistički značajne promjene koncentracije glutationa (GSH) u uzorcima tkiva jetre tijekom 14 dana obrade (Slika 22), dok je u uzorcima tkiva tumora primjećeno povećanje koncentracije GSH kod skupine obrađenom cisplatinom i hipertermijom u odnosu na skupine obrađene nanokristalima resveratrola u hipertermalnim uvjetima ($P \leq 0,001$) te onu obrađenu nanokristalima resveratrola i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima ($P \leq 0,01$) (Slika 23). Razlog povećanja koncentracije GSH kod skupine obrađenom cisplatinom i hipertermijom u tumorskom tkivu je pojačani odgovor na oksidacijski stres induciran cisplatinom, ali i ostanak stanica s većom antioksidacijskom sposobnošću što može voditi kemorezistenciji i selekciji otpornih stanica na cisplatinu nakon višekratne primjene cisplatine.

GSH je snažni inhibitor neoplastičnog procesa i važan je kao endogeni antioksidacijski sustav koji se nalazi u visokim koncentracijama u jetri te ostvaruje ključnu funkciju u zaštitnom procesu. Povišene razine GSH u tumorskim stanicama imaju ulogu zaštite u karcinomima koštane srži, dojke, debelog crijeva, grkljana pružanjem otpornosti na neke kemoterapijske lijekove. Umjerene razine ROS-a mogu poticati preživljavanje i proliferaciju aktiviranjem signalnih putova koji pridonose rastu tumora u stresnoj mikrookolini. Prekomjerne razine ROS-a, zakazivanje mehanizama koji ih uklanjaju ili nedostatak antioksidansa rezultira oštećenjem biomolekula, što pokreće staničnu smrt. Oksidacijski stres uzrokuje promjene u ekspresiji gena, proliferaciji stanica i apoptozi. Stvaranje ROS-a u mitohondrijima ključno je za stvaranje apoptosoma, a smanjena razina GSH neophodna je za podvrgavanje normalnih stanica apoptozi, neovisno o razini ROS-a. Inhibiranje razine GSH i/ili iscrpljivanje nakon pojačanog oksidacijskog stresa u kombinaciji s citotoksičnim lijekovima može pomoći u ograničavanju tumorskog rasta (Wu i sur., 2004; Lu, 2009).

Analiza CAT aktivnosti u uzorcima tkiva bubrega, jetre i tumora bilježi statistički značajno povećanje u skupinama obrađenima cisplatinom i hipertermijom u odnosu na kontrolu s hipertermijom ($P \leq 0,01$ ili $P \leq 0,001$) te u skupini obrađenoj nanokristalima resveratrola s hipertermijom u uzorcima tkiva bubrega i jetre u odnosu na kontrolu s hipertermijom ($P \leq 0,001$) kao i u skupini obrađenoj nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom u tkivu tumora u odnosu na kontrolu s hipertermijom ($P \leq 0,05$). Povećanje aktivnosti CAT zabilježena je i u skupini obrađenoj cisplatinom i hipertermijom u odnosu na skupinu obrađenu nanokristalima resveratrola i hipertermijom ($P \leq 0,01$) u tkivu tumora.

Statistički značajno smanjenje aktivnosti katalaze vidljivo je samo u bubregu i to u skupini obrađenoj nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom u odnosu na skupinu obrađenu nanokristalima resveratrola i hipertermijom ($P \leq 0,05$) (Slike 19-21). CAT je enzim smješten uglavnom u peroksisomima razgrađuje H_2O_2 , nusprodukt oksidacije masnih kiselina, na kisik i vodu te pruža zaštitu od njegovih toksičnih učinaka bez stvaranja intermedijarnih slobodnih radikala. Značajno smanjenje CAT aktivnosti opaženo je kod mnogih vrsta karcinoma: glave i vrata, pluća, gastrointestinalnog sustava, dojki, bubrega ili leukemije, a smanjena aktivnost CAT dovodi do povećane koncentracije vodikovog peroksida što potiče napredak tumora (Kirkman i Gaetani, 2007) dok prema drugima nakupljane H_2O_2 može imati citotoksični učinak na stanice tumora (Symos i sur., 2000). Povišena razina CAT aktivnosti u dobivenim rezultatima ukazuje na sposobnost nanokristala resveratrola u povećavanju aktivnosti antioksidacijskih enzima u stanicama bubrega, jetre kao i selekciju rezistentnih stanica tumora. Skupina životinja obrađena nanokristalima resveratrola i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima pokazala je povećano nakupljanje H_2O_2 u bubregu zbog toksičnog učinka cisplatine. Poznato je da antioksidacijski učinak određene tvari može biti važan u sprječavanju genetske nestabilnosti, inhibiciji polarizacije TAM makrofaga te posljedično inhibiciji drugih procesa važnih u progresiji tumora poput angiogeneze i rasta tumora (Oršolić i sur., 2016).

Resveratrol ima sposobnost pojačati ekspresiju ovakvih enzima uključenih u održavanje oksidacijsko-redukcijske ravnoteže u stanicama, kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza, hem oksigenaza, a može povećati i ekspresiju i/ili aktivnost glutation S-transferaze (GST) i glutation peroksidaze (GPx), što rezultira smanjenjem razine glutationa. S druge strane, cisplatin pridonosi povećanom stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i smanjenju razine antioksidacijskih enzima. U kroničnoj upali imunost, ali i stanice tumora izlučuju velike količine reaktivnih vrsta ROS/RNS što potiče novačenje više aktiviranih imunoloških stanica čime se pojačavaju nekontrolirani procesi koji pridonose pojačanoj angiogenezi i rastu tumora. Liječenje cisplatinom pokreće stvaranje proupalnih citokina, kao što je faktor nekroze tumora (TNF)- α , što može pridonijeti njenim nefrotoksičnim učincima. Jedan od članova TNF obitelji je FasL, a njegov topljivi oblik može posredovati u upalnim reakcijama i promicati toksičnost, stoga je pojačana antioksidacijska obrana ključni pristup za ublažavanje nefrotoksičnosti cisplatine (Robb i sur., 2008; Dasari i Tchounwou, 2014; Soni i sur., 2018). Točnije, biljezi oksidacijskog stresa i antioksidacijske zaštite na jetri, bubrezima i slezeni mogu ukazivati na kemoprotektivni (hepatoprotektivni i renoprotektivni) te

imunostimulacijski učinak određenih pripravaka. U našem istraživanju očito resveratrol ukazuje na zaštitni i imunomodulacijski učinak.

Smanjenje oksidacijskog stresa i povećanje antioksidacijskih učinaka dovodi do smanjenja oštećenja membrana stanica jetre, bubrega i slezene kod miševa nositelja EAT. Te promjene su najviše vidljive u statistički značajnom smanjenju relativne težine slezene, a osobito u miševa koji su obrađeni cisplatinom i hipertermijom te nanokristalima resveratrola i cisplatinom u hipertermalnim uvjetima ($P \leq 0,01$; $P \leq 0,01$) (Slika 9).

Kako bi se istražila imunomodulatorna uloga resveratrola, kao i cisplatine uz izlaganje hipertermiji u ovom istraživanju analizirala se polarizacija makrofaga mjerenjem aktivnosti dušikovog oksida (NO) i arginaze 1 (Arg 1). Makrofagi mogu imati razne funkcije, ovisno o fiziološkoj ili patološkoj situaciji. Brojna istraživanja dopuštaju klasifikaciju makrofaga na tip I (M1) koji je sposoban proizvesti velike količine proupalnih citokina, čime potiču visoku razinu molekula MHC važnih za ubijanje patogena i tumorskih stanica. Oni induciraju antitumorske odgovore kao rezultat lučenja IFN- γ , IL-12 ili TNF- α . Nasuprot tome, makrofagi tipa II (M2) odgovorni su za protuupalni odgovor, potiskuju imunološki odgovor kao rezultat sekrecije TGF- β ili IL-10 i potiču angiogenezu i rast tumora. U tumorskom mikrokolišu prisutni su tumoru-pridruženi makrofagi (TAM) koji imaju obilježja M2 makrofaga (Dandekar i sur., 2011). Makrofagi M1 eksprimiraju enzim dušikov oksid sintazu, koji metabolizira arginin u dušikov oksid (NO) i citrulin, a NO se može dalje metabolizirati u reaktivne dušikove vrste. S druge strane, M2 makrofagi eksprimiraju enzim arginazu, koji hidrolizira arginin do ornitina i uree. Put arginaze ograničava dostupnost arginina za sintezu NO. M1 i M2 polarizacija dovodi do suprotnih ishoda upalnih reakcija. Polarizaciju M1/M2 makrofaga može pokretati mikrobiološka infekcija ili urođeni signali opasnosti, sekundarno potičući polarizaciju T pomoćničkih (Th)1/ Th2 limfocita i adaptivni imunološki odgovor (Rath i sur., 2014). Visoke koncentracije NO (na primjer, generirane aktiviranim makrofazima) mogu posredovati u apoptozi tumorskih stanica i inhibiciji rasta tumora kako smo već pojasnili prije. S druge strane, pri niskim koncentracijama NO potiče rast i proliferacija tumora (Xu i sur., 2002).

Makrofagi u različitim tkivima, ovisno o različitim okolnim čimbenicima mogu različito polarizirati. Rezultati ovog istraživanja pokazuju statistički značajnu nižu aktivnost NO₂⁻ kod skupine obrađene nanokristalima resveratrola i hipertermijom u odnosu na kontrolu s hipertermijom ($P \leq 0,01$; $P \leq 0,001$) u tkivu bubrega i jetre što ukazuje na nazočnost M2

makrofaga i prisutnost Th2 citokina s antiupalnim učinkom. Statistički značajna viša aktivnost NO_2^- prisutna je u skupini obrađenoj nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom u odnosu na kontrolu s hipertermijom ($P \leq 0,001$) i skupinu obrađenu nanokristalima resveratrola i hipertermijom ($P \leq 0,01$) u tumorskom tkivu (Slike 24-26) i ukazuje na M1 polarizaciju makrofaga koji imaju pojačanu tumoricidnu aktivnost, veću mogućnost predočavanja tumorskih antigena te povećanje aktivnosti stanične imunosti, posebice NK stanica i citotoksičnih stanica T ključnih u inhibiciji angiogeneze i rasta tumora. Stoga, uklanjanje ROS-a pomoću antioksidansa kao što je resveratrol, te povećanje njegove bioraspoloživosti primjenom u obliku nanokristala, moglo bi se koristiti kao lijek za inhibiciju angiogeneze i napretka tumora s obzirom da je oksidacijski stres nužan za polarizaciju M2 makrofaga koji pridonose angiogenezi i rastu tumora. Resveratrol u tumorskom tkivu može povećati proizvodnju dušikovog oksida (NO) povećavajući aktivnost endotelne NO sintaze, djelomično djelujući na nizvodni put guanidin monofosfat/protein kinaze G (NO/cGMP/PKG) i proteine koji sudjeluju u staničnom preživljavanju. Tako inhibira migraciju i invaziju stanica, odnosno ključne procese u neo-angiogenezi, potiskuje aktivnost PKG i smanjuje ekspresiju četiriju proteina bitnih za stanično preživljavanje (IAP1 i 2, livin i XIAP). Time se podupire smanjenje ekspresije VEGF-a te ističe supresivna ulogu resveratrola u svim koracima karcinogeneze (Wong i Fiscus, 2015).

Rezultati mjerenja razine Arg 1 pokazuju smanjenje aktivnosti u skupini obrađenoj nanokristalima resveratrola i hipertermijom u bubregu u odnosu na kontrolnu skupinu s hipertermijom ($P \leq 0,05$), a povećanje kod skupine obrađene nanokristalima resveratrola, cisplatinom i hipertermijom u odnosu na skupinu obrađenu nanokristalima resveratrola i hipertermijom ($P \leq 0,001$) (Slika 27). Na razinu Arg 1 može utjecati metabolizam tumora; mliječna kiselina koju proizvode tumorske stanice, nusprodukti aerobne ili anaerobne glikolize te pojačana uzvodna regulacija razine Arg 1 u makrofazima povezanima s hipoksija inducirajućim faktorom (HIF1a). Kod miševa regulaciju ekspresije Arg 1 modulira nekoliko imunosupresivnih citokina (IL-4, IL-10 i IL-13) i prostaglandina (PG2), a također i aktivnost PI3K/PTEN jer gubitak PTEN-a dovodi do polarizacije M2 preko C/EBP β i STAT3. Pojačana M2 aktivnost povezana je s Th2 skupinom citokina i protuupalnim učinkom što doprinosi regenerativnoj sposobnosti bubrega. M2 makrofage karakterizira visoka ekspresija Arg-1, citosolnog enzima koji metabolizira L-arginin do ornitina i poliamina. Poliamini su značajni za proizvodnju kolagena, staničnu proliferaciju, fibrozu, te ostale procese povezane sa remodeliranjem tkiva (MacMicking i sur., 1997; Pesce i sur., 2009). Sintezu arginaze

stimuliraju Th2 citokini IL-4, IL-10 i IL-13. Arginaza I, koju osim M2 makrofaga u tumorskom mikrookolišu klasično izlučuju i mijeloične supresorske stanice (MDSC) ima razne imunosupresivne uloge.

Osim supresivnog učinka na NO, dokazano je da arginaza I u tumorskom mikrookolišu inhibira ekspresiju receptora T limfocita (TCR) te time i specifične odgovore ovisne o antigenu. Arginaza I, poput arginaze II hidrolizira L-arginin u ureu i L-ornitin, koji je glavni supstrat za stvaranje poliamina (putrescin, spermidin i spermin). Poliamini su nužni za progresiju staničnog ciklusa i progresiju tumora (Rodriguez i sur., 2004). U tumorskoj mikrookolini bitna je metabolička ravnoteža za preživljavanje, aktivaciju i antitumorske funkcije T stanica, a aktivnost arginaze potiskuje funkciju T stanica iscrpljujući arginin iz mikrookoline (Sahin i sur., 2014; Rodriguez i sur., 2017).

Inhibicija arginazne aktivnosti može preokrenuti supresiju NO i potaknuti protutumorsko djelovanje makrofaga povećanjem Th1 citokina (IL-2, IL-6, IFN- γ) i inhibiranjem bijega tumorskih stanica jačanjem aktivnosti M1 makrofaga kao antigen predočnih stanica (APC) koje pridonose urođenoj i stečenoj imunosti putem različitih citokina i kemokina što u konačnici dovodi do uništavanja tumorskih stanica (Li i sur., 2019). Dobiveni rezultati ukazuju na imunomodulatornu aktivnost nanokristala resveratrola čime se zapaža povećanje M1 tumoricidne aktivnosti TAM-a kod tumora i inhibiranje M2 tumorske aktivnosti TAM-a, dok u tkivu bubrega M2 makrofagi su pokazatelj procesa remodeliranja tkiva zbog oštećenja induciranih cisplatinom.

Vjeruje se da polifenoli kao što je resveratrol imaju potencijal u sprječavanju napretka progresivnog Ehrlich ascitesnog solidnog tumora u miševa kroz niz molekularnih mehanizama, uključujući inhibiciju proliferacije tumorskih stanica, sprječavanja rasta tumora, invazije i angiogeneze. Antitumorska sposobnost osobito se vidi u brojnim antioksidativnim i protuupalnim učincima. Na temelju dobivenih rezultata neupitno je da nanokristali resveratrola mogu smanjiti toksične učinke cisplatine uz primjenu hipertermije te pospješiti inhibiciju tumorskog rasta i antioksidativne učinke, kao i polarizaciju M1 makrofaga. Osim pozitivnih učinaka, ostavlja se prostor razmatranja mogućnosti nekih oštećenja tkiva i organa zbog čega je uvelike važno voditi računa o dozi, mjestu injiciranja te osobitostima koje utječu na njegovu bioraspoloživost, ali i o otpornosti samog solidnog Ehrlichovog ascitesnog tumora. Osobito je važno voditi brigu i o primjenjenoj dozi cisplatine koja ostvaruje citotoksične učinke, kao i mogućnosti razvitka rezistencije tumorskih stanica na ovaj lijek.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

1. Obrada životinja nanokristalima resveratrola (u dozi 50 mg/kg) gastričnom kanilom pri hipertermalnim uvjetima (41°C) potiče rast tumora i vodi neznatno kraćem preživljavanju životinja u odnosu na kontrolu.
2. Višekratno injiciranje životinja s cisplatinom i izlaganje sustavnoj hipertermiji (41°C) značajno utječe na inhibiciju rasta tumora i povećanje životnog vijeka životinja za 47% u odnosu na kontrolnu skupinu.
3. Združeni učinak cisplatine s nanokristalima resveratrola pri hipertermalnim uvjetima vodi inhibiciji rasta tumora za 35%, ali ne pridonosi značajnom preživljavanju životinja; povećanje životnog vijeka (% ILS) u odnosu na kontrolu veće je za 20%.
4. Nanokristali resveratrola pri hipertermalnim uvjetima vode povećanju oksidacijskog stresa u stanicama bubrega, jetre i tumora na što ukazuje povećana razina MDA dok združeni učinak nanokristala resveratrola s cisplatinom i hipertermijom vodi smanjenoj razini MDA u bubregu ukazujući na zaštitni učinak resveratrola u prisutnosti cisplatine u tkivu bubrega.
5. Povećanje aktivnosti katalaze (CAT) nakon obrade nanokristalima resveratrola pri hipertermalnim uvjetima u bubregu i jetri ukazuje na povećan zaštitni odgovor na oksidacijski stres, dok kod stanica tumora CAT aktivnost je smanjena.
6. Obrada miševa s cisplatinom pri hipertermalnim uvjetima, ali i kombinacije cisplatine i nanokristalima resveratrola povećava CAT aktivnost u stanicama bubrega, jetre i tumora u odnosu na kontrolnu skupinu što ukazuje na povećani zaštitni odgovor na cisplatinom-inducirani oksidacijski stres.
7. Najveća razina GSH zapažena je u skupini obrađenoj cisplatinom i hipertermijom što je pokazatelj toksičnosti cisplatine.
8. Nanokristali resveratrola pri hipertermalnim uvjetima su značajno smanjili razinu NO u bubregu i jetri što može biti pokazatelj očuvanja elastičnosti i smanjene propusnosti krvnih žila te održavanja funkcionalne sposobnosti bubrega i jetre.
9. Kombinacija nanokristala, cisplatine i hipertermije znatno je povećala razinu NO kod tumora, ali i razinu arginaze kod bubrega kao pokazatelja remodeliranja tkiva nakon oštećenja s cisplatinom.
10. Temeljem dobivenih rezultata možemo zaključiti da nanokristali resveratrola mogu polučiti antioksidacije i/ili prooksidacijske učinke u različitim mikrookolišnim uvjetima, ali i sudjelovati u povećanju makrofagne plastičnosti i polarizacije te zaštititi bubreg i jetru od toksičnosti izazvane cisplatinom.

6. LITERATURA

1. Abd-Alhaseeb M.M., Zaitone S.A., Abou-El-Ela S.H., Moustafa Y.M. (2014): Olmesartan potentiates the anti-angiogenic effect of sorafenib in mice bearing Ehrlich's ascites carcinoma: role of angiotensin (1-7). *PLoS One*. 9(1): e85891.
2. Adams E.F., Newton C.J., Braunsberg H., Shaikh N., Ghilchik M., James V.H. (1988): Effects of human breast fibroblasts on growth and 17 beta-estradiol dehydrogenase activity of MCF-7 cells in culture. *Breast Cancer Research and Treatment* 11(2): 165–72.
3. Aggarwal B.B., Bhardwaj A., Aggarwal R.S., Seeram N.P., Shishodia S., Takada Y. (2004): Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. *Anticancer research* 24 (5A): 2783-2840.
4. Al-Majed A.A. (2007): Carnitine deficiency provokes cisplatin-induced hepatotoxicity in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 100(3): 145–150.
5. Amber K., Shiman M., Badiavas E. (2013): The Use of Antioxidants in Radiotherapy-Induced Skin Toxicity. *Integrative Cancer Therapies* 13(1): 38-45.
6. Baba A.I., Cătoi C. (2007): *Comparative Oncology*. The Publishing House of the Romanian Academy, Bucharest.
7. Bacac M., Stamenkovic I. (2008): Metastatic cancer cell. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* (1): 221–47.
8. Barja G. (2004): Free radicals and aging. *Trends in Neurosciences*. 27(10): 595-600.
9. Beck D.J., Brubaker R.R. (1973): Effect of cis-platinum(II)diamminodichloride on wild type and deoxyribonucleic acid repair deficient mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 116(3): 1247–1252.
10. Belotte J., Fletcher N.M., Awonuga A.O., Alexis M., Abu-Soud H.M., Saed M.G., Diamond M.P., Saed G.M. (2013): The Role of Oxidative Stress in the Development of Cisplatin Resistance in Epithelial Ovarian Cancer. *Reproductive Sciences* 21(4): 503–508.
11. Bottner M., Christoffel J., Jarry H., Wuttke W. (2006): Effects of long- term treatment with resveratrol and subcutaneous and oral estradiol administration on pituitary function in rats. *Journal of Endocrinology* 189(1): 77-88.

12. Boocock D.J., Faust G.E.S., Patel K.R., Schinas A.M., Brown V.A., Ducharme M.P., Booth T.D., 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.
13. Brozovic A., Ambriovic-Ristov A., Osmak M. (2010): The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Critical Reviews in Toxicology* 40(4): 347–359.
14. Burkon A., Somoza V. (2008): Quantification of free and protein-bound trans-resveratrol metabolites and identification of trans-resveratrol-C/O-conjugated diglucuronides - two novel resveratrol metabolites in human plasma. *Molecular Nutrition & Food Research* 52(5): 549–557.
15. Calabrese E.J., Mattson M.P., Calabrese V. (2010): Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance. *Human & Experimental Toxicology* 29(12): 980–1015.
16. Catalgol B., Batirel S., Taga Y., Ozer N.K. (2012): Resveratrol: French paradox revisited. *Frontiers in Pharmacology* 3: 141.
17. Carmeliet P., Jain R.K. (2000): Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407(6801): 249–57.
18. Caruso F., Tanski J., Villegas-Estrada A., Rossi M. (2004): Structural basis for antioxidant activity of trans-res-veratrol: ab initio calculations and crystal and molecular structure. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(24): 7279-7285.
19. Casey S.C., Amedei A., Aquilano K., Azmi A.S., Benencia F., Bhakta D., Bilsland A.E., Boosani C.S., Chen S., Ciriolo M. (2015): Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Bioogy* 35: 199–223.
20. Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Pérez J.M. (2007): Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 7(1): 3-18.

21. Chen D., Milacic V., Frezza M., Dou Q.P. (2009): Metal complexes, their cellular targets and potential for cancer therapy. *Current Pharmaceutical Design* 15(7): 777–791.
22. Chen X., Schluesener H.J. (2008): Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters* 176(1): 1–12.
23. Cordova-Gomez M., Galano A., Raul J., Al Varez-Ideaboy J.R. (2013): Piceatannol, a better peroxy radical scavenger than resveratrol. *RSC Advances* 3: 20209-20218.
24. Dagogo-Jack I., Shaw A.T. (2018): Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology* 15(2): 81–94.
25. Dandekar R.C., Kingaonkar A.V., Dhabekar G.S. (2011): Role of macrophages in malignancy. *Annals of Maxillofacial Surgery* 1(2): 150–154.
26. Dasari S., Tchounwou P.B. (2014): Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *The European Journal of Pharmacology* 0: 364-378.
27. Davidov-Pardo G., McClements D.J. (2015): Nutraceutical delivery systems: resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chemistry* 167: 205-212.
28. Delmas D., Aires V., Limagne E., Dutartre P., Mazue F., Ghiringhelli F., Latruffe N. (2011): Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Annals of the New York Academy Sciences* 1215(1): 48–59.
29. De Jongh F.E., Van Veen R.N., Veltman S.J., De W.R., Van der Burg M.E., Van den Bent M.J., Planting A.S., Graveland W.J., Stoter G., Verweij J. (2003): Weekly high-dose cisplatin is a feasible treatment option: analysis on prognostic factors for toxicity in 400 patients. *British Journal of Cancer* 88(8): 1199–1206.
30. De la Lastra C.A., Villegas I. (2007): Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: Mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions* 35(5): 1156–1160.
31. Desoize B., Madoulet C. (2002): Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42(3): 317–325.
32. Diplock A.T., Rice-Evans A.C., Burton R.Y. (1994): Is there a significant role of lipid peroxidation in the causation of malignancy and for antioxidants in cancer prevention? *Cancer Research* 54: 19525-19565.

33. Do Amaral C.L., Francescato H.D.C., Coimbra T.M., Costa R.S., Darin J.D.C., Antunes L.M.G., Bianchi M.D.L.P. (2007): Resveratrol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Archives of Toxicology* 82(6): 363–370.
34. Dreaden E.C., Alkilany A.M., Huang X., Murphy C.J., El-Sayed M.A. (2012): The golden age: gold nanoparticles for biomedicine *Chemical Society Reviews* 41(7): 2740-2779.
35. Droge W. (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82(1): 47-95.
36. Dvorakova M., Landa P. (2017): Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. *Pharmacological Research* 124: 126–145.
37. Eccles S.A., Welch D.R. (2007): Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *The Lancet* 369(9574): 1742–57.
38. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. (2003): The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 9(6): 669–76.
39. Field S.B., Hand J.W. (1990): An introduction to the practical aspects of clinical hyperthermia, Taylor&Francis, New York, Philadelphia.
40. Florea A.M., Busselberg D. (2011): Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanism of activity, drug resistance and induced side effects *Cancer* 3(1): 1351-71.
41. Folkman J. (1971): Tumor angiogenesis therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine* 285(21): 1182–6.
42. Foyer C. (2005): Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *The plant cell online* 17(7): 1866-1875.
43. Franckena M., Van der Wal E., Van der Zee J., Van Rhoon G. (2006): Randomised study on effect of 3d sar planning on temperature in target volume during deep hyperthermia treatment in patients with cervical cancer. 23rd ESHO Meeting Berlin.
44. Fraval H.N., Rawlings C.J., Roberts J.J.(1978): Increased sensitivity of UV-repair-deficient human cells to DNA bound platinum products which unlike thymine dimers are not

recognized by an endonuclease extracted from *Micrococcus luteus*. *Mutation Research* 51(1): 121–132.

45. Fukui M., Yamabe N., Kang K.S., Zhu B.T. (2010): Growth-stimulatory effect of resveratrol in human cancer cells. *Molecular Carcinogenesis* 49(8): 750-759.

46. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. (2002): Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* 2(1): 48–58.

47. Grabarević Ž. (2002): *Veterinarska onkologija*. DSK-FALCO, Zagreb.

48. Habash R.W., Bansal R., Krewski D., Alhafid H.T. (2006): Thermal therapy, part 1: An introduction to thermal therapy. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering* 34(6): 459-489.

49. Hahn GM. (1982): *Hyperthermia and cancer*, Plenum press, New York.

50. Halliwell B. (2007): *Biochemistry of Oxidative Stress*. *Biochemical Society Transactions* 35(5): 1147-50.

51. Halliwell B. (2011): Free radicals and antioxidants –quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences* 32(3): 125-130.

52. Hanahan D., Weinberg R.A. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57–70.

53. Hidelbrandt B., Wust P., Ahlers O., Dieing A., Sreenivasa G., Kerner T., Felix R., Riess H. (2002): The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 43(1): 33-56.

54. Hobbs S.K., Monsky W.L., Yuan F., Roberts W.G., Griffith L., Torchilin V.P., Jain R.K. (1998): Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(8): 4607-4612.

55. Iijima, S. (1991): Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354(6348): 56–58.

56. Iuga C., Alvarez- Idaboy J.R., Russo N. (2012): Antioxidant activity of trans- resveratrol toward hydroxyl and hydroperoxyl radicals: a quantum chemical and computational kinetics study. *The Journal of Organic Chemistry* 77(8): 3868- 3877.

57. Jalaja K., Naskar D., Kundu S.C, James N.R. (2016): Potential of electrospun core-shell structured gelatin-chitosan nanofibers for biomedical applications. *Carbohydrate polymers* 136: 1098-1107.
58. Jamieson E.R., Lippard S.J. (1999): Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chemical Reviews* 99(9): 2467-2498.
59. Jeevanandam J., Barhoum A., Chan Y.S., Dufresne A., Danquah M.K. (2018): Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 9: 1050-1074.
60. Juan M.E., Vinardell M.P., Planas J.M. (2002): The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *Journal of Nutrition* 132(2): 257-260.
61. Kampinga H.H., Konings A.W.T. (1987): Inhibition of repair of X-ray induced DNA damage by heat: the role of hyperthermia inhibition of DNA polymerase activity. *Radiation Research* 112(1): 86-98.
62. Kaplan E.L., Meier P. (1958): Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *The Journal of the American Statistical Association* 53: 457-481.
63. Kavas G.O., Ayral P.A., Elhan A.H. (2013): The effects of resveratrol on oxidant/antioxidant systems and their cofactors in rats. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 22(2): 151-155.
64. Kelland L. (2007): The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* 7(8): 573-584.
65. Kerbel R., Folkman J. (2002): Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature Reviews Cancer* 2(10): 727-739.
66. Kim J., Stolarska M.A., Othmer H.G. (2011): The role of the microenvironment in tumor growth and invasion. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 106(2): 353-379.
67. Kirkman H.N., Gaetani G.F. (2007): Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences* 32(1): 44-50.

68. Kohane D.S. (2007): Microparticles and nanoparticles for drug delivery. *Biotechnology and Bioengineering* 96(2): 203–209.
69. Ko J.H., Sethi G., Um J.Y., Shanmugam M.K., Arfuso F., Kumar A.P., Bishayee A., Ahn K.S. (2017): The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *The International Journal of Molecular Sciences* 18(12): 2589.
70. Kundu J.K., Surh Y.J. (2008): Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters* 269(2): 243-261.
71. Kuo I.M., Lee J.J., Wang Y.S., Chiang H.C., Huang C.C., Hsieh P.J., Han W., Ke C.H., Liao A.T.C., Lin C.S. (2020): Potential enhancement of host immunity and anti-tumor efficacy of nanoscale curcumin and resveratrol in colorectal cancers by modulated electro-hyperthermia. *BMC Cancer* 20(1): 603.
72. Lancon A., Delmas D., Osman H., Thenot J.P., Jannin B., Latruffe N. (2004): Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316(4): 1132–1137.
73. Lau A.H. (1999): Apoptosis caused by cisplatin nephrotoxic injury. *Kidney International* 56(4): 1259-1298.
74. Lebwohl D., Canetta R. (1998): Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: An historical perspective and an update. *The European Journal of Cancer* 34(10): 1522–1534.
75. Lee S.H., Jeong D., Han Y.S., Baek M.J. (2015): Pivotal role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor angiogenesis. *Annals of Surgical Treatment Research* 89(1): 1–8.
- 76: Lei X.G., Zhu J.H., Cheng W.H., Bao Y., Ho Y.S., Reddi A.R., Holmgren A., Arnér E.S.J. (2016): Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. *Physiological Review* 96(1): 307–364.
77. Li X., Liu R., Su X., Oan Y., Han X., Shao C., Shi Y. (2019): Harnessing tumor-associated macrophages as aids for cancer immunotherapy. *Molecular Cancer* 18: 177.

78. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2000): Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman, New York.
79. Lu S.C. (2009): Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine* 30(1-2): 42–59.
80. Ma X., Yu H. (2006): Global burden of cancer. *The Yale journal of biology and medicine* 79(3-4): 85–94.
81. Ma L., Li W., Wang R., Nan Y., Wang Q., Liu W., Jin F. (2015): Resveratrol enhanced anticancer effects of cisplatin on non-small cell lung cancer cell lines by inducing mitochondrial dysfunction and cell apoptosis. *International journal of oncology* 47(4): 1460-1468.
82. Maeda H., Nakamura H., Fang J. (2013): The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65(1): 71–79.
83. Mantel N., Haenszel W. (1959): Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *The Journal of the National Cancer Institute* 22(4): 719–748.
84. Martinelli C., Pucci C., Ciofani G. (2019): Nanostructured carriers as innovative tools for cancer diagnosis and therapy. *APL Bioengineering* 3(1): 011502.
85. Martinez J., Parker M.T., Fultz K.E., Ignatenko N.A., Gerner E. (2003): *Molecular biology of cancer. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery Sixth Edition*, Wiley and Sons, Inc. Publication, Arizona.
86. Melvold R.W., Sticca R.P. (2007): Basic and Tumor Immunology: A Review. *Surgical Oncology Clinics of North America*. 16(4): 711–735.
87. Minamoto T., Mai M., Ronai Z. (1999): Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis. *Carcinogenesis* 20(4): 519-527.
88. Mobasser S., Firoozi A. (2016): Review of Nanotechnology Applications in Science and Engineering. *Journal of Civil Engineering and Urbanism* 6(4): 84-93.

89. Navarro E., Piccapietra F., Wagner B., Marconi F., Kaegi R., Odzak N., Sigg L., Behra R. (2008): Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology* 42(23): 8959-8964.
90. Navya P.N., Daima H.K. (2016): Rational engineering of physicochemical properties of nanomaterials for biomedical applications with nanotoxicological perspectives. *Nano Convergence* 3(1): 1.
91. Ndiaye M., Kumar R., Ahmad N. (2011): Resveratrol in cancer management: where are we and where we go from here? *The Annals of the New York Academy of Sciences* 1215: 144-149.
92. Oliveira P.A., Colaco A., Chaves R., Guedes- Pinto H., De La Cruz L.F., Lopes C. (2008): Chemical carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 79(4): 593-616.
93. Orimo A., Weinberg R.A. (2006): Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 5(15): 1597–1601.
94. Oršolić N., Kunštić M., Kukolj M., Gračan R., Nemrava J. (2016): Oxidative stress, polarization of macrophages and tumour angiogenesis: Efficacy of caffeic acid. *Chemico-Biological Interactions* 256: 111–24.
95. Patel A. (2020): Benign vs malignant tumors. *JAMA Oncology* 6(9): 1488.
96. Pham-Huy L.A., He H., Pham- Huy C. (2008): Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science* 4(2): 89-9.
97. Prashant K.J., Ivan H.S. (2007): Au NPs target cancer. *Nano Today* 2: 19-29.
98. Rath M., Müller I., Kropf P., Closs E.I., Munder M. (2014): Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in Immunology* 5: 532.
99. Qureshi S.A., Lund A.C., Veierød M.B., Carlsen M.H., Blomhoff R., Andersen L.F., Ursin G. (2014): Food items contributing most to variation in antioxidant intake; a cross-sectional study among Norwegian women. *BMC Public Health* 14(1):45.
100. Renaud S., De Lorgeril M. (1992): Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* 339(8808): 1523–1526.

101. Robb E.L., Page M.M., Wiens B.E., Stuart J.A. (2008): Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 367(2): 406-412.
102. Rodriguez P.C., Quiceno D.G., Zabaleta J., Ortiz B., Zea A.H., Piazuelo M.B., Delgado A., Correa P., Brayer J., Sotomayor E.M., Antonia S., Ochoa J.B., Ochoa A.C. (2004): Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Research* 64(16): 5839-5849.
103. Rodriguez P.C., Ochoa A.C., Al-Khami A.A. (2017): Arginine metabolism in myeloid cells shapes innate and adaptive immunity. *Frontiers in Immunology* 8:93.
104. Rosenberg B., Vancamp I., Krigas T. (1965): Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205(4972): 698-699.
105. Saad S.Y., Najjar T.A., Alashari M. (2004): Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 31(12): 862–867.
106. Sahin E., Haubenwallner S., Kuttke M., Kollmann I., Halfmann A., Dohnal A.B., Chen L., Cheng P., Hoesel B., Einwallner E., Brunner J., Kral J.B., Schrottmaier W.C., Thell K., Saferding V., Blüml S., Schabbauer G. (2014): Macrophage PTEN regulates expression and secretion of arginase I modulating innate and adaptive immune responses. *Journal of Immunology* 193(4): 1717–27.
107. Sajid M., Ilyas M., Basheer C., Tariq M., Daud M., Baig N., Shehzad F. (2015): Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and prospects. *Environmental Science and Pollution Research* 22(6): 4122–4143.
108. Salehi B., Mishra A.P., Sharifi-Rad J. (2018): Resveratrol: A double-edged sword in health benefits. *Biomedicine* 6(3): 91.
109. Sarkar F.H., Li Y. (2006): Using chemopreventive agents to enhance the efficacy of cancer therapy. *Cancer Research* 66(7): 3347-3350.
110. Schreck R., Baeuerle D.A. (1991): A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell Biology* 1(2-3): 39-42.

111. Senderowicz A.M., Sausville E.A. (2000): Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *The Journal of the National Cancer Institute* 92(5): 376-387.
112. Shen S.Q., Zhang Y., Xiang J.J., Xiong C.L. (2007): Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes. *World Journal of Gastroenterology* 13(13): 1953–1961.
113. Shen D.W., Pouliot L.M., Hall M.D., Gottesman M.M. (2012): Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacological Reviews* 64(3): 706–721.
114. Shrivastava P., Luk K., Oleson J., Dewhirst M., Pajak T., Paliwal B., Perez C., Sapareto S., Saylor T. R., Steeves R. (1989): Hyperthermia quality assurance guidelines. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 16(3): 571-587.
115. Slater T.F. (1985): Free radical mechanism in tissue injury. *Biochemical Journal* 22(1) 1-15.
116. Shin W.K., Cho J., Kannan A.G., Lee Y.S., Kim D.W. (2016): Cross-linked composite gel polymer electrolyte using mesoporous methacrylate-functionalized SiO₂ nanoparticles for lithium-ion polymer batteries *Scientific Reports* 6(1): 26332.
117. Shukla Y., Singh R. (2011): Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *The Annals of the New York Academy of Sciences* 1215(1): 1-8.
118. Singh S.K., Makadia V., Sharma S., Rashid M., Shahi S., Mishra P.R., Wahajuddin M., Gayen J.R. (2017): Preparation and in-vitro/in-vivo characterization of trans-resveratrol nanocrystals for oral administration. *Drug Delivery and Translational Research* 7(3): 395–407.
119. Singh A., Ndiaye M.A., Ahmad N. (2015): Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1852(6): 1178-1185.
120. Sivanandam V. (2011): Free radicals in health and diseases. *Pharmacology online*. 1: 1062-1077.

121. Skitzki J.J., Repasky E.A., Evans S.S. (2009): Hyperthermia as an immunotherapy strategy for cancer. *Current Opinion in Investigational Drugs* 10(6):550-558.
122. Song C.W. (1984): Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment. *Cancer Research* 44:721-30.
123. Soni H., Kaminski D., Gangaraju R., Adebisi A. (2018): Cisplatin-induced oxidative stress stimulates renal Fas ligand shedding. *Renal Failure* 40(1): 314–322.
124. Srivastava R.K., Unterman T.G., Shankar S. (2010): FOXO transcription factors and VEGF neutralizing antibody enhance antiangiogenic effects of resveratrol. *Molecular and Cellular Biochemistry* 337(1-2): 201-212.
125. Sriwastava R.C., Farookh A., Ahmad N., Misra M., Hasan S.K., Husain M.M. (1995): Evidence for the involvement of nitric oxide in cisplatin-induced toxicity in rats. *Biometals* 9(2): 139-142.
126. Symons M.C.R., Rusakiewicz S., Rees R.C., Ahmad S.I. (2001): Hydrogen peroxide: a potent cytotoxic agent effective in causing cellular damage and used in the possible treatment for certain tumours. *Medical Hypotheses* 57(1): 56–58.
127. Šamija M., Vrdoljak E., Krajina Z. (2006): *Klinička onkologija*. Medicinska naklada, Zagreb.
128. Tan L., Wang W., He G., Kuick R.D., Gossner G., Kueck A.S., Whal H., Opiari A.W., Liu J.R. (2015): Resveratrol inhibits ovarian tumor growth in an in vivo mouse model. *Cancer* 122(5): 722–729.
129. Tandon V., Gupta B.M., Tandon R. (2005): Free radicals/Reactive oxygen species. *JK- Practitioner* 12(3): 143-148.
130. Turić M., Kolarić K., Eljuga D. (1996): *Klinička onkologija*. Nakladni zavod Globus, Zagreb.
131. Udenigwe C.C., Ramprasath V.R., Aluko R.E., Jones P.J.H. (2008): Potential of resveratrol in anticancer and anti- inflammatory therapy. *Nutrition Reviews* 66(8): 445-54.

132. Vahora H., Khan M.A., Alalami U., Hussain A. (2016): The Potential Role of Nitric Oxide in Halting Cancer Progression Through Chemoprevention. *The European Journal of Cancer Prevention* 21(1): 1-12.
133. Van den Ende W., Peshev D., De Gara L. (2011): Disease prevention by natural and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology* 22(12): 689- 697.
134. Van der Zee J. (2002): Heating the patient: a promising approach? *The Annals of Oncology* 13(8): 1173–1184.
135. Van Ginkel P.R., Sareen D., Subramanian L., Walker Q., Darjatmoko S.R., Lindstrom M.J., Kulkarni A., Albert D.M., Polans A.S. (2007): Resveratrol inhibits tumor growth of human neuroblastoma and mediates apoptosis by directly targeting mitochondria. *Clinical Cancer Research* 13(17): 5162–5169.
136. Varoni E.M., Lo Faro A.F., Sharifi-Rad J., Iriti M. (2016): Anticancer molecular mechanisms of resveratrol. *Frontiers in Nutrition* 3: 8.
137. Varvandier-Fasseur D., Latruffe N. (2019): The potential use of resveratrol for cancer prevention. *Molecules* 24(24):4506.
138. Victor V., Rocha M., De la Fuente M. (2004): Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis, *International Immunopharmacology* 4(3): 327-347.
139. Vitaglione P., Sforza S., Galaverna G., Ghidini C., Caporaso N., Vescovi P.P., Fogliano V., Marchelli R. (2005): Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Molecular Nutrition & Food Research* 49(5): 495–504.
140. Walle T., Hsieh F., DeLegge M.H., Oatis Jr J.E., Walle U.K. (2004): High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition* 32(12): 1377–1382.
141. Welch D.R., Hurst D.R. (2019): Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Research* 79(12): 3011-3027.
142. Wiesner M.R., Bottero J.Y. (2007): *Environmental Nanotechnology: Applications and Impacts of Nanomaterials*. McGraw-Hill New York, str. 395-444.

143. Williams L.D., Burdock G.A., Edwards J.A., Beck M., Bausch J. (2009): Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food and Chemical Toxicology* 47(9): 2170–2182.
144. Wong J.C., Fiscus R.R. (2015): Resveratrol at anti-angiogenesis/anticancer concentrations suppresses protein kinase G signaling and decreases IAPs expression in HUVECs. *Anticancer Research* 35(1): 273–81.
145. Wu G., Fang Y.Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D. (2004): Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition* 134(3): 489–492.
146. Xia T., Kovochich M., Liong M., Mädler L., Gilbert B., Shi H., Yeh J.I., Zink J.I., Nel A.E. (2008): Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano* 2(10): 2121–2134.
147. Xu W., Liu L., Loizidou M.A.M., Charles I.G. (2002): The role of nitric oxide in cancer. *Cell Research* 12(5-6): 311–320.
148. Yonemura Y., Fujimura T., Nishimura G., Falla R., Sawa T., Katayama K., Tsugawa T., Fushida S., Miyazaki M., Tanaka Y., Sasaki T. (1996): Effects of intraoperative chemohyperthermia in patients with gastric cancer with peritoneal dissemination. *Surgery* 119(4): 437-44.
149. Zhao J., Castranova V. (2011): Toxicology of nanomaterials used in nanomedicine. *The Journal of Toxicology and Environmental Health* 14(8): 593–632.
150. Zupančić S., Lavrić Z., Krist J. (2015): Stability and solubility of trans-resveratrol and strongly influenced by pH and temperature. *The European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 93: 196-204.

INTERNETSKI IZVOR:

<https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/griess-reagent-system-protocol.pdf?la=en> (pristupljeno 26.11.2020.)

ŽIVOTOPIS

Osobne informacije

Ime i prezime: Dragica Marinčić

Datum rođenja: 10.06.1997.

Obrazovanje

2018.-2021. Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek

Diplomski sveučilišni studij Molekularna biologija

2015.-2018. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

2011.-2015. Gimnazija Marka Marulića, Tomislavgrad

Laboratorijska stručna praksa

2019.

Prirodoslovno matematički fakultet, Zavod za animalnu fiziologiju, Zagreb

- pod voditeljstvom prof.dr.sc. Nade Oršolić i mr.sc. Dyane Odeh, *spec. techn. aliment*
- homogenizacija tkiva, spektrofotometrijske metode mjerenja parametara oksidacijskog stresa, mjerenje heat shock proteina, serotoninina te matriks metaloproteinaza ELISA metodom

Dodatno

- Sudjelovanje na smotri Sveučilišta Josip Juraj Strossmayer u Osijeku
- Sudjelovanje u projektu Biolog-i-ja u sklopu Odjela za biologiju
- Demonstrator na kolegiju Anatomija i histologija čovjeka

Publikacija

Krstin LJ.,Katanić Z., Pfeiffer Ž., Špoljarić Moronić D., Marinčić D., Martinović A., Štolfa Čamagajevac I. (2020): Phytotoxic effect of invasive species *Amorpha fruticosa* L. on germination and the early growth of forage and agricultural crop plants. *Ecological research*. 36:1.