

# Mogućnosti topikalne primjene resveratrola

---

Lukić, Ana

Professional thesis / Završni specijalistički

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:752647>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

**Ana Lukić**

**MOGUĆNOSTI TOPIKALNE PRIMJENE RESVERATROLA**

**Specijalistički rad**

Zagreb, 2017.

Poslijediplomski specijalistički studij: Dermatofarmacija i kozmetologija

Mentor rada: prof. dr. sc. Jelena Filipović-Grčić

Specijalistički rad obranjen je dana 20.01.2017. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu,  
Sveučilišta u Zagrebu pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević

2. prof. dr. sc. Jelena Filipović-Grčić

3. dr. sc. Marjana Dürrigl

Rad ima 151 list.

## **PREDGOVOR**

Ovaj specijalistički rad je prijavljen na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Jelene Filipović-Grčić.

Ovim putem se želim zahvaliti prof. dr. sc. Jeleni Filipović-Grčić na uloženom trudu, upornosti i strpljivosti prvo kao čovjeku, a zatim kao stručnoj osobi koja je svoje znanje i stručnost bez imalo ustručavanja prenijela nama mladima na najbolji mogući način. Osobito joj se želim zahvaliti što mi je u potpunosti izašla u susret i dala odlične savjete koji su me odveli u pravom smjeru tijekom izrade ovog specijalističkog rada.

Želim se zahvaliti obitelji Coner koja mi je omogućila upis poslijediplomskog specijalističkog studija Dermatofarmacija i kozmetologija. Veliko hvala magistri Ani i gospodinu Marijanu na pruženoj podršci i razumijevanju tijekom pohađanja studija te pruženoj prilici za daljnjim profesionalnim razvojem.

Posebno se zahvaljujem mojoj obitelji i bliskim prijateljima kojima posvećujem ovaj specijalistički rad.

# SAŽETAK

## Cilj istraživanja:

Cilj ovog rada bio je prikupiti znanstvena saznanja i prezentirati sustavni pregled o mogućnostima topikalne primjene različitih formulacija resveratrola s objektivnim i kritičkim osvrtom na provedena *in vitro* istraživanja na staničnim kulturama i *in vivo* istraživanja na animalnim modelima te eventualnim kliničkim studijama na ljudima. Također, cilj ovog rada je bio na temelju prikupljenih podataka odgovoriti na slijedeća pitanja:

1. Što možemo očekivati od molekule resveratrola: budući „multitarget“ lijek, dodatak prehrani za prevenciju bolesti ili oboje?
2. Na koji način se mogu poboljšati loša farmakokinetička svojstva groždanih polifenola, posebno resveratrola?
3. Može li topikalna primjena nanoformulacija resveratrola riješiti sve probleme farmakokinetike resveratrola?

## Materijali i metode:

Ciljana literaturna pretraga je provedena korištenjem konstruktivnih sintaksi na certificiranim i akreditiranim bazama podataka npr. Pubmed (Medline), Elsevier ScienceDirect, Scopus, Evolve, Knovel, Reaxys, ClinicalKey, Allied and Complementary Medicine Database, Natural Medicine Comprehensive Database, Embase i Cochrane Library, Human Metabolome Database, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes te ISI Web of Knowledge Science Citation Index Expanded i Phenol Explorer 2.0. Phenol Explorer je opsežna javno dostupna baza podataka pokrenuta 2009. godine čiji se podaci periodički ažuriraju. Literaturni pregled obuhvaća razdoblje do kolovoza 2016. i oslanja se na javnodostupne baze.

## **Rezultati:**

Bioraspoloživost topikalno primijenjenog resveratrola se može povećati primjenom poboljšivača permeacije u sustavu mikroemulzija i polimernih otopina, sintezom i/ili evaluacijom prolijekova resveratrola i konjugiranih metabolita resveratrola, kombiniranjem resveratrola s *in vivo* inhibitorima metabolizma resveratrola te primjenom nanotehnologije.

Najčešće nanočestice koje osiguravaju ciljanu dostavu resveratrola za oralnu i topikalnu primjenu su lipidne nanočestice (liposomi, etosomi, propilenglikol liposomi, niosomi, transferosomi, transetosomi, fitosomi, čvrste lipidne nanočestice i nanostrukturirani lipidni nosači te nanoemulzije) i polimerne nanočestice (ciklodekstrini, kuglice kalcijeva i cinkova pektinata, kitozanske nanočestice, nanočestice PLGA i PEG, nanosfere, nanokapsule, dendrimeri i polimerne micelle).

## **Zaključak:**

Loša farmakokinetička svojstva resveratrola se mogu poboljšati topikalnom primjenom nanočestica resveratrola te oralnom i topikalnom primjenom nanokapsula resveratrola koje sadrže kvercetin ili piperin kao inhibitore metabolizma resveratrola. Na temelju provedenih istraživanja, resveratrol se koristi kao adjuvantni kemoterapeutik jer posjeduje sinergistički učinak s kemoterapeuticima poput doksorubicina čime osigurava smanjenje potrebne doze i rizika od fatalnih nuspojava. Kako bi se u potpunosti iskoristio izuzetni farmakološki potencijal resveratrola kao standardnog kliničkog terapeutika, potrebno je provesti dugotrajne epidemiološke studije i kontrolirana klinička istraživanja s velikim brojem volontera.

## SUMMARY

### **Objectives:**

The aim of this study was to collect scientific knowledge and to present a systematic review of the possibilities of topical application of various formulations of resveratrol with objective and critical review of the research conducted *in vitro* on cell cultures and *in vivo* studies in animal models and eventual clinical trials in humans.

Also, the aim of this study was based on data collected to answer the following questions:

1. What can we expect from a molecule of resveratrol: since "multitarget" drug, dietary supplement for the prevention of disease, or both?
2. How can improve poor pharmacokinetic properties of grape polyphenols, especially resveratrol?
3. Can topical application of resveratrol nanoformulations solve all the problems pharmacokinetics of resveratrol?

### **Materials and methods:**

Targeted literature search was conducted using structural syntax to certified and accredited databases eg, PubMed (Medline), Elsevier ScienceDirect, Scopus, Evolve, Knovel, Reaxys, ClinicalKey, Allied and Complementary Medicine Database, Natural Medicine Comprehensive Database, Embase and the Cochrane Library, Human Metabolome Database, the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, and ISI Web of Knowledge Science Citation Index Expanded and Phenol Explorer 2.0. Phenol Explorer is a comprehensive public database launched in 2009, whose data is periodically updated. The literature review covers the period up to August 2016.

## **Results:**

The bioavailability of topically applied resveratrol can be increased using the permeation enhancers in the microemulsion system and polymer solutions, synthesis and/or evaluation of prodrugs of resveratrol and conjugated metabolites of resveratrol, combining resveratrol with *in vivo* inhibitors of metabolism of resveratrol and the application of nanotechnology.

The most common nanoparticles to provide for targeted delivery of resveratrol for oral and topical administration are the lipid nanoparticles (liposomes, ethosomes, propylene glycol liposomes, niosomes, transferosomes, transetosomes, phytosomes, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers and nanoemulsions) and polymeric nanoparticles (cyclodextrins, beads of calcium and zinc pectinate, chitosan nanoparticles, nanoparticles of PLGA and PEG, nanospheres, nanocapsules, micelles and dendrimers).

## **Conclusion:**

Poor pharmacokinetic properties of resveratrol can be improved by topical application of nanoparticles and oral resveratrol and resveratrol topical application of nanocapsules containing piperine, quercetin, or as inhibitors of the metabolism of resveratrol. Based on the research, resveratrol is used as adjuvant chemotherapy because it has a synergistic effect with chemotherapeutic agents such as doxorubicin, which ensures reduction in the required dose and risk of fatal side effects. In order to fully utilize the exceptional pharmacological potential of resveratrol as a standard clinical therapeutics, it is necessary to conduct long-term epidemiological studies and controlled clinical trials with a large number of volunteers.



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>4</b>
1.1. GROŽĐE KAO PRIRODNI IZVOR POLIFENOLA.....	5
1.1.1. PODJELA GROŽĐANIH FENOLA .....	7
1.1.1.1. FENOLNE KISELINE.....	8
1.1.1.2. NEFLAVONOIDNI POLIFENOLI .....	9
1.1.1.1.1. STILBENI.....	9
1.1.1.2.1. VINIFERINI .....	10
1.1.1.3. FLAVONOIDI .....	11
1.1.1.3.1. ANTOCIJANI.....	12
1.1.1.3.2. FLAVAN-3-OLI .....	14
1.1.1.3.3. FLAVONOLI.....	16
1.1.2. BIOSINTEZA GROŽĐANIH FENOLA .....	17
1.1.2.1. UTJECAJ OKOLIŠNIH ČIMBENIKA NA BIOSINTEZU GROŽĐANIH FENOLA	18
1.1.3. IZOLACIJA GROŽĐANIH FENOLA .....	19
1.2. RESVERATROL .....	21
1.2.1. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA.....	23
1.2.2. FARMAKOLOŠKI UČINCI RESVERATROLA .....	25
1.2.2.1. KARDIOPROTEKTIVNI UČINAK.....	27
1.2.2.2. NEUROPROTEKTIVNI UČINAK .....	29
1.2.2.3. ANTIMIKROBNI UČINAK.....	30
1.2.2.4. ANTIDIJABETIČKI UČINAK.....	32
1.2.2.4.1. UČINAK NA CIJELJENJE RANE .....	33
1.2.2.5. ANTIKANCEROGENI UČINAK .....	34
1.2.2.5.1. OKSIDACIJSKI STRES I LIPIDNA PEROKSIDACIJA .....	36
1.2.2.5.1.1. MEHANIZMI ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA .....	37
1.2.2.5.1.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST .....	39

1.2.2.5.1.3.	ANTIOKSIDACIJSKA HIPOTEZA KEMOPREVENCIJE .....	40
1.2.2.5.2.	UPALA .....	42
1.2.2.5.3.	APOPTOZA.....	44
1.2.2.5.3.1.	HIPERPROLIFERACIJSKI KOŽNI POREMEĆAJI.....	47
1.2.2.5.4.	INHIBICIJA KANCEROGENA .....	49
1.2.2.5.5.	INVAZIJA, ANGIOGENEZA I METASTAZIRANJE .....	50
1.2.2.5.6.	RESVERATROL I ESTROGEN.....	52
1.2.2.5.7.	INHIBICIJA GLIKOLITIČKIH ENZIMA.....	54
1.2.2.5.8.	RESVERATROL U KOMBINACIJSKOJ KEMOTERAPIJI .....	55
1.2.2.6.	STARENJE KOŽE .....	57
1.2.2.6.1.	FOTOKANCEROGENEZA .....	59
1.2.2.6.2.	HIPERPIGMENTACIJE .....	67
1.2.2.6.3.	SIRTUINI .....	73
1.2.3.	FARMAKOKINETIKA RESVERATROLA.....	78
1.2.3.1.	APSORPCIJA.....	80
1.2.3.2.	DISTRIBUCIJA .....	80
1.2.3.3.	METABOLIZAM.....	80
1.2.3.4.	ELIMINACIJA.....	83
1.2.4.	INTERAKCIJE .....	84
1.2.5.	TOKSIKOLOGIJA.....	86
1.2.6.	KLINIČKE STUDIJE .....	87
<b>2.</b>	<b>CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>91</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>92</b>
<b>4.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>93</b>
4.1.	PRISTUPI ZA POVEĆANJE BIORASPOLOŽIVOSTI RESVERATROLA.....	93
4.1.1.	TOPIKALNA PRIMJENA RESVERATROLA .....	94
4.1.1.1.	PENETRACIJA I PERMEACIJA RESVERATROLA .....	96
4.1.1.2.	MIKROEMULZIJE.....	99
4.1.2.	NANOTEHNOLOGIJA .....	102

4.1.2.1.	LIPIDNE NANOČESTICE .....	104
4.1.2.1.1.	VEZIKULARNE NANOČESTICE .....	104
4.1.2.1.1.1.	FOSFOLIPIDNE VEZIKULE .....	104
4.1.2.1.1.2.	NIOSOMI .....	111
4.1.2.1.1.3.	FITOSOMI .....	113
4.1.2.1.2.	ČVRSTE LIPIDNE NANOČESTICE .....	114
4.1.2.1.3.	NANOSUSPENZIJE .....	118
4.1.2.2.	POLIMERNE NANOČESTICE .....	120
4.1.2.2.1.	PEKTINI .....	122
4.1.2.2.2.	KITIZAN .....	124
4.1.2.2.3.	CIKLODEKSTRINI .....	130
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>134</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>135</b>
<b>7.</b>	<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>151</b>

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Groždani polifenoli, izolirani iz grožđanih bobica i ostalih dijelova vinove loze, su atraktivni aktivni sastojci dermatokozmetičkih i farmaceutskih proizvoda koji privlače pozornost posljednjih godina u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji zbog svojih povoljnih učinaka na ljudsko zdravlje. Oni uključuju antioksidacijski, antitumorski, protuupalni, antimikrobni i anti-age učinak te neuroprotektivni i kardioprotektivni učinak.

Pozitivni učinci grožđanih polifenola osobito resveratrola su 1990. godine opisani kao tzv. francuski paradoks odnosno fenomen smanjenja mortaliteta Francuza zbog smanjene učestalosti kardiovaskularnih bolesti te raka. Njihov antioksidacijski učinak je iznimno važan u smanjenju oksidacijskog stresa koji je glavni uzročnik kroničnih bolesti poput raka, dijabetesa, hipertenzije, kardiovaskularnih bolesti i ekstrinzičnog starenja kože.

Groždani polifenoli su prirodni antioksidansi koji inhibiraju oksidacijske lančane reakcije u koži i preveniraju neke kožne bolesti i prijevremeno starenje. Primjerice, proantocijanidini iz grožđanih sjemenki djeluju preventivno na fotokancerogenezu uzrokovanu prekomjernim izlaganjem kože UV zračenju.

*In vitro* primjena ekstrakta grožđanih sjemenki na normalnim humanim epidermalnim keratinocitima inhibira UV inducirani oksidacijski stres koji je posredovan aktivacijom MAPK i NF- $\kappa$ B signalnih puteva. Isto tako, GSE inhibira aktivnost proteaza odgovornih za razgradnju proteina kože poput kolagena i elastina koji koži osiguravaju čvrstoću i elastičnost.

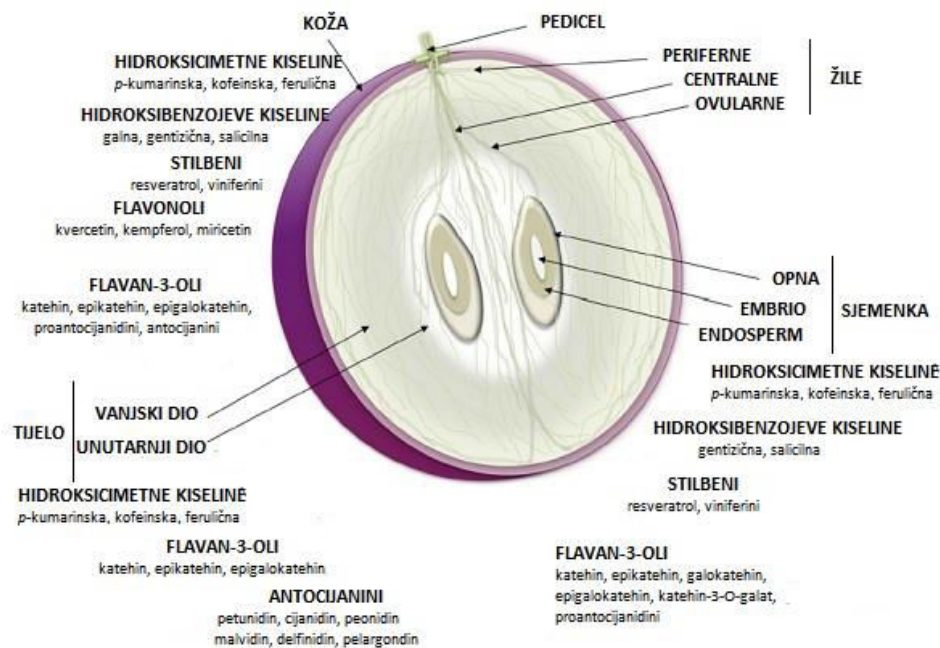
Polifenoli su potencijalni anti-aging kozmetički sastojci jer mogu penetrirati kroz *stratum corneum* do vijabilnog epidermisa i/ili dermisa gdje ostvaruju svoj učinak koji je posredovan povećanjem ekspresije sirtuina tzv. molekula dugovječnosti.

## 1.1. GROŽĐE KAO PRIRODNI IZVOR POLIFENOLA

Grožđe predstavlja bogat izvor sekundarnih metabolita. Kvalitativni i kvantitativni sastav groždanih polifenola ovisi o varijetetu vinove loze, okolišnim i klimatološkim čimbenicima te enološkoj praksi.

Groždani polifenoli su uglavnom lokalizirani u groždanoj bobici te manjim dijelom u trsu vinove loze. Ukupna koncentracija fenolnih tvari odnosno ekvivalenata galne kiseline u groždanoj bobici se smanjuje u slijedećem nizu: sjemenke > kožica > tijelo. Najučestaliji flavonoidi (28 – 35 %) prisutni u groždanoj kožici su antocijani, proantocijanidini te flavan-3-oli i flavonoli [1].

Groždane sjemenke čini kompleksni matriks koji se sastoji od 40 % vlakana, 16 % ulja, 14 % proteina i 7 % kompleksnih fenola uključujući tanine. Groždane sjemenke sadrže 60 – 70 % groždanih polifenola koje najčešće čine monomeri flavan-3-ola poput (+)-katehina, (-)-epikatehina i (-)-epikatehin-3-O-galata te dimeri, trimeri i tetrameri proantocijanidina. Oni pokazuju značajni antioksidacijski i antimikrobni kapacitet koji ovisi o njihovom kvalitativnom i kvantitativnom sastavu.



Slika 1: Grada groždane bobice s prikazom lokalizacije groždanih fenola (prilagođeno prema [2])

Ulje groždanih sjemenki se dobiva postupkom hladnog prešanja kako bi se zadržala njegova visoka antioksidacijska aktivnost. Sastav ulja groždanih sjemenki ovisi o varijetetu vinove loze, a najčešće sadrži 10 – 16 % suhe tvari. Nutritivna svojstva ulja groždanih sjemenki poput odsutnosti kolesterola, niskog sadržaja zasićenih masnih kiselina, visokog sadržaja nezasićenih masnih kiselina (82,35 %) te vitamina E i drugih antioksidansa čine ga visokokvalitetnim prehranbenim uljem. Ono također predstavlja dobar izbor za prženje hrane zbog visoke točke dimljenja (252 °C). Niski peroksidni broj (0,95 meqO<sub>2</sub>/kg ulja) ukazuje na stabilnost ulja. Ulje groždanih sjemenki se može kategorizirati kao suho ulje zbog visoke vrijednosti jodnog broja (165,5 g/100 g).

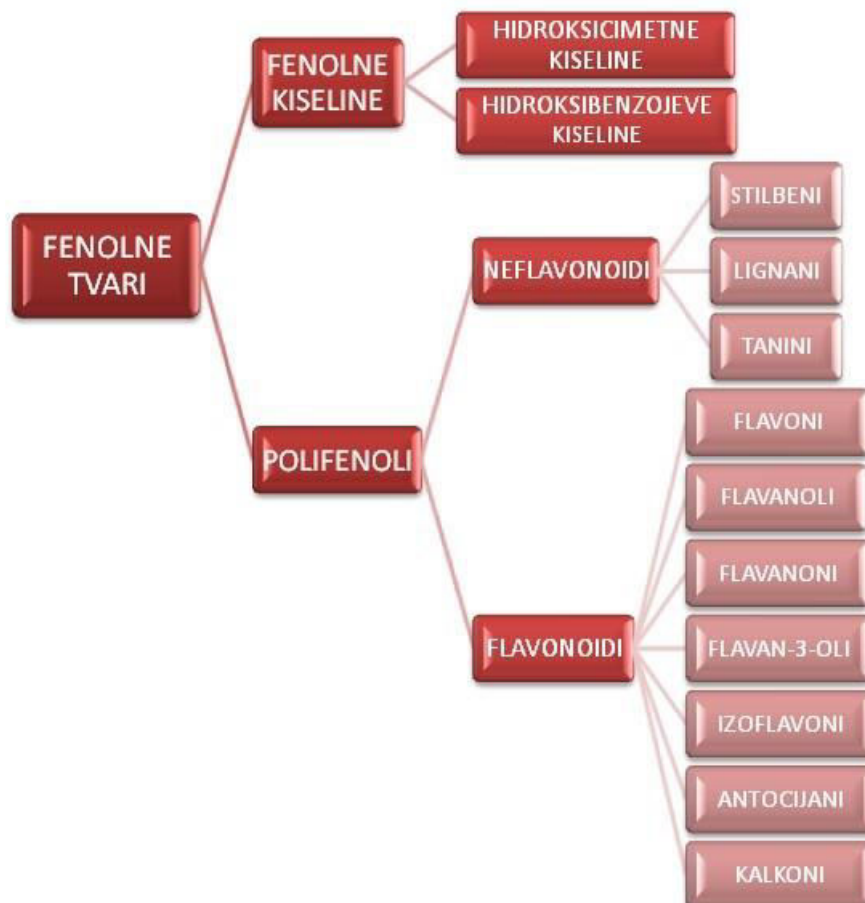
Nezasićene masne kiseline najčešće prisutne u ulju groždanih sjemenki su oleinska kiselina (18:1) i esencijalna linolenska kiselina (18:2). S obzirom na bogat sadržaj masnih kiselina, ulje groždanih sjemenki se vrlo često primjenjuje za obnovu oštećene kože te smanjenje znakova bora, celulita i strija. Ulje groždanih sjemenki se vrlo često koristi kao aktivna tvar u dermokozmetičkim proizvodima s anti-age učinkom zbog njegovog antioksidacijskog i hidratacijskog učinka na kožu te u aromaterapiji [3, 4].

**Tablica 1: Fizikalno-kemijska svojstva ulja groždanih sjemenki (prilagođeno prema [3])**

<b>FIZIKALNO-KEMIJSKO SVOJSTVO</b>	<b>VRIJEDNOST</b>
<b>refraktivni indeks 20 °C</b>	1,4731
<b>specifična težina 20 °C (kg/dm<sup>3</sup>)</b>	0,8965
<b>slobodne masne kiseline (%)</b>	2,65
<b>peroksidni broj (meqO<sub>2</sub>/kg)</b>	0,95
<b>ukupni oksidacijski broj (TOTOX)</b>	5,01
<b>jodni broj (g/100 g)</b>	165,5
<b>saponifikacijski broj (mg KOH/g)</b>	192,21
<b>tokoferoli</b>	44,50

## 1.1.1. PODJELA GROŽĐANIH FENOLA

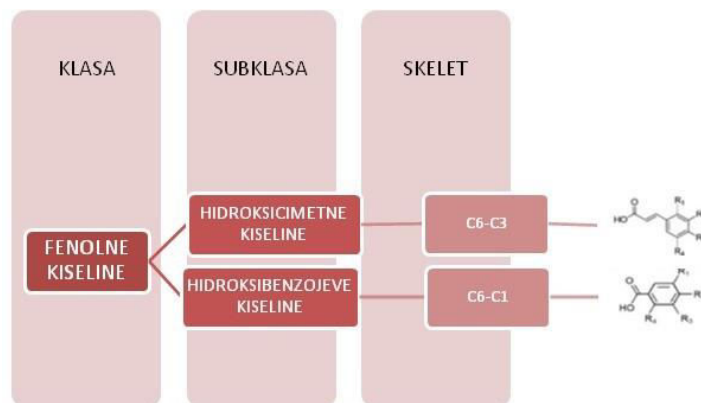
Profil groždanih fenola utječe na antioksidacijska i organoleptička svojstva (boja, aroma, trpkost, gorčina) grožđa i njegovih produkata. Groždani polifenoli su molekule čiju okosnicu čini hidroksibenzenski prsten na koji mogu biti vezane hidroksilne ili druge funkcionalne skupine. Ovisno o primarnoj kemijskoj strukturi hidroksibenzenskog prstena, razlikuje se neflavonoidna i flavonoidna skupina groždanih polifenola.



Slika 2: Klasifikacija fenolnih tvari (prilagođeno prema [46])

### 1.1.1.1. FENOLNE KISELINE

Fenolne kiseline imaju važnu ulogu u razvoju gorčine i trpkosti vina. To su fenoli koji sadrže jednu funkcionalnu skupinu karboksilne kiseline, a u prirodi se mogu nalaziti u slobodnom i vezanom obliku. Fenolne kiseline se mogu podijeliti na hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline te njihove derivate. Razlikuju se po broju i poziciji hidroksilnih i metoksilnih skupina vezanih na aromatski prsten [5].



Slika 3: Podjela fenolnih kiselina (prilagođeno prema [89])

Hidroksicinatami su, nakon proantocijanidina i antocijana, najčešći topljivi fenoli u grožđu koji pridonose smeđoj boji nakon oksidacije. Iako su prisutni u svim biljnim tkivima, najčešće se nakupljaju u kožici groždanih bobica i to kao *trans*-stereoizomeri, a u pulpi mogu biti konjugirani s antocijanima ili glukozom. Hidroksicimetne kiseline su vinilni analozi hidroksibenzojevih kiselina koji imaju postranični lanac s tri ugljikova atoma (C6-C3). Kombinacijom klorogenske i kofeinske kiseline s tartaričnom kiselinom mogu nastati kaftarična, *p*-kutarična i ferulična kiselina. Njihov je sadržaj stalan, a koncentracija se smanjuje sazrijevanjem zbog povećanja bobice. Sadržaj ukupnih hidroksicimetnih kiselina izražava se kao miligrami ekvivalenata kavene kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg CAE/g).

Hidroksibenzojeve kiseline imaju zajedničku C1-C6 okosnicu, a uključuju galnu kiselinu, *p*-hidroksibenzojevu, protokatehuidnu, vanilinsku i siringičnu kiselinu. Nalaze se najčešće u obliku glukozida i to u mnogo nižim koncentracijama u odnosu na hidroksicimetne kiseline [5].



## 1.1.1.2. NEFLAVONOIDNI POLIFENOLI

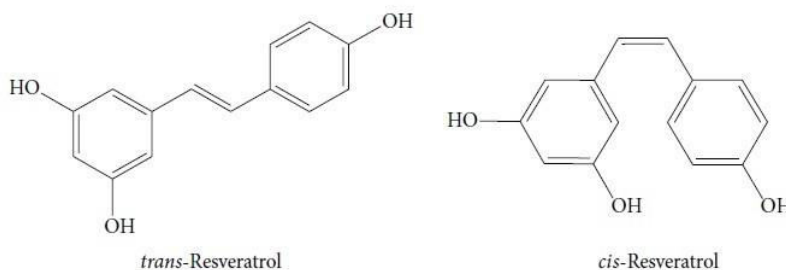
Neflavonoidni polifenoli nalaze se u malim koncentracijama u grožđu i vinu, a čine ih skupine hidrolizabilnih tanina (elagitanini), hlapljivih fenola i stilbena koje sadrže okosnicu C6-C2-C6.

### 1.1.1.1.1. STILBENI

Stilbeni su groždani fitoaleksini, sekundarni biljni metaboliti koji se sintetiziraju kao odgovor na stresne uvjete poput sunčeva zračenja, djelovanja egzogenih kemikalija ili gljivičnih infekcija. Osnovnu kemijsku strukturu ovih fenilpropanoida čini *trans*- $\alpha$ -1,2-difeniletilenski kostur.

Glavni stilbeni su *cis*-resveratrol i *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben), piceid (resveratrol-3-O- $\beta$ -D-glukopiranozid), piceatanol (3,3',4,5-tetrahidroksistilben) i dimeri resveratrola (viniferini).

Resveratrol se, u biljnom svijetu, pojavljuje u obliku dva stereoizomera: *cis* (*Z*)-resveratrol i *trans* (*E*)-resveratrol. *Trans*-resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) je stabilniji izomer s najjednostavnijom molekulskom strukturom. Oligomerizacijom stilbena nastaju dimeri, trimeri i tetrameri resveratrola.



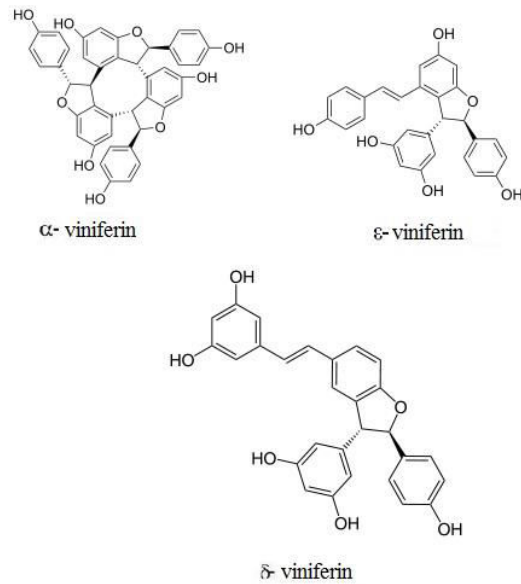
**Slika 4: Kemijska struktura *trans*-resveratrola i *cis*-resveratrola (prilagođeno prema [18])**

Piceatanol (3,3',4,5-tetrahidroksistilben) može djelovati kao prolijek jer sadrži dodatnu aromatsku hidroksilnu skupinu koja nastaje kao rezultat hidroksilacije *trans*-resveratrola u ljudskoj jetri. Piceatanol posjeduje antileukemijsku aktivnost [7].

Glikozilacijom resveratrola nastaje piceid (resveratrol-3-O- $\beta$ -D-glukopiranozid), a glikozilacijom piceatanola nastaje astringin (piceatanol-3-O- $\beta$ -D-glukozid). Metilacijom resveratrola nastaje pterostilben (3,4-dimetoksi-4'-hidroksistilben) koji djeluje kao antileukemik. Hopefenol je tetramer resveratrola koji nastaje iz resveratrola preko dimera  $\epsilon$ -viniferina oksidacijom kataliziranom peroksidazama [8].

### 1.1.1.2.1. VINIFERINI

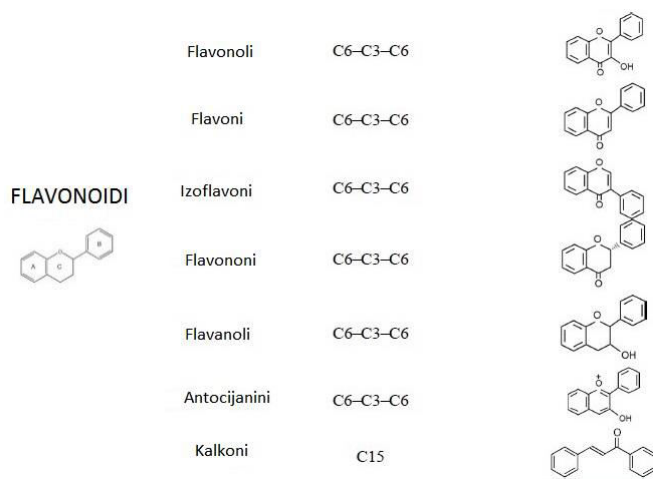
Viniferini su produkti oksidacije resveratrola 4-hidroksistolben peroksidazama koji imaju dokazani antioksidacijski, protuupalni, antiproliferacijski i antitumorski učinak. Najvažniji viniferini su  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - i  $\epsilon$ -viniferini sastavljeni od cikličkih oligomera resveratrola.



Slika 5: Kemijska struktura viniferina (prilagođeno prema [9])

### 1.1.1.3. FLAVONOIDI

Skupinu groždanih flavonoida čine flavonoli, flavonoli, flavononi, flavan-3-oli, izoflavoni, antocijani i proantocijanidini.

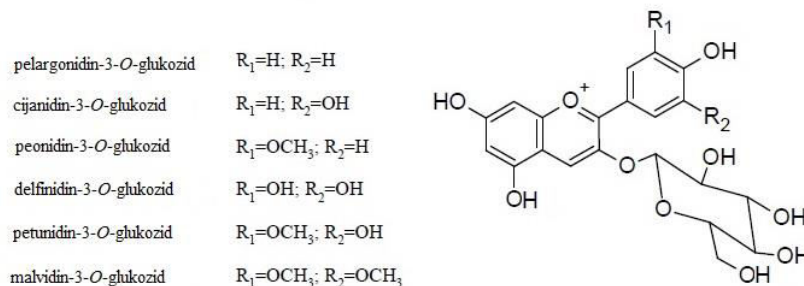


Slika 6: Kemijska podjela flavonoida (prilagođeno prema [5])

Flavonoidi imaju karakterističnu C6-C3-C6 strukturu sa šesteročlanim kisikovim heterociklom i dva fenolna prstena povezana centralnim piranskim prstenom koji sadrži kisik. Kation sadrži dvije dvostruke veze u prstenu C. Ovisno o oksidacijskom stupnju heterocikličkog prstena, groždani flavonoidi se klasificiraju u tri strukturne skupine antocijana, flavan-3-ola i flavonola [6].

### 1.1.1.3.1. ANTOCIJANI

Antocijani su flavonoidni pigmenti topljivi u vodi koji posjeduju antioksidacijski, antimikrobni, fotozaštitni, antikancerogeni i kardioprotektivni učinak, a široko se primjenjuju u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Antocijani su glikozilirani derivati 2-fenilbenzopirilium kationa (tzv. flavilium kation) koji nastaju supstitucijom jedne ili više šećernih jedinica u aglikonu (antocijanidinu) na poziciji 3 prstena C i poziciji 5 i 7 prstena A. Aglikoni (antocijanidini) se razlikuju prema broju i poziciji hidroksilnih odnosno metoksilnih skupina na flavilium kationu koji ima tipični C6-C3-C6 flavonoidni skelet [6, 10].

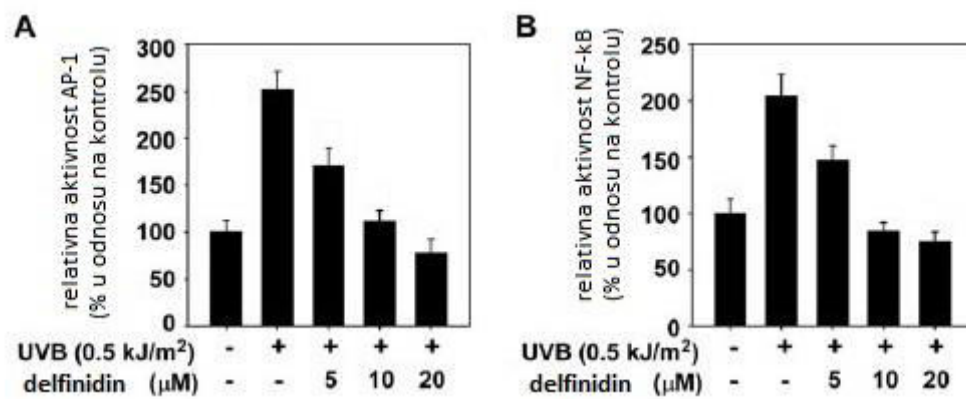


**Slika 7: Kemijska struktura antocijana (prilagodeno prema [11])**

Najčešći antocijanidin je malvidin koji ima najveću antioksidacijsku aktivnost antocijana, zatim slijede delfinidin, cijanidin, petunidin, peonidin i u manjoj količini pelargonidin.

Antocijani doprinose organoleptičkim karakteristikama vina te su odgovorni za crvenu, ljubičastu i plavu pigmentaciju vina i grožđa zbog prisutnosti flavilium kationa, nositelja pigmentacije koji je osjetljiv na promjenu pH i prisutnost ostalih tvari poput metalnih iona. Antocijani s više slobodnih hidroksilnih skupina imaju jaču plavu boju, a antocijani s metiliranim hidroksilnim skupinama imaju crvenu boju zbog učinka delokaliziranih elektrona.

Potencijalna zaštitna uloga delfinidina u UVB posredovanoj kožnoj kancerogenezi je dokazana *in vivo* istraživanjima supresijom ekspresije COX-2 preko direktne inhibicije MAPKK4 i PI3K. Delfinidin u koncentraciji 5 – 20  $\mu$ M smanjuje UVB induciranu ekspresiju ciklooksigenaze u JB6 P+ mišjim epidermalnim stanicama bez učinka na staničnu vijabilnost. Pri netoksičnim koncentracijama smanjuje promotersku aktivnost COX-2 i sintezu prostaglandina te sprečava UVB posredovanu aktivaciju AP-1 i NF- $\kappa$ B, transkripcijskih faktora uključenih u ekspresiju COX-2. Antipromocijskim i protuupalnim svojstvima delfinidina doprinosi inhibicija UVB inducirane fosforilacije JNK, p38 kinaze i Akt [12].



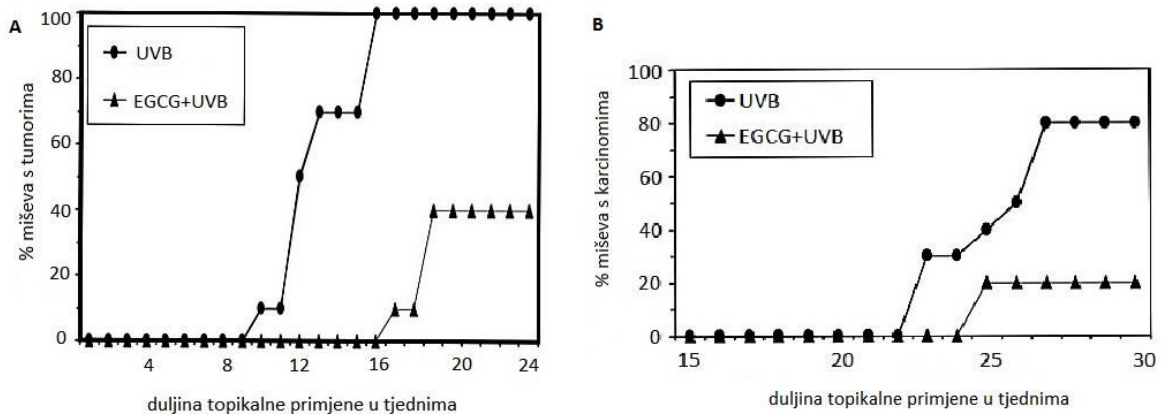
**Slika 8: Učinak topikalne primjene delfinidina na aktivnost AP-1 i NF-κB nakon izlaganja JBP6+ mišjih epidermalnih stanica UVB zračenju (prilagođeno prema [12])**

### 1.1.1.3.2. FLAVAN-3-OLI

Flavan-3-oli imaju potpuno zasićeni heterociklički prsten koji može biti esterificiran na 3-hidroksilnoj skupini. Čine ih monomerne (katehini) ili polimerne strukture poznate kao proantocijanidini ili kondenzirani tanini. One obuhvaćaju (+)-katehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin, (-)-epigalokatehin i katehin-3-O-galat. Sadržaj proantocijanidina se izražava kao miligrami ekvivalenata katehina (engl. *catechin equivalents*, CE) po gramu suhe tvari (mg CE/g) [10, 13].

Topikalna primjena hidrofilne kreme koja sadrži epigalokatehin-3-O-galat (1 mg/cm<sup>2</sup>) *in vivo* u SKH-1 miševa uzrokuje:

1. inhibiciju UVB induciranog oksidacijskog stresa i inhibiciju fosforilacije MAPK proteina
2. smanjenje UV inducirane tumorigeneze u usporedbi s miševima koji su izloženi UV zračenju kroz 30 tjedana, ali bez primjene EGCG i to:
  - a. smanjena učestalost tumora za 60 %
  - b. smanjena raznovrsnost tumora za 86 %
3. smanjenje maligne transformacije benignih papiloma u karcinome za 78 % koja se pojavljuje u 23. tjednu promocije tumora



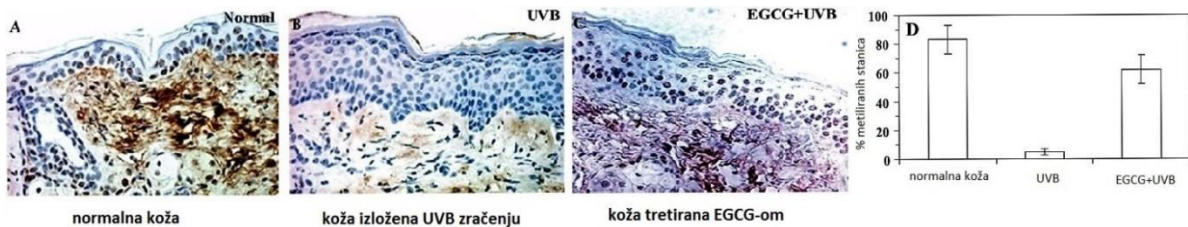
**Slika 9: Učinak topikalne primjene EGCG na smanjenje učestalosti tumora (Slika 9A) i smanjenje maligne transformacije benignih papiloma u karcinome (Slika 9 B) (prilagođeno prema [14])**

4. smanjenje veličine tumora za 88 %
5. inhibiciju UVB induciranog edema i inhibiciju infiltracije leukocita



**Slika 10: Topikalna primjena EGCG u hidrofilnoj kremi inhibira UVB inducirane biokemijske promjene u koži SKH-1 miševa (prilagođeno prema [14])**

6. inhibiciju UVB inducirane DNA hipometilacije za 69 %



**Slika 11: Učinak topikalne primjene EGCG na inhibiciju UVB inducirane DNA hipometilacije (prilagođeno prema [14])**

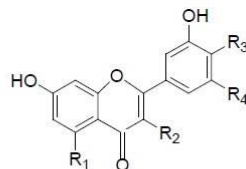
7. smanjenje UVB inducirane delecije DNA metiltransferaze (DNMT) za 57 %.

Dugotrajna topikalna primjena hidrofilne kreme s EGCG-om nije pokazala toksične učinke. Nema značajne razlike u ukupnoj mineralnoj gustoći i ukupnom mineralnom sadržaju kostiju, ali je zabilježena značajna redukcija sadržaja ukupnog masnog tkiva (21 – 25 %). EGCG ostvaruje svoje anti-aging učinke na kožu inhibicijom ekspresije MMP-1 u ljudskim fibroblastima stimuliranim toplinom [14, 15].

### 1.1.1.3.3. FLAVONOLI

Flavonoli su ubikvitarni žuti pigmenti koji izravno doprinose pigmentaciji bijelih i crvenih vina. U crvenim vinima su maskirani tamnije obojenim antocijanima. Sadržaj flavonola izražava se kao miligrami ekvivalenata kvercetina (engl. *quercetin equivalents*, *QE*) po gramu suhe tvari (mg QE/g).

Flavonoli su skupina flavonoida čiju okosnicu čini struktura 3-hidroksiflavona. Međusobno se razlikuju po broju i vrsti supstituenata na prstenu B te se pojavljuju u obliku glukozida, galaktozida, ramnozida i glukuronida. Flavonoli mogu biti prisutni u obliku 3-O-glikozida u kožici groždanih bobica ili aglikona u vinima i sokovima kao rezultat kisele hidrolize tijekom skladištenja. Biološka aktivnost flavonoida je strogo određena stupnjem glikozilacije, tipom šećernih ostataka i acilnom esterifikacijom.



flavonoli

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
kvercetin	OH	OH	OH	-
rutin	OH	O-rutinoza	OH	-
morin	OH	OH	-	OH
miricetin	OH	OH	OH	OH
fisetin	OH	OH	OH	-

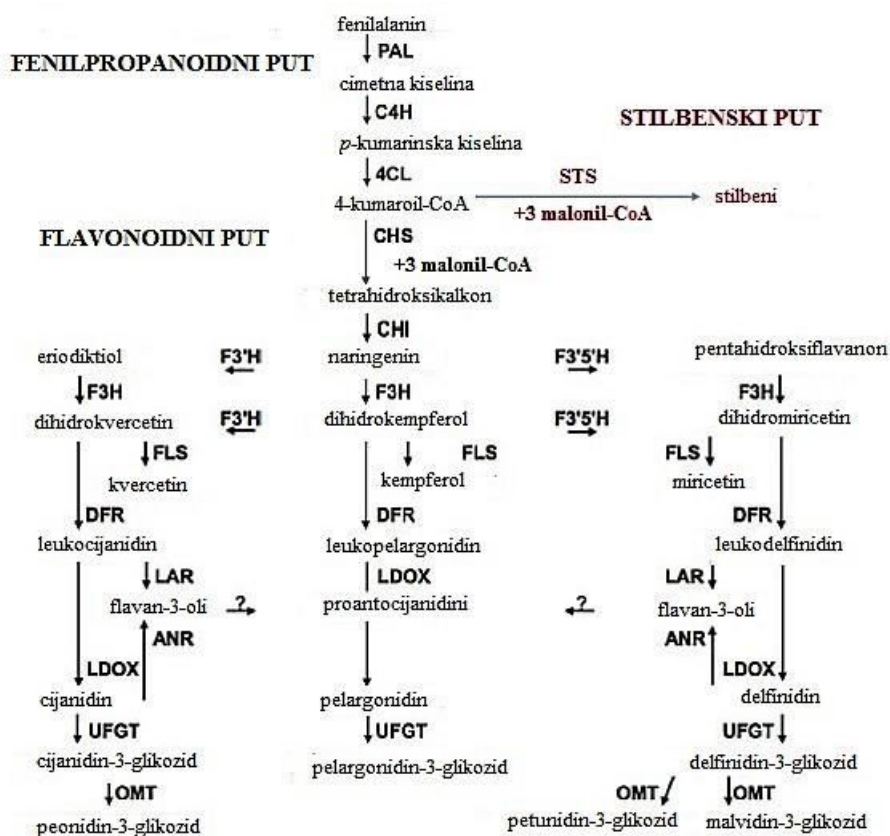
**Slika 12: Kemijska struktura flavonola (prilagođeno prema [1])**

Flavonoli prisutni u kultivarima crvenog grožđa su kempferol, kvercetin, izoramnetin, miricetin, laricitrin i siringetin od kojih prevladavaju kvercetin i miricetin u crvenom grožđu te kvercetin u bijelom grožđu. Glukozidi kvercetina se učinkovitije apsorbiraju od samog kvercetina. Biodostupnost rutina je 20 % iako se slabije apsorbira od kvercetina. Zabilježena je vrlo visoka interindividualna varijabilnost vjerojatno zbog polimorfizma intestinalnih enzima ili transportera [6, 16].



## 1.1.2. BIOSINTEZA GROŽĐANIH FENOLA

Biosintetski put biljnih polifenola obuhvaća dva metabolička puta: put šikimske kiseline i put octene kiseline. Produkti puta šikimske kiseline su fenilpropanoidi, a produkti puta octene kiseline su jednostavni fenoli. Sve fenolne tvari se sintetiziraju fenilpropanoidnim biosintetskim putem iz aminokiseline fenilalanina. Fenilalanin je produkt biosintetskog puta šikimske kiseline koji povezuje metabolizam ugljikohidrata s biosintezom aromatskih aminokiselina i sekundarnih biljnih metabolita. Fenilpropanoidnim biosintetskim putem nastaju flavonoidi djelovanjem enzima kalkan sintaze i stilbeni djelovanjem enzima stilben sintaze. Kalkan sintaza i stilben sintaza se natječu za isti supstrat, 4-kumaroil-CoA u flavonoidnom i stilbenskom biosintetskom putu [5].



Slika 13: Biosintetski fenilpropanoidni put groždanih fenola (prilagodeno prema [2])

Resveratrol nastaje reakcijama kondenzacije u stilbenskom biosintetskom putu iz 4-kumaroil-CoA i tri molekule malonil-CoA djelovanjem enzima stilben sintaze (STS) pri čemu dolazi do gubitka terminalne karboksilne skupine i zatvaranja prstena A.

### 1.1.2.1. UTJECAJ OKOLIŠNIH ČIMBENIKA NA BIOSINTEZU GROŽĐANIH FENOLA

Biosinteza grožđanih polifenola odnosno njihov sadržaj je određen genetičkim, agronomskim i okolišnim čimbenicima, interakcijom genotipa i okoliša te postupcima nakon branja i izloženosti bolestima osobito gljivičnim infekcijama. Najvažniji okolišni čimbenici su klimatski uvjeti, geografski položaj, svjetlo odnosno izlaganje sunčevu zračenju te temperatura [8].

Relativno visoke razine sunčeva UVB zračenja povećavaju nakupljanje tvari koje apsorbiraju UVB zračenje poput flavonoida, osobito stilbena indukcijom ekspresije gena za enzim stilben sintazu. Sunce i suhi uvjeti povećavaju sadržaj šećera i promiču glikozilacijske reakcije, a smanjuju ekspresiju gena za enzim resveratrol sintazu. Gljivične infekcije povećavaju ekspresiju gena za enzim resveratrol sintazu, ali i povećavaju konverziju resveratrola u viniferine.

Vinski vigor utječe na sadržaj proantocijanidina i kemijski sastav grožđane kože. Poznato je da je vodeni status potencijalni modulator sekundarnog metabolizma. Generalno, deficit vode povećava transkripciju gena uključenih u biosintezu prekursora stilbena poput gena za enzim stilben sintazu. Povećanje STS mRNA uzrokuje povećanje koncentracije resveratrola i njegova glikoziliranog oblika, *trans*-piceida. Povećanje koncentracije flavonola, proantocijanidina i antocijana je zabilježeno pri uvjetima rasta sa sniženim statusom vode.

### 1.1.3. IZOLACIJA GROŽĐANIH FENOLA

Izolacija groždanih polifenola se uglavnom izvodi tekućinskom ekstrakcijom koja najčešće obuhvaća ekstrakcijske metode poput maceracije na sobnoj temperaturi, ekstrakcije na povišenoj temperaturi, fluidne ekstrakcije, Soxhlet ekstrakcije, ultrazvučne ekstrakcije, ubrzane ekstrakcije otapalima ili ekstrakcije pri superkritičnim uvjetima.

Učinkovitost ekstrakcije ovisi o nekoliko glavnih čimbenika kao što su vrsta otapala, vrsta biljnog materijala, stupanj usitnjenosti, temperatura, vrijeme sušenja, vrijeme i broj ciklusa ekstrakcije te ekstrakcijska procedura.

Iz literature je dobro poznato da su najučinkovitija otapala za ekstrakciju stilbena protična otapala poput metanola ili etanola. Sustavi metanol/voda i etanol/voda su najčešća otapala za ekstrakciju polifenola iz groždanih sjemenki. Tako se primjerice za izolaciju resveratrola najčešće koristi sustav otapala kloroform-metanol-voda. Navedena otapala pružaju visoku iskoristivost ekstrakcije, ali korištenje velike količine organskih otapala predstavlja zdravstveni i sigurnosni rizik za istraživače kao i neprijateljski pristup prema okolišu.

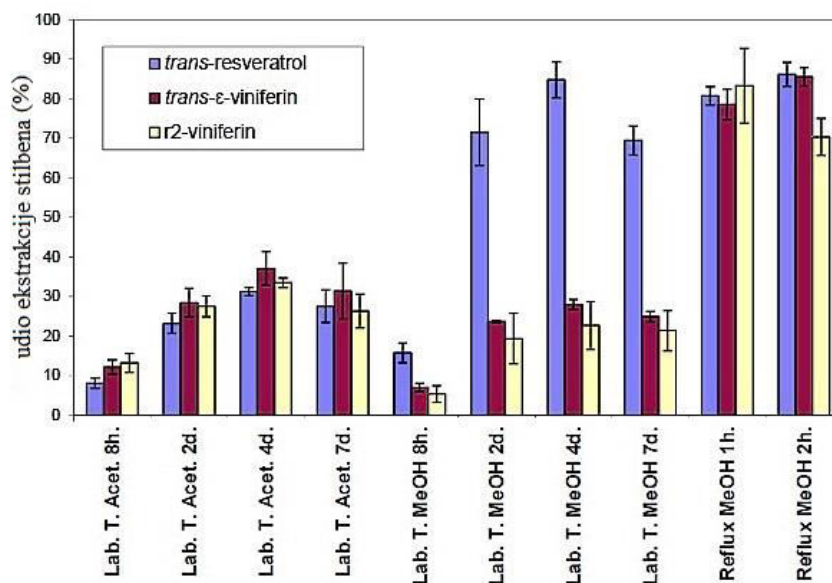
Ekstrakcijske metode koje mogu značajno eliminirati ili smanjiti upotrebu organskih otapala su ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija fluidom ili vodom pri superkritičnim uvjetima. Korištenje jeftinih, nezapaljivih i netoksičnih otapala je omogućeno ekstrakcijom fluidom pri superkritičnim uvjetima koja je primjerena za tvari osjetljive na temperaturu, svjetlo i zrak. Ovom metodom ekstrakcije se mogu izbjeći nedostaci mehaničkog prešanja ili ekstrakcije s organskim otapalima poput gubitka aktivnih tvari, prisutnosti ostatnih otapala i termalne razgradnje. Superkritični CO<sub>2</sub> je obećavajuće otapalo za ekstrakciju i frakcioniranje jestivih ulja bogatih nezasićenim masnim kiselinama zbog izvođenja na niskoj temperaturi. Nedostatak ekstrakcije fluidom pri superkritičnim uvjetima je cijena samog procesa [7].

Optimalni uvjeti za ekstrakciju resveratrola iz groždane kože pri superkritičnim uvjetima su temperatura od 40 °C, tlak od 150 bara, otapalo je 7,5 % otopina etanola te vrijeme ekstrakcije 15 minuta [17].

Iako vrsta otapala ima jači učinak na učinkovitost ekstrakcije, temperatura je također važni čimbenik. Pri višim temperaturama je omogućena veća iskoristivost ekstrakcije resveratrola, ali je i povećani rizik od razgradnih reakcija. Bez obzira na vrstu otapala, koncentracija groždanih polifenola raste do četvrtog dana ekstrakcije kada se postiže maksimalna koncentracija.

Na povišenoj temperaturi, vrijeme ekstrakcije proporcionalno je koncentraciji ekstrahiranog resveratrola i *trans-ε*-viniferina, a koncentracija *r2*-viniferina polagano opada s vremenom ekstrakcije. Koncentracija ekstrahiranih tvari opada s porastom broja ciklusa ekstrakcije.

Vrsta biljnog materijala i stupanj usitnjenosti imaju značajni utjecaj na učinkovitost ekstrakcije. Naime, više koncentracije resveratrola i *r2*-viniferina se dobivaju iz praškasta materijala, dok se koncentracije *trans-ε*-viniferina uvećane i do 50 % dobivaju ekstrakcijom iz rezanog materijala u odnosu na praškasti biljni materijal.



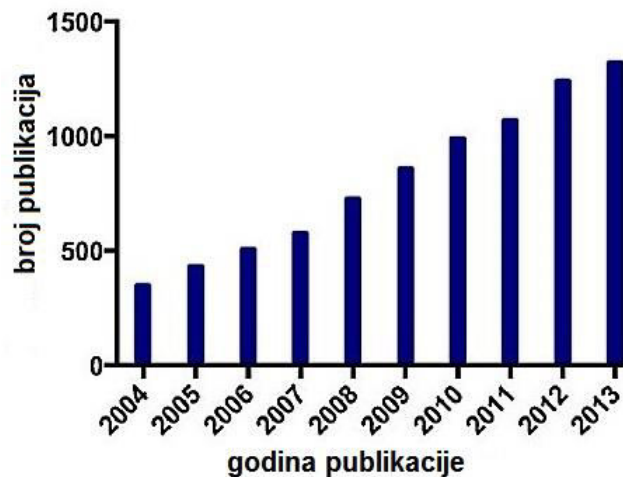
**Slika 14: Utjecaj temperature, vrste otapala i vremena na učinkovitost ekstrakcije polifenola (prilagođeno prema [17])**

Metoda ekstrakcije stilbena s najvećom učinkovitošću je ubrzana ekstrakcija otapalima (engl. *accelerated solvent extraction, ASE*) koja se izvodi pri visokom tlaku od 10 – 10,5 MPa i temperaturi od 100 °C kroz pet minuta u tri ciklusa [17].

U novije vrijeme, za izolaciju i odjeljivanje groždanih polifenola, sve se češće koristi kromatografska metoda HSCCC (engl. *High-speed Counter-current Chromatography*) jer je prikladna za bioaktivne uzorke osjetljive na temperaturu i svjetlo. HSCCC je razdjelna kromatografija u kojoj su mobilna i stacionarna faza tekućine. Glavne prednosti su sprečavanje gubitka uzorka ireverzibilnom adsorpcijom, sprečavanje deaktivacije stacionarne faze i kraja signala pika zbog površinskog preopterećenja silanola. Ova kromatografska metoda omogućuje izolaciju i identifikaciju četiri stilbena iz ekstrakta korijena vinove loze i to: *trans*-resveratrola,  $\delta$ -viniferina,  $\epsilon$ -viniferina i *trans*-vitisina B uz sustav otapala kloroform-metanol-n-butilni alkohol-voda (4:3:0,05:2) [17].

## 1.2. RESVERATROL

U zadnjem desetljeću, resveratrol je predmet velikog broja *in vitro* i *in vivo* istraživanja koja su dokazala njegove pozitivne učinke na ljudsko zdravlje poput antioksidacijskih, kardioprotektivnih, antikancerogenih, neuroprotektivnih, protuupalnih, antimikrobnih i anti-age svojstava. Veliki interes za resveratrolom u znanstvenim istraživačkim krugovima se javio 1992. godine nakon otkrića njegove uloge u „Francuskom paradoksu“. Francuski paradoks je fenomen koji objašnjava smanjenje mortaliteta i učestalosti kardiovaskularnih oboljenja u Francuza unatoč prehrani s visokim udjelom masnoća (paštete, masni sirevi). Incidencija srčanog infarkta u Francuskoj je oko 40 % niža u odnosu na ostatak Europe. Smatra se da svakodnevni unos umjerene količine crvenog vina, odnosno njegova aktivna sastojka resveratrola objašnjava pojavu Francuskog paradoksa.



**Slika 15: Broj publikacija s terminom za pretraživanje „resveratrol“ u zadnjem desetljeću  
(prilagođeno prema [50])**

Resveratrol se u ljekovite svrhe koristi više od 2000 godina. Prvi poznati ljekoviti pripravci resveratrola su tzv. *darackshava* i *manakka*. *Ayurveda*, jedna od antičkih medicinskih knjiga Hindusa opisuje „*darackshavu*“, fermentirani sok crvenog grožđa i „*manakku*“, suho grožđe kao poznate kardiotonike. U Bibliji su groždani sok i crveno vino opisani kao Božji dar [18,19].

Resveratrol je prirodni fitoaleksin koji se sintetizira u više od 70 biljnih vrsta poput japanskog dvornika (*Polygonum cuspidatum*), kikirikija (*Arachis hypogea*), borovnice (*Vaccinum spp.*), vinove loze (*Vitis spp.*), duda (*Morus spp.*), ljljiana (*Veratrum spp.*), leguminoza (*Cassia spp.*, *Pterolobium hexapetallum*), rabarbare (*Rheum spp.*), smreke (*Picea spp.*), bora (*Pinus spp.*) i trava (*Poaceae spp.*).

Fitoaleksini su toksične tvari koje se sintetiziraju kao odgovor na stresne uvjete poput mehaničkog oštećenja, deficita vode, infekcija patogenim mikroorganizmima (*Botrytis cinerea*), UV zračenja, klimatskih promjena, prisutnosti nekih kemijskih tvari i teških metala.

*Takaoka* je prvi izolirao resveratrol 1940. godine iz otrovnog korijena bijele čemerike (*Veratrum grandiflorum*). Resveratrol je prvi puta otkriven u vinovoj lozi (*Vitis vinifera*) 1976. te u vinu 1992. godine. Kožica grožđa je vjerojatno najvažniji izvor resveratrola iako je potvrđeno da su kokos i kakao novi izvori resveratrola. Kožica i groždane sjemenke sadrže najveću koncentraciju resveratrola (50 – 100 µg/g). Koncentracija resveratrola iznosi 0,2 – 14 mg/L u crvenim te 0,1 – 0,8 mg/L u bijelim vinima. Prisutnost *cis*-resveratrola u vinu je rezultat vinifikacije i izomerizacije pri niskom pH. Tijekom procesa fermentacije, koncentracija resveratrola se povećava, a koncentracija piceida smanjuje vjerojatno zbog hidrolize izomera piceida [19 – 21].

## 1.2.1.FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA

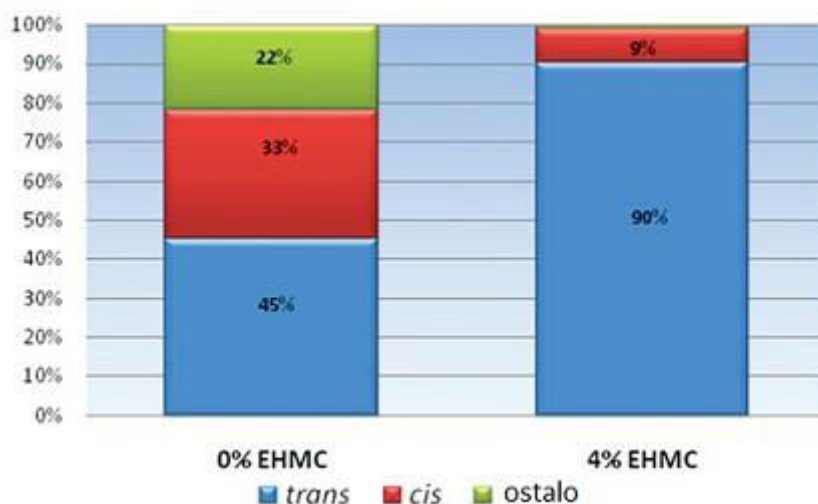
Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) je mala hidrofobna planarna molekula netopljiva u vodi, a topljiva u etanolu i DMSO.

Tablica 2: Fizikalna svojstva resveratrola (prilagođeno prema[22])

SVOJSTVO	VRIJEDNOST	
$t_T$ (°C)	253 – 255	
$M_r$	228,25	
$pK_a$	9,3; 10,0; 10,6	
$\log P$	3,024	
topljivost (mg/g)	voda	0,03
	etanol	50
	izopropil miristat	0,49±0,05
	izopropil palmitat	0,41±0,04
	etil oleat	0,42±0,07
	oleinska kiselina	0,07±0,01
	maslinovo ulje	0,2±0,01
	PEG-8 kapilni gliceridi	83,85±7,66

C6-C2-C6 stilbenska struktura resveratrola sadrži dva fenolna prstena povezana stirenskom dvostrukom vezom koja osigurava postojanje *trans*- i *cis*-stereoizomera od kojih je *trans*-stereoizomer komercijalno dostupan. Resveratrol se uglavnom pojavljuje kao sterički stabilniji i biološki aktivniji *trans*-stereoizomer, a prisutnost *cis*-stereoizomera je posljedica fotoizomerizacije, enzimskog djelovanja tijekom fermentacije ili oslobađanja iz oligomera resveratrola, viniferina. Spektrofotometrijskom analizom je utvrđeno da *trans*-resveratrol ima maksimum apsorpcije na 308 nm, a *cis*-resveratrol na 288 nm što omogućuje njihovo odjeljivanje u sustavu HPLC-a s UV detektorom.

*Cis*-stereoizomer resveratrola je ekstremno osjetljiv na svjetlo, ali može ostati stabilan u tamnim uvjetima pri sobnoj temperaturi u 50 %-tnom etanolu kroz 35 dana u koncentraciji 5,3 – 52,8  $\mu\text{M}$ . Kada se *trans*-resveratrol izloži UV svjetlu na 366 nm kroz 120 min, 90,6 % *trans*-resveratrola prelazi u *cis*-resveratrol. Ova se reakcija može značajno smanjiti dodatkom fotostabilizatora poput etilheksil metoksikrilena (EHMC). *Cis*-stereoizomer je termički i oksidacijski nestabilan u tolikoj mjeri da nije komercijalno dostupan [23].



**Slika 16: Učinak fotostabilizatora etilheksil metoksikrilena na fotoizomerizaciju resveratrola (prilagođeno prema [23])**

U tamnim uvjetima, *trans*-resveratrol je stabilan kroz najmanje 28 dana u pH području 1 – 7. Niski pH uzrokuje izomerizaciju *cis*-resveratrola u *trans*-resveratrol. Razlika u slobodnoj entalpiji pokazuje veću stabilnost *trans*-resveratrola za 11 – 14 kJ/mol. Molekula *trans*-resveratrola je relativne koplanarne strukture koja ima tri hidroksilne skupine koje se stalno kreću „flip-flop“ mehanizmom te mogu stvarati i kidati vodikove veze sa susjednim fenolnim kisikom. Ova tri vodikova atoma mogu biti prenešena na reaktivni oksidans bogate elektronske gustoće što predstavlja princip njegova antioksidacijskog djelovanja [10].



## 1.2.2.FARMAKOLOŠKI UČINCI RESVERATROLA

Znanstvene studije provedene zadnjih nekoliko godina su potvrdile djelovanje resveratrola na prevenciju i/ili usporenje razvoja kroničnih bolesti poput kardiovaskularnih i neurodegeneracijskih oboljenja te karcinoma povećanjem rezistencije na stres i/ili produljenjem životnog vijeka.

Resveratrol može modulirati brojne fiziološke signalne puteve na staničnoj razini. Mnoge *in vitro* studije su fokusirane na identifikaciju meta i staničnih mehanizama kojima resveratrol ostvaruje beneficiane učinke na ljudsko zdravlje. Stanični mehanizmi mogu biti rezultat aktivacije signalnih puteva vezanjem na receptore stanične membrane ili aktivacije intracelularnih meta [19].

Resveratrol ima bifazični učinak ovisan o dozi. Pri manjim dozama, resveratrol djeluje kao anti-apoptotička tvar osiguravajući redukcijske uvjete i kardioprotektivne učinke potvrđene povećanjem ekspresije staničnih proteina preživljavanja i postishemijskim ventrikularnim oporavkom te smanjenjem veličine miokardijalnog infarkta i apoptoze kardiomiocita. Kardioprotektivni učinak resveratrola je zabilježen pri koncentraciji od 100 nM. Pri višim dozama, resveratrol djeluje kao pro-apoptotička tvar, uključujući i apoptozu kancerogenih stanica. Također djeluje depresivno na kardiološku funkciju i povećava ekspresiju apoptotičkih proteina što rezultira nestabilnim redukcijским okruženjem te povećanjem veličine miokardijalnog infarkta i broja apoptotičkih stanica. Prethodne studije su pokazale da minimalna koncentracija resveratrola potrebna za kemoprevencijske učinke iznosi 5  $\mu$ M. Pri 10  $\mu$ M, resveratrol pokazuje antioksidacijsku aktivnost, povećava staničnu proliferaciju i ostvaruje najučinkovitiju fotozaštitu, a pri koncentraciji od 100  $\mu$ M smanjuje staničnu vijabilnost HEK 293 stanica.

Točna granica između niske i visoke doze resveratrola nije još uvijek točno definirana. Pod pojmom visoka doza resveratrola, većina istraživača podrazumijeva dozu veću od 500 mg [8].

Primjenom fluorescencijske spektroskopije, mikrokolorimetrije i ESR spektroskopije je dokazano da se resveratrol i piceatanol ugrađuju u membranske modele sastavljene od dimiristoilfosfatidilkolina (DMPC) ili 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolina (DPPC) stvarajući interakcije s polarnim glavama lipidnog dvosloja. Piceatanol ima manju hidrofobnost u odnosu na resveratrol te se lokalizira bliže membranskoj površini [28, 29].

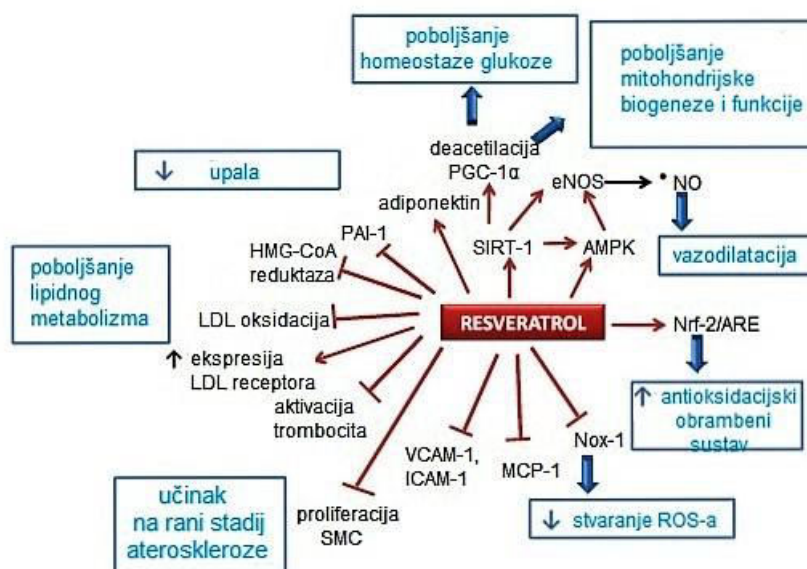
Znanstveni podaci o receptorima na koje se resveratrol veže, vrlo su ograničeni. Resveratrol regulira mRNA ekspresiju glavnih gena uključenih u kontrolu staničnog ciklusa, apoptoze, metastaziranja, stanične adhezije i receptorskih signalnih puteva. Resveratrol se veže na arilhidrokarbonski receptor (AhR) i na androgeni receptor uključen u razvoj i progresiju karcinoma prostate tako što smanjuje njegovu transkripcijsku aktivnost. Autoradiografijom je utvrđeno da se resveratrol veže na specifična vezna mjesta čiji je udio mnogo veći u granularnim keratinocitima epidermisa nego u dermisu s afinitetom  $K_D=180\pm 50$  nM [30].

Iako je nekoliko kliničkih studija rezultiralo ohrabrujućim podacima o djelovanju resveratrola na smanjenje oksidacijskog stresa i upale, očuvanje kardiovaskularnih funkcija, pojačanje kognitivnih sposobnosti, inhibiciju rasta karcinoma te na smanjenje inzulinske rezistencije u dijabetičara, još uvijek nisu točno definirani rizici i specifične preporuke za oralnu i topikalnu primjenu resveratrola [31].

### 1.2.2.1. KARDIOPROTEKTIVNI UČINAK

Kardioprotektivni učinci resveratrola se pripisuju brojnim farmakološkim učincima koji obuhvaćaju vazodilatacijske učinke, inhibiciju lipidne peroksidacije i sinteze eikozanoida, inhibiciju agregacije trombocita te antioksidacijske i protuupalne učinke. Resveratrol inhibira ionske kanale uključene u sekreciju kateholamina čija prekomjerna ekspresija doprinosi povećanom riziku od srčanih bolesti. Resveratrol ima negativni kronotropni i negativni inotropni učinak zbog sposobnosti otvaranja kalijevih i kalcijevih kanala [7, 20].

Kardiovaskularni učinci resveratrola su ovisni o dozi. Pri niskim dozama (2,5 – 5 mg/kg), resveratrol smanjuje rizik od kardiovaskularnih događaja, a pri visokim dozama (> 25 mg/kg) djeluje depresivno na kardiovaskularnu funkciju te povećava broj apoptotičkih stanica.



Slika 17: Potencijalni mehanizmi kardioprotektivnog djelovanja resveratrola (prilagođeno prema [32])

Vazodilatacijske učinke resveratrol postiže inhibicijom vaskularne NAPDH oksidaze i sinteze tromboksana A2 (TxA2) te stimulacijom  $Ca^{2+}$ -aktiviranih  $K^+$  kanala i povećanjem ekspresije i aktivnosti eNOS i iNOS. U jednoj *in vivo* studiji je dokazano da resveratrol u miševa s miokardijalnim infarktom značajno regulira profil proteinske ekspresije faktora rasta vaskularnog endotela (VEGF) i receptora za njegovu fetalnu tirozin kinazu te time ublažava miokardijalno oštećenje. U koronarnim arterijama svinja, kratkotrajna primjena resveratrola smanjuje fosforilaciju ERK 1/2, JNK i p38 MAPK te inducira antiapoptotički signal za zaštitu srca i smanjuje oštećenje miokardija tijekom ishemijske reperfuzije. Također povećava ekspresiju GLUT-4 i smanjuje ekspresiju endotelina u ishemičnom srcu pretilih štakora u prisutnosti i odsutnosti unosa glukoze [8, 33, 34].

Antihipertenzivna svojstva resveratrola poput smanjenja ekspresije receptora tipa I angiotenzina II u glatkom mišićju krvnih žila, često su udružena s endotel ovisnom vaskularnom relaksacijom, povećanom aktivnošću eNOS, SOD, katalaze i GPx te smanjenom aktivnošću mijeloperoksidaze. Niske doze resveratrola smanjuju srčanu hipertrofiju bez učinka na krvni tlak što je posredovano inhibicijom AMPK/Akt puta.

*In vitro*, *trans*-resveratrol inhibira peroksidaciju LDL-a te smanjuje razinu ukupnog kolesterola i triglicerida, čimbenika važnih u razvoju ateroskleroze. Za razliku od statina, resveratrol smanjuje aterogenost čestica LDL-a smanjenjem razine ApoB i razine oksidiranog LDL-a [31].

*In vitro* i *in vivo*, resveratrol smanjuje agregaciju trombocita ireverzibilnom inhibicijom sinteze eikozanoida iz arahidonske kiseline te na taj način doprinosi zaštiti od ateroskleroze. Antiagregacijski učinak resveratrola se temelji na inhibiciji TNF- $\alpha$  inducirane ekspresije koagulacijskih faktora u vaskularnim endotelnim stanicama te inhibiciji agregacije trombocita stimulirane ADP-om, kolagenom, fibrinogenom i trombinom. Resveratrol inhibira agregaciju trombocita inhibicijom fosforilacije p38 MAPK i povećanjem sinteze NO/cGMP-a.

*In vivo*, resveratrol povećava razine glavnih antioksidacijskih enzima poput glutacion peroksidaze, glutation-S-transferaze i glutacion reduktaze te time regulira redoks hemostazu i štiti jetru od oksidacijskih oštećenja induciranih zračenjem. Resveratrol štiti srce od ROS-om posredovane toksičnosti menadiona induciranjem NAD(P)H kinon reduktaze. Kardiotoksičnost doksorubicina je značajno smanjena primjenom resveratrola na kardiomiocitima jer sprečava nastanak oksidacijskog stresa i fibroze te povećava aktivnost mangan superoksid dismutaze aktivacijom SIRT1 [19, 27,35].

## 1.2.2.2. NEUROPROTEKTIVNI UČINAK

U neurodegeneracijskim bolestima poput Alzheimerove bolesti (AD), Parkinsonove bolesti (PD), Huntingtonove bolesti (HD), moždane ishemije i epilepsije dokazan je neuroprotektivni učinak resveratrola jer može penetrirati kroz krvno-moždanu barijeru. Resveratrol inhibira električnu aktivnost paraventricularnih jezgrih neurona te time ostvaruje neuroprotektivni učinak na centralnim neuronima [30].

*In vitro*, neuroprotektivni učinak resveratrola se ostvaruje regulacijom HO-1 i PGC-1 $\alpha$ , povećanjem ekspresije Nrf-2 te aktivacijom sirtuina odnosno zaštitom neurona od oksidacijskog stresa, ishemije i apoptoze uzrokovane toksinima (glutamat i NMDA). U AD, resveratrol smanjuje unutarstaničnu razinu A $\beta$  peptida povećanjem unutarstanične razgradnje A $\beta$  putem proteasoma. Resveratrol povećava ekspresiju sirtuina koji imaju važnu ulogu u zaštiti neurona od ROS-a, vodikova peroksida, NO i A $\beta$ . Aktivacijom sirtuina, resveratrol smanjuje apoptotičku aktivnost FoXO i promiče neuronalno preživljavanje. S druge strane, inhibira NF- $\kappa$ B i smanjuje iNOS i katepsin B, toksične čimbenike neurodegeneracije čime osigurava zaštitu AD neurona od A $\beta$ -inducirane neurotoksičnosti. U AD, resveratrol normalizira povećane razine malondialdehida (MDA) i nitrita te depleciju GSH transferaze i povećanu aktivnost acetilkolinesteraze. U studiji s neurotoksinima poput A $\beta$  peptida ili MPP+, resveratrol ima antiapoptotički učinak smanjenjem aktivacije kaspaze-3, povećanjem Bcl-2 proteina i aktivacijom protein kinaze C te aktiviranjem SIRT1 [20, 36].

### 1.2.2.3. ANTIMIKROBNI UČINAK

Visoka koncentracija flavonoida, stilbena, fenolnih kiselina poput galne kiseline i njihovih derivata je odgovorna za antimikrobni učinak ekstrakta groždanih sjemenki (GSE). Za razliku od konvencionalnih antimikrobnih lijekova, groždani polifenoli ne uzrokuju hemolizu ljudskih eritrocita.

Prisutnost 3,4,5-trihidroksifenilne skupine epigalokatehina, epigalokatehin-3-*O*-galata, resveratrola i prodelfinidina te broj hidroksilnih skupina i stupanj polimerizacije utječu na antimikrobnu aktivnost kao i koncentracija te vrijeme izloženosti. Osim navedenih čimbenika, na antimikrobnu učinkovitost utječe pH i topljivost te je zbog toga resveratrol neučinkovit u agaru na *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Mehanizam antimikrobnog učinka vjerojatno uključuje stvaranje konjugata između polifenola i proteina mikroorganizama, promjenu selektivne propusnosti plazmatske membrane mikroorganizama, interakciju s faktorima vezanja na bakterijskoj površini *S. aureus* te inhibiciju dihidrofolat reduktaze [1, 61].

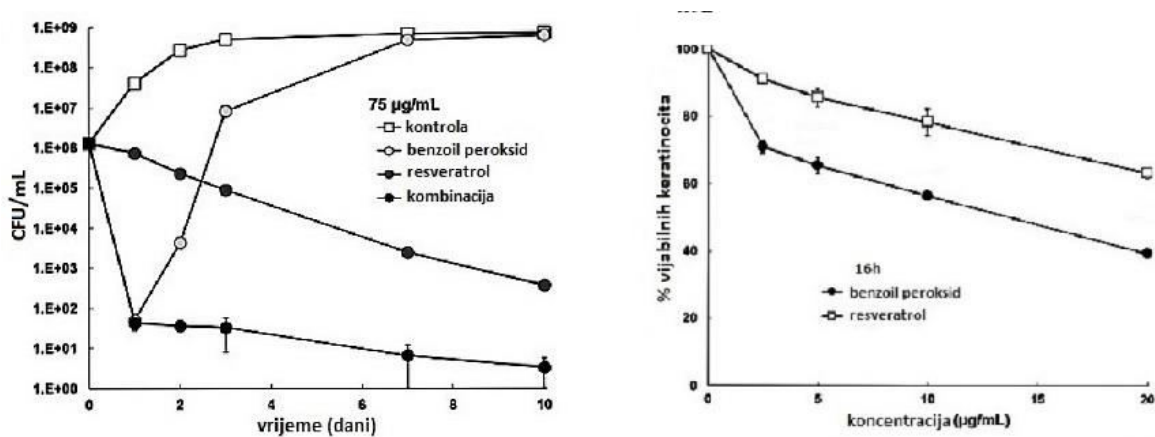
Antibakterijski učinak groždanih polifenola se odnosi na *MRSA*-u, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* i *Yersinia enterocolitica*. Resveratrol inhibira rast klinički važnih bakterijskih specija poput *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* i *Helicobacter pylori*. Ekstrakt groždanih sjemenki (GSE) pokazuje veću antimikrobnu aktivnost protiv *Gram-pozitivnih* bakterija (340 – 390 mg GAE/L) u odnosu na *Gram negativne* bakterije (475 – 575 mg GAE/L).

Akne vulgaris je najčešća kožna bolest u svijetu koja pogađa 85 % adolescenata i 10 % odraslih ljudi karakterizirana poremećajem pilosebacealne jedinice s upalnim imunim odgovorom na bakteriju *P. acnes*. Konvencionalno liječenje retinoidima i benzoil peroksidom je ograničeno smanjenom suradljivošću pacijenata zbog neželjenih nuspojava poput iritacije kože. Resveratrol inhibira AP-1 i NF-κB, upalne markere koji su uključeni u stvaranje upalnih lezija akne te inhibira proliferaciju keratinocita koja doprinosi folikularnoj opstrukciji.

Antimikrobna aktivnost resveratrola na *P. acnes* je dokazana *in vitro* i *in vivo* studijama. Klinička studija je dokazala potencijalnu učinkovitost resveratrola u liječenju akne vulgaris. Resveratrol pokazuje značajnu inhibiciju rasta *P. acnes* pri 50 µg/ml, a pri koncentraciji od 100 µg/ml pokazuje kontinuiranu inhibiciju rasta. Benzoil peroksid pokazuje inicijalno visoku baktericidnu aktivnost koja nije zabilježena nakon prva 24 h.

Kombinacija resveratrola i benzoil peroksida pokazuje višu početnu antibakterijsku aktivnost i inhibiciju bakterijskog rasta *P. acnes*. Elektronskom mikroskopijom *P. acnes* tretiranih resveratrolom je zabilježena promijenjena bakterijska morfologija i gubitak membrane. MTS test je pokazao da resveratrol ima nižu citotoksičnost humanih monocita (< 40 %) i keratinocita u odnosu na benzoil peroksid (90 %) pri koncentraciji od 10 µg/ml. Iz ovih podataka možemo očekivati smanjenu iritaciju *in vivo*. Pilot studija s topikalno primijenjenim resveratrolom nije zabilježila kutane nuspojave.

Resveratrol ima povoljni sigurnosni profil te se kombinacijskom terapijom resveratrola i benzoil peroksida omogućuje značajno smanjenje koncentracije benzoil peroksida, a time smanjuju nuspojave i povećava suradljivost pacijenta. Kontinuirana antibakterijska aktivnost prema *P. acnes* i smanjena citotoksičnost u odnosu na benzoil peroksid, pokazuje potencijal resveratrola kao nove terapijske opcije ili adjuvantne terapije u liječenju akne vulgaris [37].



**Slika 18: Antibakterijski i citotoksični učinak resveratrola i benzoil peroksida (prilagodeno prema [37])**

Inhibicija rasta dermatofita *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* i *Microsporum gypseum* od 75 % je zabilježena pri koncentraciji resveratrola 25 – 50 µg/ml. Resveratrol pokazuje antimikotički učinak naspram *Candida albicans* pri koncentraciji 10 – 20 µg/ml.

Resveratrol ima antiviralne učinke protiv HIV-1 i HSV te sinergistički povećava aktivnost nukleozidnog analoga zidovudina (AZT), zalcitabina (ddC) i didanozina (ddI). Resveratrol pri koncentraciji od 10 µM je netoksičan za stanice, a reducira viralnu replikaciju 20 – 30 %. Resveratrol i ddI inhibiraju replikaciju ddI rezistentnih viralnih izolata koji imaju mutaciju u reverznoj transkriptazi [7].

#### **1.2.2.4. ANTIDIJABETIČKI UČINAK**

Resveratrol posjeduje preventivski učinak na inzulinsku rezistenciju, hiperglikemiju, dijabetes tipa 2 i dislipidemiju. On može povećati inzulinsku sekreciju i translokaciju prijenosnika glukoze (GLUT-4) do plazmatske membrane. Istodobno, povećava aktivnost glikogen sintaze [20].

Primjenom 5 mg *trans*-resveratrola dva puta dnevno kroz četiri tjedna na muškarcima s dijabetesom tipa 2, dokazana je inzulinska osjetljivost te su značajno smanjene razine brze i postprandijalne glukoze u krvi te razine serumskog inzulina [38].



### 1.2.2.4.1. UČINAK NA CIJELJENJE RANE

Cijeljenje rana je kompleksni, dugotrajni i dinamični proces koji obuhvaća tri faze: hemostatsku/upalnu fazu, proliferacijsku/staničnu fazu i fazu remodeliranja. Odmah nakon oštećenja počinje upala koja je udružena s depozicijom upalnih stanica poput monocita i makrofaga. Proliferacijska faza je karakterizirana angiogenezom, agregacijom kolagena, stvaranjem granulacijskog tkiva, epitelizacijom i kontrakcijom rane.

Najvažniji pristup u zacjeljivanju rana predstavlja skraćivanje ovih faza i osiguravanje idealnog stvaranja ožiljka. Neki istraživači ističu da antibiotici mogu odgoditi reepitelizaciju. U dvostruko slijepoj kliničkoj studiji na 40 pacijenata tijekom tri tjedna primijenjena je 2 % krema GSE dvaput dnevno. Stanična gustoća u granulacijskom tkivu je veća, a depozicija kolagenskih vlakana je snižena nakon topikalne primjene 2 % kreme GSE. GSE ubrzava cijeljenje rana, reepitelizaciju, stvaranje granulacijskog tkiva, agregaciju kolagena i angiogenezu te smanjuje upalnu reakciju u kraćem vremenu. Potpuno cijeljenje rane je zabilježeno u osmom danu ispitivane skupine i 14. danu kontrolne skupine. Topikalna primjena groždanih proantocijanidina uzrokuje oslobađanje VEGF i stvaranje više kolagenih vlakana što rezultira kontrakcijom i zatvaranjem rana. Osim toga, protuupalna i antimikrobna svojstva groždanih proantocijanidina doprinose učinkovitosti u cijeljenju rana [40].

Resveratrol ima veliki potencijal za topikalnu primjenu u liječenju dijabetičkog stopala. Naime, u jednoj placebo kontroliranoj randomiziranoj kliničkoj studiji provedenoj na 24 pacijenta s dijabetičkim stopalom je dokazano da primjena 50 mg *trans*-resveratrola dva puta dnevno kroz 60 dana uzrokuje smanjenje ulcerozne rane i razine plazmatskog fibrinogena [39].



**Slika 19: Učinak resveratrola na zacjeljivanje ulceroznih rana u pacijenata s dijabetičkim stopalom nakon 60 dana primjene (prilagođeno prema [39])**

### 1.2.2.5. ANTIKANCEROGENI UČINAK

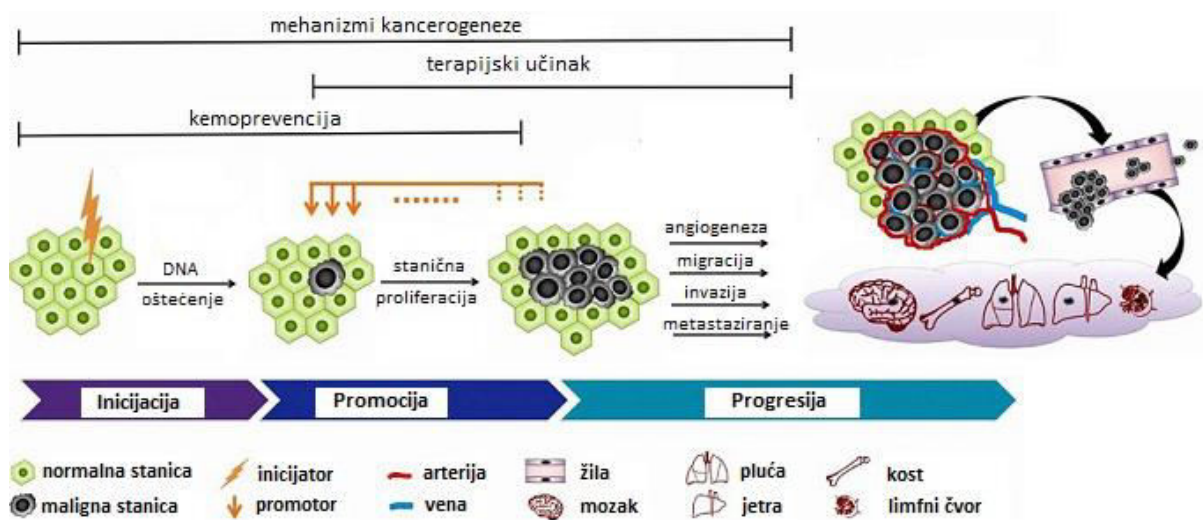
Kemoprevencija prirodnim tvarima u netoksičnoj dozi predstavlja potencijalnu strategiju za upravljanje neoplazmama i kemoterapiju prekanceroznih lezija. Interes za korištenjem prirodnih tvari kao potencijalnih kemoprevencijskih tvari je u stalnom porastu. Idealna karakteristika kemopreventiva/kemoterapeutika je uspostavljanje kontrole normalnog rasta preneoplastičnih ili malignih stanica modulacijom nepravilnih signalnih puteva i/ili induciranjem apoptoze i ciljanjem multiplih biokemijskih i fizioloških puteva razvoja tumora. Resveratrol predstavlja idealnu molekulu kao jaki kemoprevencijski i/ili kemoterapijski agens zbog relativno niske toksičnosti, ograničenih nuspojava i sposobnosti ciljanja multiplih signalnih molekula koje zajednički promoviraju preživljavanje stanica karcinoma i rasta tumora [41,42].

Karcinom je najveći uzročnik mortaliteta s 8,2 milijuna smrti godišnje na svjetskoj razini. Najveći problem predstavlja postavljanje dijagnoze u zadnjem stadiju bolesti i rezistencija na postojeću kemoterapiju. Rezistencija na postojeću kemoterapiju je posljedica multiplih mehanizama tumorskih stanica poput povećanog efluksa i smanjenog influksa lijeka, aktivacije sustava detoksifikacije i procesa popravka DNA te izbjegavanja apoptoze inducirane lijekom.

Stilbeni su potentni inhibitori MRP1 transporta kroz humanu eritrocitnu membranu koji je glavni uzročnik neučinkovitosti lijekova osobito pri liječenju karcinoma. Inhibicijska moć derivata resveratrola se povećava oligomerizacijom i brojem direktno vezanih hidroksilnih skupina na stilbenski aromatski prsten [42].

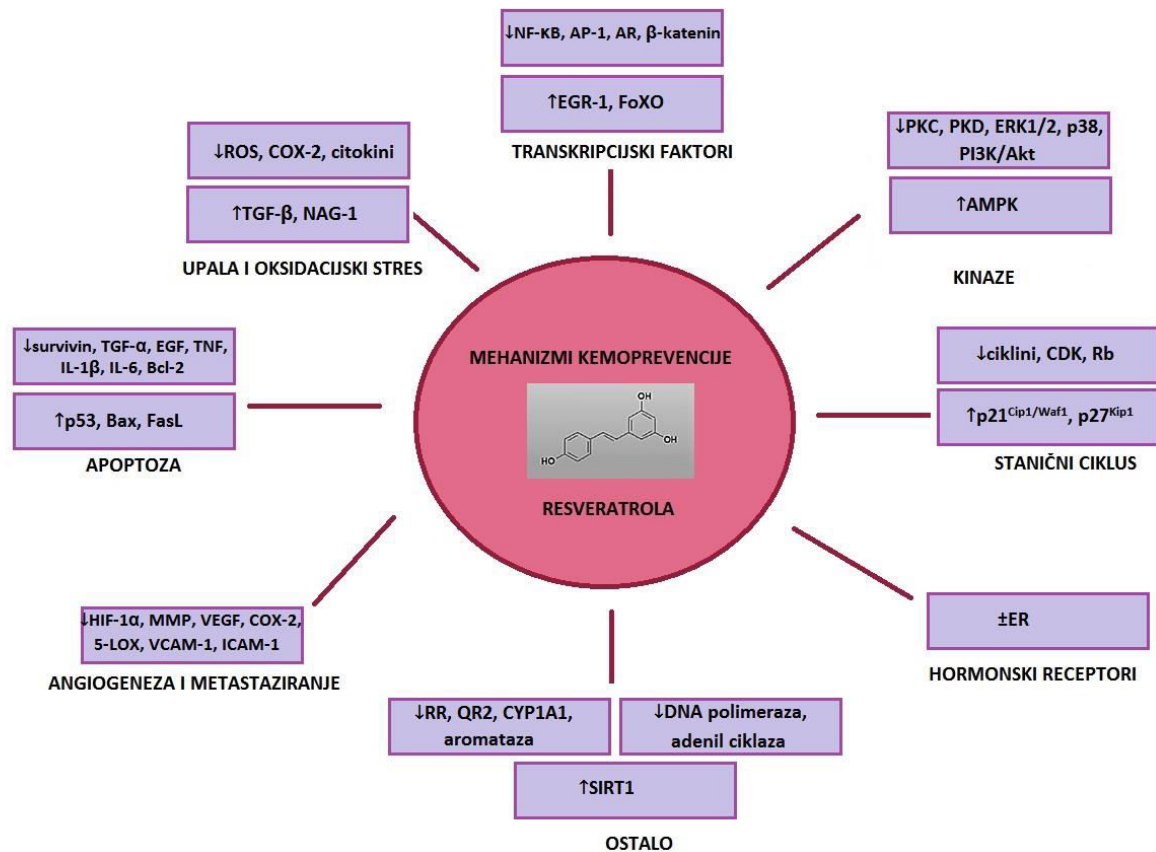
Antikancerogeno djelovanje resveratrola je prvi uočio *Jang* 1997. godine kao smanjenje broja kožnih tumora u miševa nakon topikalne primjene resveratrola. Nakon što je *Jang et al.* dokazao preventivski učinak resveratrola na sve tri faze razvoja karcinoma kože (inicijacija, promocija i progresija), broj istraživanja s resveratrolom je povećan za 98 % na svjetskoj razini. Primjena dnevne doze resveratrola od 40 mg/kg povećava preživljavanje miševa sa supkutanim neuroblastomom s 0 % na 70 %. Primjena 1 – 5 mg/kg resveratrola dnevno zaustavlja rast karcinoma dojke u miševa. Brojne *in vitro* i *in vivo* studije su dokazale antiproliferacijski, antikancerogeni i kemoprevencijski učinak resveratrola na limfoidni i mijeloidni tumor; tumor dojke, prostate, kolona, pankreasa, pluća, jajnika i cerviksa te melanoma.

Primjena niskih doza resveratrola, poput onih u vinu nije dovoljna za zaustavljanje proliferacije staničnih linija ljudskih stanica leukemije. Studije su pokazale da je 5  $\mu\text{M}$  resveratrola dovoljno za 90 % supresiju TNF posredovanih staničnih odgovora. Zaustavljanje progresije kancerogeneze i induciranje terminalne diferencijacije za 50 % zahtjeva koncentraciju resveratrola od 19  $\mu\text{M}$ . Inhibicijski učinak resveratrola na progresiju estrogen pozitivnih i estrogen negativnih stanica raka dojke je zabilježen u dozi od 1 mM resveratrola. Izlaganje stanica ljudskog kolorektalnog karcinoma resveratrolu u koncentraciji od 100 mM tijekom 48 h inducira staničnu smrt [43].



**Slika 20: Resveratrol direktno modulira različite molekulske signalne transdukcijske puteve uključene u sva tri stadija kancerogeneze (prilagođeno prema [44])**

Mehanizmi antikancerogenog djelovanja resveratrola su još uvijek nejasni, ali uključuju antioksidacijski učinak i sposobnost neutraliziranja slobodnih radikala, protuupalni učinak, inhibiciju stanične proliferacije, indukciju apoptoze te inhibiciju enzima poput ribonukleotid reduktaze, DNA polimeraze, DNA topoizomeraze i protein kinaze C (PKC). Osim toga, resveratrol ima učinak na ekspresiju CYP450 i metabolizam kancerogena te inhibiciju glikolitičkih enzima [19].



Slika 21: Mogući mehanizmi kemoprevencijskog djelovanja resveratrola (prilagođeno prema [7])

### 1.2.2.5.1. OKSIDACIJSKI STRES I LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Oksidacijski stres je uključen u patogenezu kardiovaskularnih i neurodegeneracijskih bolesti te je čvrsto povezan s kancerogenezom i bolestima udruženim sa starenjem. Oksidacijski stres je uzrokovan viškom reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) nastalih iz različitih izvora poput mitohondrijskog prijenosnog elektronskog lanca i smanjene razine NADPH oksidaza. Višak ROS-a može oštetiti makromolekule aktivacijom signalnih puteva koji uključuju brojne upalne medijatore što se odražava mutagenezom, onkogenom i starenjem. ROS uzrokuju oštećenje staničnih membrana i ostalih lipidnih struktura lipidnom peroksidacijom nezasićenih masnih kiselina, promjene u proteinima mijenjajući njihovu tercijarnu strukturu te promjene DNA [19, 34].

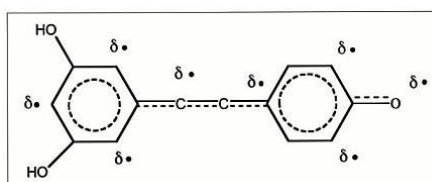
Resveratrol kao jedan od najpotentnijih antioksidansa značajno smanjuje markere oksidacijskog stresa poput albumina u serumu i 8-hidroksigvanozina u urinu te inhibira stvaranje ROS-a inducirano formilmetionil-leucilfenilalaninom i polimorfonuklearnim leukocitima. Resveratrol može spriječiti oksidacijski stres induciran UV zračenjem i vodikovim peroksidom što je dokazano u različitim *in vitro* sustavima većinom temeljenim na keratinocitima i kulturama fibroblasta.

Lipidna peroksidacija u staničnim membranama ili *stratum corneum* doprinosi upali i promjenama funkcije kožne barijere te razgradnji kolagenih i/ili elastičnih vlakana u dermisu. Produkti lipidne peroksidacije poput reaktivnog malonildialdehida oštećuju proteine i DNA te mogu biti kancerogeni i mutageni što doprinosi razvoju različitih oboljenja. Povećane razine lipidnih peroksida utječu na gubitak fluidnosti, inaktivaciju membranskih enzima i povećanu ionsku permeabilnost što dovodi do poremećaja integriteta stanične membrane. Lančana reakcija lipidne peroksidacije inducirana ROS-om u staničnim membranama utječe na signalne puteve koji su uključeni u ekspresiju gena odgovornih za regulaciju metabolizma kolagena. Na taj način u keratinocitima i fibroblastima dolazi do pojačane ekspresije matriksnih metaloproteinaza (MMP) koje uključuju MMP-1 (kolagenaza), MMP-3 (stromelizin) i MMP-9 (gelatinaza) [31].

### 1.2.2.5.1.1. MEHANIZMI ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA

Groždani polifenoli su prirodni antioksidansi koji inhibiraju oksidacijske lančane reakcije u ljudskoj koži i preveniraju neke kožne bolesti te prijevremeno starenje. Oni posjeduju antioksidacijsku aktivnost čiji se mehanizmi djelovanja mogu temeljiti na sposobnosti doniranja vodika i „gašenja“ singleta kisika, „hvatanju“ slobodnih radikala, inhibiciji stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva, molekulske kompleksaciji s prooksidacijskim proteinima te zaustavljanju kaskadnih reakcija slobodnih radikala u lipidnoj peroksidaciji ili indirektno na indukciji endogenih antioksidacijskih obrambenih mehanizama.

Sposobnost doniranja vodikovih atoma ili elektrona i sposobnost direktne neutralizacije reaktivnih kisikovih spojeva poput superoksidnog radikala ( $O_2^{\cdot-}$ ), vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ), hidroksilnog radikala ( $HO^{\cdot}$ ), singleta kisika ( $^1O_2$ ) ili peroksilnog radikala ( $RO_2^{\cdot}$ ) su posljedica strukturnih značajki resveratrola. Svojstva resveratrola kao direktnog inaktivatora slobodnih radikala ovise o strukturnoj poziciji hidroksilne skupine. Esencijalni kriterij za antioksidacijsko djelovanje resveratrola je prisutnost strukture katehola ili 4'-hidroksilne skupine na prstenu B i prisutnost *m*-hidroksilne skupine na prstenu A. *o*-difenoksil skupina resveratrola povećava njegovu antioksidacijsku aktivnost. Ključni korak u zaustavljanju propagacije radikala je stvaranje rezonantno stabiliziranog peroksilnog radikala resveratrola [19].



**Slika 22: Struktura peroksilnog radikala resveratrola (prilagođeno prema [30])**

Sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala uvelike ovisi o prisutnosti slobodne hidroksilne skupine u položaju 3 jer ona osigurava planarnu strukturu koja dopušta konjugaciju, delokalizaciju elektrona i povećava stabilnost flavonoidnih fenoksilnih radikala. Resveratrol je dobar „hvatač“ slobodnih radikala zbog reducirajućih svojstava fenolne hidroksilne skupine i potencijala za elektronsku delokalizaciju. Slobodni radikali su atomi ili molekule s nesparenim elektronom poput superoksidnog aniona ( $O_2^-$ ), peroksilnog radikala ( $RO_2\cdot$ ) ili hidroksilnog radikala ( $\cdot OH$ ). Prisutnost viška slobodnih radikala inducira povećanje ekspresije matriksnih metaloproteinaza (MMP) odgovornih za razgradnju proteina ekstracelularnog matriksa uzrokujući stvaranje bora kao i peroksidaciju masnih kiselina unutar fosfolipidne strukture stanične membrane [45, 51].

Inhibicija stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva se ostvaruje keliranjem prooksidacijskih metalnih iona ( $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) te inhibicijom enzima poput ksantin oksidaze, protein kinaze C (PKC), ciklooksigenaze (COX), lipooksigenaze (LOX), glutation S-transferaze (GST), mikrosomalne monooksigenaze, mitohondrijske sukcinooksidaze i NADH oksidaze. Proces kompleksacije enzima direktno ovisi o karakteristikama proteina (topljivost, molekulska masa, hidrodinamični volumen, izoelektrična točka, sastav aminokiselina), karakteristikama polifenola (molekulska masa, struktura, konformacijska fleksibilnost, topljivost u vodi) i fizikalno-kemijskim uvjetima (pH, priroda otapala, temperatura, ionska jakost, prisutnost drugih organskih molekula poput polisaharida). Glavni tip interakcija uključenih u mehanizam kompleksacije su nekovalentne veze i hidrofobne interakcije. Sposobnost keliranja metala je povezana s jakim nukleofilnim karakterom aromatskih prstenova te prisutnošću hidroksilnih i karboksilnih skupina u molekuli polifenola [1, 16, 46].

U normalnim uvjetima, endogeni antioksidacijski sustav kože je jako učinkovit jer sadrži enzime poput glutation peroksidaze, glutation reduktaze, glutation-S-transferaze, tioredoksin reduktaze, katalaze i superoksid dismutaze koji razgrađuju vodikov peroksid. Neenzimski antioksidansi su L-askorbinska kiselina, glutation,  $\alpha$ -tokoferol, ubikinol, mokraćna i lipoična kiselina, vitamin E, karotenoidi i fenolni spojevi. Starije osobe su osjetljivije na oksidacijski stres zbog smanjenih mogućnosti njihovog endogenog antioksidacijskog sustava uslijed kroničnog izlaganja oksidacijskom stresu. Primjerice, nakon izlaganja kožnih fibroblasta UVA zračenju, aktivnost katalaze i superoksid dismutaze je smanjena [50].

Transkripcijski nuklearni eritroidni faktor 2 (Nrf2) regulira ekspresiju gena koji kodiraju antioksidacijske enzime. On je u citoplazmi vezan na svoj inhibitor Keap1, s kojeg disocira nakon aktivacije elektrofilom te se veže na DNA u jezgri čime se regulira transkripcija ciljnih gena poput  $\gamma$ -glutamylcistein sintetaze ( $\gamma$ -GCS) i hem oksigenaze 1 (HO-1).

### 1.2.2.5.1.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Ukupna antioksidacijska aktivnost polifenola ovisi o njihovom kvalitativnom i kvantitativnom sastavu, molekularnoj strukturi i metodi ekstrakcije. Naime, poznato je da tamno grožđe ima veću antioksidacijsku aktivnost od svijetlog zbog većeg sadržaja antocijana i flavonoida. Kombinacija rutina i *trans*-resveratrola te rutina, *trans*-resveratrola i kvercetina pokazuje jači sinergistički antioksidacijski učinak nego zbroj pojedinačnih učinaka. Međutim, kombinacija rutina, *trans*-resveratrola, kvercetina, katehina i epikatehina rezultira slabijim antioksidacijskim učinkom. Antioksidacijski kapacitet fenola pokazuje koncentracijski saturacijski limit iznad kojeg se antioksidacijska aktivnost ne povećava. Antioksidacijska aktivnost ekstrakta grožđanih sjemenki je ovisna o vrsti ekstrakcijskog otapala te je najviša u etanolu, niža u metanolu i najniža u vodi [10].

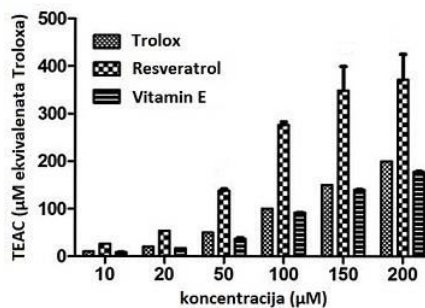
Antioksidacijska aktivnost fenolnih tvari je povezana s prstenastom strukturom molekule, konjugiranim dvostrukim vezama i prisutnosti te rasporedom funkcionalnih skupina prstena. Strukture koje najviše doprinose antioksidacijskoj aktivnosti flavonoida su 3', 4'-*o*-dihidroksilna skupina na prstenu B, dvostruka veza između C2 i C3 atoma kombinirana s keto skupinom na položaju 4 prstena C te slobodna hidroksilna skupina na položaju 3 prstena C. Antioksidacijska aktivnost polifenola se povećava sa sposobnošću doniranja vodika hidroksilnoj skupini. Ona se povećava dodavanjem hidroksilne skupine na jezgru flavonoida, a smanjuje dodavanjem metoksilne skupine zbog narušavanja planarnosti. Pretpostavka da su flavanoli jači hvatači slobodnih radikala nego flavoni može se pripisati većem broju hidroksilnih skupina i hidroksilnoj skupini u položaju 3. Međutim, prisutnost treće hidroksilne skupine na prstenu B miricetina ne povećava antioksidacijsku aktivnost. Antioksidacijska aktivnost je najviša kada se hidroksilne skupine nalaze u *para* položaju. Fenoksilni radikal stvoren u *para* položaju se može stabilizirati elektronskom delokalizacijom kroz stilbenski kostur smanjenjem energije veze O-H [1].

Maksimalni antioksidacijski učinak zahtjeva hidroksilnu skupinu u položaju 3 na dvostrukoj vezi između C2 i C3 atoma prstena B zajedno s keto skupinom na položaju 4. Konjugacija dvostrukih veza između prstena A i B omogućuje rezonancijsku stabilizaciju preko većeg broja aromatskih jezgara, što povećava stabilnost flavonoidnih radikala. Flavonoidi, osim vrlo korisne antioksidacijske aktivnosti, pokazuju i negativnu prooksidacijsku aktivnost u prisutnosti Cu<sup>2+</sup>. Prooksidacijska aktivnost izazvana ionom Cu<sup>2+</sup> proporcionalna je ukupnom broju hidroksilnih skupina. Glikozilacija i metiliranje hidroksilnih skupina smanjuju prooksidacijsko svojstvo flavonoida.

### 1.2.2.5.1.3. ANTIOKSIDACIJSKA HIPOTEZA KEMOPREVENCIJE

Otkad je otkriveno da je oksidacijski stres kritični faktor u razvoju kožnih karcinoma i da resveratrol posjeduje jaka antioksidacijska svojstva, resveratrol je postao vrlo interesantan za uklapanje u topikalne pripravke. Topikalna formulacija koja sadrži 1 % resveratrola je pokazala 17 puta jači antioksidacijski učinak od 1 % formulacije idebenona koji se nalazi u kliničkim istraživanjima [47].

Resveratrol djeluje kao primarni antioksidans neutralizacijom slobodnih radikala te kao sekundarni preventivski antioksidans inhibicijom enzimske aktivnosti ciklooksigenaze, lipooksigenaze i ksantin oksidaze. Resveratrol pokazuje veću antioksidacijsku aktivnost od propilgalata, vitamina C i vitamina E te Trolox-a [48].



**Slika 23: Antioksidacijska aktivnost resveratrola, Troloxa i vitamina E određena TEAC metodom (prilagođeno prema [52])**

Resveratrol je snažni inhibitor lipidne peroksidacije inducirane UV zračenjem, NADPH i ADP-Fe<sup>3+</sup> te je učinkovit hvatač 2,2'-azobis-(2-amidinopropan)-dihidroklorid peroksidnih radikala. Inhibicijom lipidne peroksidacije kao antioksidans u liposomalnim modelima, resveratrol štiti i kozmetičku formulaciju od razgradnje tijekom čuvanja. Resveratrol je učinkovitiji u prevenciji lipidne peroksidacije (95 %) inducirane UV zračenjem u odnosu na vitamin E (65 %) i vitamin C (37 %) [4, 7, 24, 53].

Resveratrol ima dualni antioksidacijski kapacitet. Osim što direktno uklanja slobodne radikale, resveratrol povećava intracelularnu ekspresiju ostalih enzimskih antioksidansa. Zaštitni učinak resveratrola je rezultat smanjenja ekspresije Keap1 proteina promicanjem disocijacije i povećanjem ekspresije transkripcijskog faktora Nrf2 koji je odgovoran za detoksifikaciju i eliminaciju ROS-a kroz aktivaciju antioksidacijskih enzima poput superoksid dismutaze, katalaze, glutation sintetaze, glutation reduktaze, glutation peroksidaze, glutation transferaze i glutation oksidoreduktaze.



Povećanjem transkripcijske aktivnosti Nrf2, aktivira se antioksidacijski obrambeni sustav potreban za zaštitu staničnih komponenti, osobito mitohondrija od oksidacijskog oštećenja kroz indukciju HO-1 koja je jedan od najjačih indikatora aktivacije Nrf2 puta [27, 49].

Kronična primjena resveratrola povećava antioksidacijsku aktivnost u stanicama povećanjem razina SOD-a, katalaze i ostalih antioksidansa poput glutationa, vitamina C, vitamina E i beta-karotena. Resveratrol ima važnu ulogu u prevenciji inicijacije kancerogeneze dugotrajnom suplementacijom.

Resveratrol se može ponašati kao antioksidans i prooksidans ovisno o koncentraciji i staničnom tipu te redoks statusu citosola. Unatoč izvanrednim antioksidacijskim svojstvima resveratrola, ne treba zanemariti malobrojne *in vitro* studije koje ukazuju na moguće prooksidacijske učinke resveratrola, osobito u prisutnosti svjetla i bakra koji je povišen kod nekih tumora. Niski pH uzrokovan nakupljanjem laktata zbog povećane glikolize u kanceroznim stanicama inducira rotaciju baza u DNA, osobito bakrom vezanog N7 gvanina. Resveratrol reducira bakar što uzrokuje stvaranje ROS-a i oksidacijsko oštećenja DNA. Ovo ukazuje na činjenicu da resveratrol može predstavljati učinkovitu adjuvantnu terapiju za hipoksične tumore čiji okoliš ima niski pH [30, 50].

### 1.2.2.5.2. UPALA

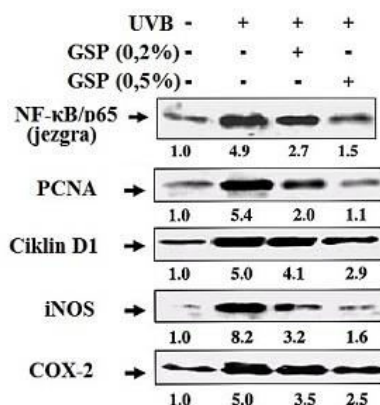
Upala je zaštitni odgovor tkiva na stanično oštećenje, iritaciju, invaziju patogena koji djeluje kao mehanizam uklanjanja oštećenih i nekrotičnih stanica. Jaka produkcija upalnih medijatora uzrokuje kroničnu upalu koja povećava rizik od razvoja kroničnih bolesti te predstavlja značajni epigenetski čimbenik u sva tri stadija razvoja karcinoma: inicijaciji, promociji i progresiji induciranjem oksidacijskog oštećenja i promoviranjem staničnog rasta [16, 21].

Farmakološka kontrola upalnog odgovora kože na sunčevo UV zračenje je izuzetno važna u smanjenju incidencije kožnih karcinoma. Keratinociti imaju važnu ulogu u regulaciji upalnih odgovora uzrokovanih izlaganjem kože sunčevom UV zračenju. Oni stvaraju upalne medijatore poput prostaglandina, kemokina, citokina i površinskih adhezijskih molekula koje kontroliraju jačanje i funkciju imunoloških stanica. Osim povećanih razina upalnih medijatora, upala inducirana UV zračenjem je karakterizirana povećanim krvnim protokom i vaskularnom permeabilnošću te razvojem edema, eritema i hiperplastičnog odgovora [54].

Jedan od najvažnijih enzima u upalnom procesu i razvoju tumora u UV kancerogenezi je inducibilna ciklooksigenaza 2. Ona katalizira ograničavajući korak pretvorbe arahidonske kiseline u prostaglandine, prostacikline i tromboksane. Ciklooksigenaza 2 (COX-2) je onkoprotein, ključni medijator upale čija se ekspresija povećava nakon indukcije multiplim mitogenim i upalnim stimulansima, a regulirana je transkripcijskim faktorima NF- $\kappa$ B i AP-1. Prekomjerna ekspresija COX-2 je povezana s patofiziologijom upale i karcinoma. U ljudskoj koži, ekspresija COX-2 je povećana u aktiničkim keratozama, SCC-u i BCC-u [19, 21].

Dugotrajna inhibicija COX-2 značajno smanjuje rizik od razvoja mnogih karcinoma i deleciju gena koji kodira za COX-2. Resveratrol smanjuje ukupnu aktivnost COX-2 u tumorskim i normalnim tkivima selektivnom inhibicijom aktivnosti COX-1 i/ili redukcijom COX-2 na razini mRNA. *In vitro* studije pokazuju da je transkripcijska inhibicija COX-2 i ornitin dekarboksilaze (ODC) udružena s inhibicijom protein kinaze C. U jednoj *in vitro* studiji, liofilizirani ekstrakt grožđanih sjemenki, koji uglavnom sadrži flavonole, flavanole i procijanidine, pokazao je jači protuupalni učinak od indometacina [5].

Primjena 0,2 % i 0,5 % GSP-a na koži SKH-1 miševa izloženoj UVB zračenju (180 mJ/cm<sup>2</sup>) triput tjedno kroz 24 tjedna inhibira UVB posredovanu infiltraciju i akumulaciju aktiviranih makrofaga i neutrofila, aktivnost mijeloperoksidaza te ekspresiju COX-2, ciklina D1, iNOS, nuklearnog antigena stanične proliferacije (PCNA) i PGE2 u koži i kožnim tumorima. Primjenom 0,2 % i 0,5 % GSP-a smanjuje se razvoj tumora za 49 % i 66 %. GSP također smanjuje razine proupalnih citokina u miševa i to: TNF- $\alpha$  za 47 %, IL-1 $\beta$  za 59 % i IL-6 za 58 %.



**Slika 24: Inhibicijski učinak GSP na UVB induciranu ekspresiju NF- $\kappa$ B ciljnih gena (prilagođeno prema [55])**

Resveratrol djeluje na protuupalnu hipotezu kemoprevencije smanjenjem ekspresije upalnih citokina preko supresije transkripcije NF- $\kappa$ B i AP-1. NF- $\kappa$ B je ključni medijator stanične transformacije inducirane upalom. Resveratrol smanjuje ekspresiju NF- $\kappa$ B podjedinice RelA/p65 ili translokaciju p65 iz citosola u jezgru. Konačni stanični odgovor je smanjena razina TNF- $\alpha$  i COX-2. Resveratrol također smanjuje NF- $\kappa$ B aktivaciju induciranu IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i HO-1 te ekspresiju c-Jun, dio AP-1 dimera [35].

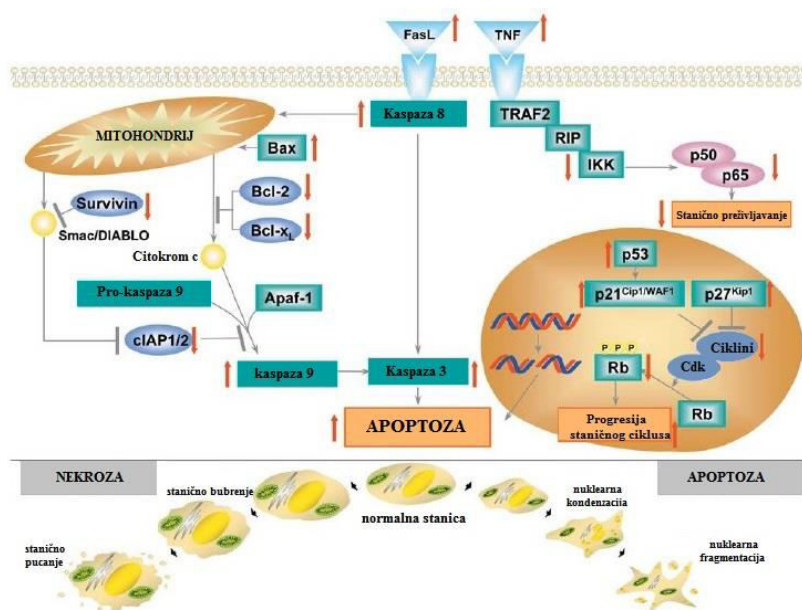
Resveratrol je učinkovit inhibitor upale u fibroblastima. Mehanizam predstavlja aktivacija SIRT1 koja značajno smanjuje TNF- $\alpha$  inducirano povećanje MMP-9, IL-6, iNOS i IL-1 $\beta$  u fibroblastima [36].

### 1.2.2.5.3. APOPTOZA

Antikancerogena svojstva resveratrola obuhvaćaju sposobnost supresije proliferacije različitih tumorskih stanica. Apoptoza je programirana stanična smrt koja uklanja oštećene i nepoželjne stanice te upravlja integritetom i funkcijom tkiva. Ona započinje različitim morfološkim promjenama u stanici poput asimetrije stanične membrane, fragmentacije jezgre, kondenzacije kromatina i kromosomske DNA fragmentacije. Apoptotički signal može biti induciran vanjskim stimulansom/ligandom te oksidacijskim stresom uzrokovanim gama/UV zračenjem i citotoksičnim lijekovima. Apoptoza je regulirana kompleksnom mrežom proapoptotičkih (Bax, Bak, PUMA, Noxa, Bim) i antiapoptotičkih proteina (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1).

Resveratrol može inducirati apoptozu aktivacijom kaspaza-8 ovisnih ekstrinzičnih puteva tipa I preko receptora smrti i aktivacijom kaspaza-9 ovisnih intrinzičnih (mitohondrijskih) puteva tipa II. Resveratrol povećava TRAIL-om induciranu apoptozu u melanomu, stanicama karcinoma prostate i kolona inhibicijom fosforilacije Akt, povećanjem ekspresije TRAIL receptora i proapoptotičkih proteina te smanjenjem ekspresije antiapoptotičkih proteina [60].

Resveratrol inhibira proliferaciju stanica inhibicijom progresije staničnog ciklusa u različitim fazama. Zaustavljanje G1 faze staničnog ciklusa resveratrol ostvaruje inhibicijom ribonukleotid reduktaze, modulacijom mreže ciklin kinaza inhibitora (CKI) i ciklin-ciklin ovisne kinaze (CDK) te mašinerije retinoblastoma.



Slika 25: Različiti mehanizmi apoptotičkog djelovanja resveratrola (prilagođeno prema [7])

Ribonukleotid reduktaza, RR je kompleksni enzim koji katalizira redukciju ribonukleotida u odgovarajuće deoksiribonukleotide, ograničavajući korak u *de novo* sintezi DNA tijekom rane S faze staničnog ciklusa. RR predstavlja metu za citostatike poput gemcitabina i hidroksiureje. Resveratrol uzrokuje potentniju inhibiciju ribonukleotid reduktaze u odnosu na hidroksiureju razaranjem katalitičkog tirozilnog radikala ribonukleotid reduktaze u stehiometrijskom omjeru.

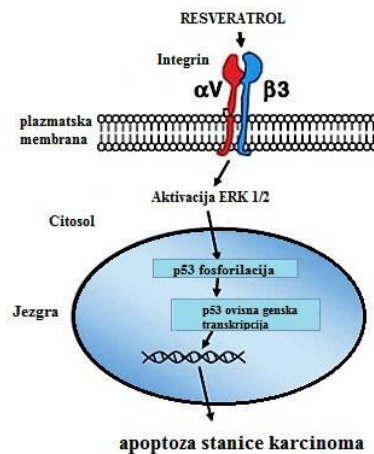
Resveratrol uzrokuje zaustavljanje staničnog ciklusa u G1 i G1/S fazi induciranjem ekspresije CDK inhibitora p21<sup>CIP1/WAF1</sup> i p27<sup>KIP1</sup> te smanjenjem ekspresije ciklina. Ciklini i ciklin ovisne kinaze (CDK) su ključni regulatori staničnog ciklusa. Ciklin D1 je važni regulator staničnog ciklusa uključen u G1/S fazu te regulaciju proliferacije i diferencijacije koji se sintetizira kao odgovor na faktore rasta. Ciklin D1 je prekomjerno izražen u karcinomima zbog neregulirane razgradnje, a resveratrol snižava njegovu razinu vjerojatno inhibicijom ekspresije i aktivnosti p38 MAPK. Resveratrol uzrokuje smanjenje proteinske ekspresije ciklina D2, ciklina E, Cdk2 i Cdk6 inhibicijom vezanja transkripcijskih faktora poput NF- $\kappa$ B i AP-1. Resveratrolom inducirana supresija ciklina D1 u stanicama kolorektalnog karcinoma je rezultat inaktivacije  $\beta$ -katenina [56].

Rb i E2F obitelj transkripcijskih faktora su važni proteini koji reguliraju progresiju staničnog ciklusa u G1/S fazi. Resveratrol uzrokuje smanjenje hiperfosforiliranog Rb proteina s relativnim povećanjem hipofosforiliranog Rb proteina. Ovaj antiproliferacijski učinak resveratrola je udružen s inhibicijom fosforilacije Rb i pratećom indukcijom Cdk inhibitora p21<sup>Cip1/WAF1</sup>, koji je transkripcijski reguliran s p53.

Tumor supresorski protein p53 je kritični transkripcijski faktor uključen u regulaciju stanične proliferacije i apoptoze te je ključni medijator u prevenciji kancerogeneze. p53 inducira brojne mitohondrijski posredovane apoptotičke gene, a smanjuje antiapoptotičke gene. Tumor supresorski protein p53 aktivira inhibitor ciklina p21 i uzrokuje zaustavljanje staničnog ciklusa u G1/S fazi.

Antiproliferacijski učinak resveratrola se očituje aktivacijom p53 ovisne apoptoze. Resveratrol povećava p53 posredovanu ekspresiju proapoptotičkih proteina (Bax, Bak, Bim, PUMA, Noxa) supresijom inhibitora apoptotičkih proteina (Bcl-2, Bcl-XL, survivin, XIAP) i aktivacijom kaspaza u različitim staničnim linijama karcinoma. Resveratrol mijenja omjer Bax:Bcl2 proteina, uzrokuje smanjenje mitohondrijskog membranskog potencijala, depolarizaciju mitohondrijske membrane te dovodi do oslobađanja mitohondrijskih proteina (citokrom c, Smac/DIABLO). Vezanjem citokroma c u citoplazmi se inducira konformacijska promjena APAF-1 što rezultira stvaranjem kompleksa apoptosoma. Konačni stanični odgovor je p53 posredovana aktivacija kaspaze-9 i kaspaze-3 što uzrokuje otvaranje mitohondrijskih pora i apoptozu ljudskih keratinocita.

Primjenom resveratrola dolazi do nakupljanja nuklearnog p53 i smanjenja citosolnog p53 u skvamoznim stanicama karcinoma glave i vrata. 24 h nakon primjene resveratrola, dolazi do aktivacije ERK1/2, JNK i p38 MAPK preko integrin  $\alpha V\beta 3$  transmembranskog receptora koji sadrži vezno mjesto za resveratrol. Translokacijom ERK1/2 u jezgru i fosforilacijom onkogen supresorskog proteina p53 na serinu 15 dolazi do povećanja ekspresije i akumulacije COX-2 u jezgri i apoptoze tumorskih stanica [57, 58].



**Slika 26: Vežanje resveratrola na integrin  $\alpha V\beta 3$  uzrokuje aktivaciju p53 (prilagođeno prema [57])**

Resveratrol uzrokuje zaustavljanje staničnog ciklusa u G1 fazi smanjenjem ekspresije survivina, antiapoptotičkog proteina (IAP) koji direktno inhibira kaspazu 3 i kaspazu 7 te aktivira kaspazu 9. Survivin je inhibitor apoptotičkih proteina čija visoka ekspresija u većini ljudskih karcinoma doprinosi izbjegavanju apoptoze i nepravilnoj mitotičkoj progresiji. Survivin sprečava oslobađanje SMAC/DIABLO iz mitohondrija u kancerozne stanice. Resveratrol inhibira proliferaciju i inducira apoptozu u stanicama karcinoma kolona smanjenjem ekspresije survivina i inhibicijom Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta [7, 59].

Resveratrol inducira zaustavljanje staničnog ciklusa u S fazi povećanjem ekspresije ciklina A, ciklina E i ciklina B1 u ljudskim stanicama melanoma. Ovaj učinak se ostvaruje direktnom inhibicijom enzima uključenih u sintezu DNA poput ribonukleotid sintaze i DNA polimeraze. Resveratrol ima bifazični učinak na DNA sintezu: pri koncentraciji 5 – 10  $\mu M$  uzrokuje trostruko povećanje sinteze DNA, a pri dozi >15  $\mu M$  je inhibira.

Zaustavljanje staničnog ciklusa u G2 fazi, resveratrol ostvaruje inhibicijom Cdk7 i Cdc2 kinaza u stanicama karcinoma kolona HT-29. Metilirani derivat resveratrola (0,3  $\mu M$ ) zaustavlja stanični ciklus u G2/M fazi inhibicijom polimerizacije tubulina te smanjuje aktivnost ornitin dekarboksilaze (ODC) i S-adenozilmetionin

dekarboksilaze što uzrokuje depleciju poliamina putrescina i spermidina, faktora rasta kancerogenih stanica. Metilirani derivat resveratrola djelomično inhibira i alosterički mijenja vezanje kolhicina na tubulinu.

Novi mitohondrijski put, kontroliran Bcl-2, kojim resveratrol inducira apoptozu je nekompetitivna inhibicija F1 kompleksa u F0/F1 ATP-aza protonskoj pumpi koja je odgovorna za sintezu ATP-a iz ADP-a tijekom oksidacijske fosforilacije.

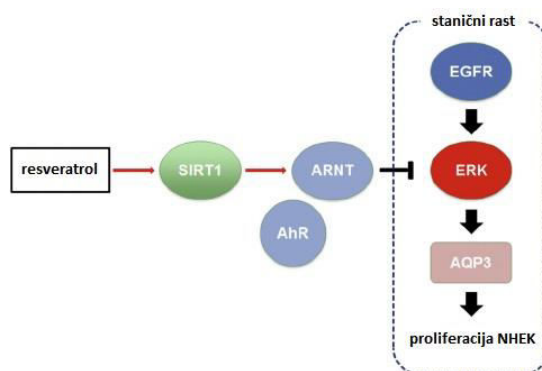
Ostale mete djelovanja resveratrola u aktivaciji mitohondrijskog puta apoptoze su DDIT3, ATF3, Src kinaza, sfingomijelinski biosintetski put te put adenil ciklaze.

Sfingomijelinski biosintetski put ima važnu ulogu u upali, zaustavljanju staničnog rasta i apoptozi, a njegova aktivacija je pod utjecajem vanjskih čimbenika poput UV zračenja, toplinskog šoka, oksidacijskog stresa, citokina (TNF- $\alpha$  i IL-1) i antikancerogenih lijekova. Antikancerogena svojstva resveratrola se povezuju s interakcijom u metabolizmu sfingolipida odnosno smanjenjem stvaranja sfingozin-1-fosfata (S1P) koji promovira staničnu proliferaciju. Resveratrol može inhibirati rast stanica povećanjem inhibitora rasta, proapoptotičkog ceramida i inducirati apoptozu u visoko invazivnoj i metastatskoj staničnoj liniji karcinoma dojke MDA-MB-231. Resveratrol djeluje proapoptotički povećanjem *de novo* sinteze ceramida aktivacijom serin palmitoiltransferaze (SPT) i neutralne sfingomijelinaze (nSMase), ključnih enzima sfingomijelin/ceramid biosintetskog puta. Ceramid inducira apoptozu promicanjem defosforilacije Bcl-2, Bax i Bad te aktivacijom kaspaze 3 i direktnim vezanjem na fosfolipazu A2 čime regulira katepsin D. Katepsin D je prekomjerno izražen u epitelnim stanicama karcinoma dojke te je marker loše prognoze. Resveratrolom inducirana stanična smrt uključuje lizosomalne proteolitičke puteve u kojima lizosomalni katepsin D povećava aktivnost kaspaze. Inhibicija katepsina D prevenira oligomerizaciju Bax, mitohondrijsku membransku permeabilizaciju, oslobađanje citokroma c i aktivaciju kaspaze 3 [62].

#### **1.2.2.5.3.1. HIPERPROLIFERACIJSKI KOŽNI POREMEĆAJI**

Resveratrol predstavlja novi terapijski pristup u liječenju hiperproliferacijskih kožnih poremećaja poput psorijaze, atopijskog dermatitisa i kožnih karcinoma. Antiproliferacijski učinak resveratrola se ostvaruje inhibicijom ekspresije i sinteze IL-8, inhibicijom fosforilacije EGFR-a. IL-8 je mitogeni faktor keratinocita koji je jako izražen u hiperproliferacijskom epidermisu psorijatičnih lezija i psorijatičnih keratinocita [61].

Resveratrol inhibira proliferaciju normalnih ljudskih epidermalnih keratinocita (NHEK) kroz SIRT1/ARNT/ERK/AQP3 signalni put u koncentraciji od 40  $\mu$ M. Akvaporin 3 je najbrojniji akvaporin u keratinocitima epidermisa koji je prekomjerno izražen u hiperplastičnim epidermalnim poremećajima. Akvaporini su obitelj transmembranskih kanala koji transportiraju vodu i male molekule poput glicerola. Prekomjerna ekspresija AQP3 inducira proliferaciju keratinocita i epidermalnu hiperplaziju. Resveratrol inducira ekspresiju SIRT1 što rezultira povećanom ekspresijom ARNT koji defosforilira ERK. Krajnji rezultat je smanjenje ekspresije AQP3 te posljedično smanjenje proliferacije NHEK [63].



**Slika 27: Mehanizam inhibicijskog učinka resveratrola na proliferaciju NHEK (prilagođeno prema [63])**

Hipertrofični ožiljak je dermalni fibroproliferacijski poremećaj karakteriziran prekomjernim taloženjem ekstracelularnog matriksa te abnormalnim invazivnim rastom fibroblasta nakon dubokih dermalnih ozljeda poput ogrebotina i opekline. Hipertrofični ožiljak predstavlja eritematozne, podignute, pruritičke lezije u liječenoj koži što rezultira kozmetičkim deformacijama i funkcionalnim pogoršanjem koje ozbiljno utječe na kvalitetu života pacijenta. Bez obzira na mogućnost izbora liječenja, hipertrofični ožiljci predstavljaju važni izazov u plastičnoj kirurgiji. Resveratrol inhibira stanični rast zaustavljanjem staničnog ciklusa u G1 fazi te smanjenjem S i G2/M faze u fibroblastima. Resveratrol inducira apoptozu u fibroblastima smanjenjem razine hidroksiprolina i/ili kolagena te ekspresije prokolagena tip I i tip III na razini mRNA. Razina hidroksiprolina, jedinstvene imino kiseline koja se tradicionalno koristi za kvantifikaciju razine kolagena je značajno snižena nakon 24 h inkubacije resveratroлом pri koncentraciji 75 – 300  $\mu$ M.

Resveratrol može inhibirati AGE (engl. *advanced glycation end-product*), induciranu proliferaciju i sintezu kolagena supresijom aktivnosti prolil hidroksilaze, markera sinteze kolagena i smanjenjem ekspresije TGF- $\beta$ 1 na razini mRNA. Primjena resveratrola smanjuje acetilaciju Smad3, važnog faktora kojim TGF- $\beta$ 1 stimulira fibroblastični proces te inhibira ekspresiju proupalnog citokina IL-17 koji stimulira sintezu kolagena.



#### 1.2.2.5.4. INHIBICIJA KANCEROGENA

Važni mehanizam u prevenciji kancerogeneze predstavlja direktna modulacija aktivnosti ili ekspresije enzima aktiviranih kancerogenima u kemijski induciranoj kancerogenezi. Oksidacijski metabolizam enzimima faze I rezultira pretvorbom prokancerogena u reaktivne elektrofilne intermedijare koji se tada metaboliziraju enzimima faze II konjugacijom s hidrofilnim entitetima. Nedovoljna detoksikacija reaktivnih elektrofilnih intermedijara enzimima faze II potencira genotoksičnost čime se inicira kancerogeni proces.

Anti-inicijacijska aktivnost resveratrola u kancerogenezi se ostvaruje kroz dva primarna molekulska mehanizma koji uključuju supresiju metaboličke aktivacije i/ili indukciju detoksikacije kancerogena modulacijom enzima metaboličkih reakcija faze I i faze II. Inhibicija metaboličke aktivacije kancerogena može biti ovisna i neovisna o arilhidrokarbonskom receptoru (AhR). Enzimi faze I uključeni u aktivaciju prokancerogena su CYP enzimi koji sudjeluju u metabolizmu velikog broja lijekova [62].

Resveratrol je potentni inhibitor humanog CYP1A1 te nešto slabiji inhibitor CYP1A2 pri čemu je 50 puta selektivniji za CYP1A1. Resveratrol učinkovito smanjuje ekspresiju i metaboličku aktivnost CYP1A1 i/ili CYP1B1 induciranu 7,12-dimetilbenzoapirenom (DMBA); dioksinom i 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksinom (TCDD) u diferenciranim keratinocitima. Pri nanomolarnim koncentracijama, resveratrol suzbija AhR posredovanu indukciju CYP1A1 bez utjecaja na XRE nakon izlaganja TCDD-u. Mikromolarne koncentracije resveratrola reduciraju AhR/ARNT kompleks na CYP1A1 promotoru što rezultira gotovo potpunom inhibicijom ekspresije i metaboličke aktivnosti CYP1A1. Resveratrol smanjuje ekspresiju CYP1A1, enzima važnog u aktivaciji poznatog kancerogena benzoapirena kroz AhR neovisni posttranskripcijski put. Inhibicijski učinak resveratrola na ekspresiju CYP1A1 se očituje smanjenjem štetnih učinaka benzoapirena u plućnom tkivu *in vivo* [27, 33, 61].

Antiproliferacijski učinak resveratrola na stanice karcinoma je rezultat metaboličke pretvorbe resveratrola u piceatanol, poznati antileukemik, enzimom CYP1B1 čija je ekspresija povećana u brojnim tumorskim tkivima. CYP1B1 aktivira brojne okolišne mutagene i katalizira 4-hidroksilaciju estrogena, važni korak u hormonalnoj kancerogenezi.

Resveratrol povećava detoksikaciju kancerogena enzimima faze II u *in vitro* i *in vivo* sustavima. Najvažniji mehanizam predstavlja indukcija Nrf2 signalnog puta koja pridonosi zaštiti stanica od kancerogena aktiviranih enzimima faze I [62].

### 1.2.2.5.5. INVAZIJA, ANGIOGENEZA I METASTAZIRANJE

Resveratrol ostvaruje svoj inhibicijski učinak na promocijsku fazu kancerogeneze djelovanjem na invazivnost, angiogenezu i metastaziranje tumora. Stanična invazija i metastaziranje su olakšani proteolitičkom razgradnjom bazalne membrane i vezivnog tkiva. Ekspresija endopeptidaza i matriksnih metaloproteinaza korelira s proteolitičkom razgradnjom ekstracelularnog matriksa i metastazama tumora, nakon čega slijedi angiogeneza s brzim rastom. Adhezijske molekule (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1) imaju važnu ulogu u adheziji tumorskih stanica na endotelne stanice jer na taj način posreduju u metastaziranju tumorskih stanica [27].

Resveratrol djeluje na invaziju i metastaziranje tumorskih stanica inhibicijom NF- $\kappa$ B transkripcijske aktivnosti i DNA vezanja NF- $\kappa$ B na MMP-9 promotoru te supresijom adhezijskih molekula. Resveratrol direktno inhibira rast HUVEC-a smanjenjem gelanolitičke aktivnosti MMP-2 i inhibira vezanje endotelnih stanica na komponente bazalne membrane fibronektin i laminin.

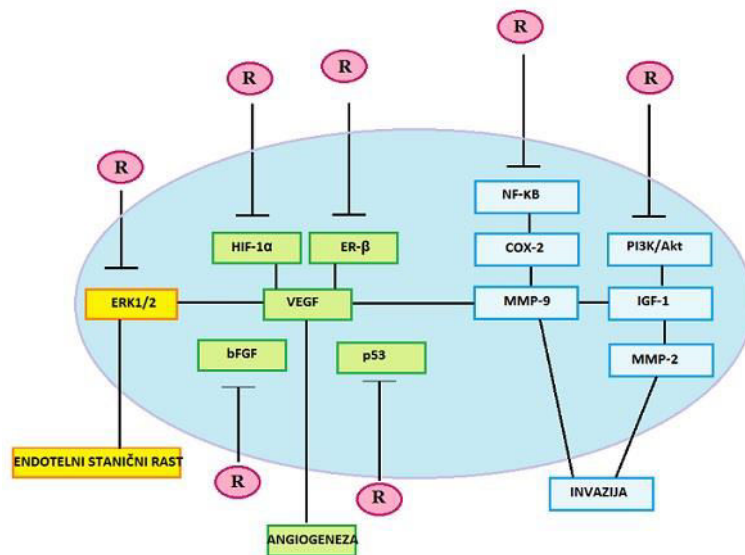
Angiogeneza je proces stvaranja krvnih žila koji ima važnu ulogu u rastu i razvoju tumora, invaziji i metastaziranju te ostalim bolestima i zarastanju rana. COX-2 i ODC promiču angiogenezu, a njihova supresija resveratrolokom ima važnu ulogu u njegovom inhibicijskom učinku na vaskularizaciju i rast tumora.

Tumorske stanice se adaptiraju na hipoksiju aktivacijom i stabilizacijom HIF-1 $\alpha$  (engl. *hypoxia inducible factor-1 $\alpha$* ), transkripcijskog faktora odgovornog za metabolizam glukoze i supresiju apoptoze u stanicama koji regulira ekspresiju proteina VEGF udruženog s angiogenim i invazivnim signalnim kaskadama. Primjena resveratrola značajno smanjuje razinu ROS-a i ekspresiju HIF-1 $\alpha$  te VEGF u stanicama karcinoma jajnika što se objašnjava inaktivacijom PI3K/Akt signalnog puta, povećanjem proteasomalne razgradnje HIF-1 $\alpha$  i posljedično supresijom VEGF. Dodatno, niske razine HIF-1 $\alpha$  smanjuju unos glukoze u kancerozne stanice što uzrokuje nižu ekspresiju GLUT1 i slabiji glikolitički metabolizam.

Resveratrol u dozi 1 – 2,5  $\mu$ M učinkovito inhibira VEGF posredovanu fosforilaciju tirozina kadherina i  $\beta$ -katenina što rezultira inhibicijom aktivacije Src kinaze i posljedično inhibicijom VEGF inducirane angiogeneze [49, 119].

TGF- $\beta$  (engl. *tumor growth factor  $\beta$* ) je odgovoran za progresiju tumora u epitelnim tumorima i indikator je loše prognoze. Prekomjerna ekspresija TGF- $\beta$  u ranom stadiju kancerogeneze djeluje primarno supresivno na rast tumora. Međutim, u kasnijim stadijima kancerogeneze, prekomjerna ekspresija TGF- $\beta$  vodi epitelialno mezenhimalnoj tranziciji (EMT), progresiji tumora i metastaziranju. Centralni događaj u EMT je gubitak ekspresije epitelnog kadherina, površinskog receptora koji ima glavnu ulogu u stvaranju adhezijskih čvorova te je vrlo često mutiran ili izgubljen u stanicama karcinoma. Poznato je da je gubitak E-kadherina povezan s povećanjem invazivnog potencijala stanica karcinoma.

Resveratrol povećava razinu E-kadherina i inhibira UVB induciranu ekspresiju TGF- $\beta$ 2 *in vivo* i *in vitro*, smanjenjem fosforilacije Akt i CREB, transkripcijskog faktora koji regulira ekspresiju TGF- $\beta$ 2 [23, 64].



**Slika 28: Inhibicijski učinak resveratrola na progresiju kancerogeneze (prilagođeno prema [65])**

### 1.2.2.5.6. RESVERATROL I ESTROGEN

Resveratrol je fitoestrogen koji ima strukturnu sličnost s dietilstilbestrolom, sintetskim estrogenom te može djelovati agonistički ili antagonistički na estrogenske receptore ovisno o eksperimentalnim uvjetima. Unatoč brojnim *in vivo* i *in vitro* istraživanjima, primjena resveratrola kao fitoestrogena je još uvijek kontroverzna.

Resveratrol se može vezati na ER- $\alpha$  i ER- $\beta$  čime povećava transkripcijsku aktivnost estrogen ovisnih gena. Reakcija vezanja *trans*-resveratrola na ER- $\alpha$  je stereoselektivna s većim afinitetom vezanja od *cis*-stereoizomera. Niske koncentracije *cis*-resveratrola i *trans*-resveratrola (0,1 – 1  $\mu$ M) te srednje koncentracije *cis*-resveratrola (10  $\mu$ M) ne interferiraju s estrogenim receptorima, a srednje koncentracije *trans*-resveratrola (10 i 25  $\mu$ M) i više koncentracije *cis*-resveratrola (25  $\mu$ M) djeluju kao superagonisti estradiola. Pri koncentraciji (3 – 10  $\mu$ M) potrebnoj za njegove ostale farmakološke učinke, resveratrol inhibira vezanje estrogena na estrogenski receptor [7, 64].

Resveratrol inhibira rast ER-pozitivnih MCF-7 stanica karcinoma dojke. Ekspresija TGF- $\alpha$  i IGFR mRNA je snižena, a ekspresija TGF- $\beta$ 2 mRNA je povišena u MCF-7 stanicama kultiviranim u prisutnosti resveratrola (10  $\mu$ M). Resveratrol, parcijalni ER agonist, djeluje kao ER antagonist u prisutnosti estrogena, što rezultira inhibicijom rasta ljudskih stanica karcinoma dojke.

Većina *in vitro* studija ukazuje na inhibicijski učinak resveratrola na rast karcinoma dojke, iako treba uzeti u obzir rezultate malobrojnih *in vitro* studija koji ukazuju da estrogenski učinci resveratrola mogu povećati staničnu proliferaciju estrogen ovisnih T47D stanica [19].

Resveratrol u koncentraciji od 25 – 50  $\mu$ M smanjuje katalitičku aktivnost rekombinantne aromataze, enzima koji katalizira tri hidroksilacijske reakcije pretvorbe C-19 androgena u C-18 estrogene. Ekspresija aromataze je povećana u tkivu karcinoma dojke u odnosu na normalno tkivo.

Resveratrol se može koristiti u dermokokozmetici kao anti-aging sastojak zbog njegova djelovanja na aktivaciju estrogenskih receptora. Žene u postmenopauzi gube 1 % kolagena godišnje što uzrokuje tanku, naboranu i fragilnu kožu. Naime, fitoestrogeni su mogući selektivni citoplazmatski i membranski agonisti estrogenskih receptora koji usporavaju starenje kože bez potencijalnih rizika hormonske nadomjesne terapije. Estrogen povećava dermalni kapacitet zadržavanja vode i sadržaj glikozaminoglikana te održava sadržaj kolagena i elastičnost kože. Insuficijencija estrogena smanjuje obranu od oksidacijskog stresa, koža postaje tanja s manje kolagena, smanjenom elastičnošću, povećanim boraњem, povećanom suhoćom i smanjenom prokrvljenošću [56].

Estrogenska nadomjesna terapija ublažava gubitak kolagena u koži s kliničkim znakovima starenja. Biljni fitoestrogeni poput resveratrola su učinkoviti u smanjenju znakova starenja kože aktiviranjem estrogenog receptora  $\beta$  (ER- $\beta$ ), što rezultira povećanjem ekspresije antioksidacijskih enzima bez rizika udruženih s primjenom HNL-a.

### 1.2.2.5.7. INHIBICIJA GLIKOLITIČKIH ENZIMA

Heksokinaza (HK) katalizira fosforilaciju glukoze u glukoza-6-fosfat, prvi ireverzibilni korak u glikolitičkom putu. Heksokinaza je prekomjerno izražena u mnogim neoplastičnim stanicama gdje doprinosi proliferaciji i preživljavanju tumorskih stanica povećanjem aerobne glikolize. HK II se bliže veže na anionske kanale ovisne o naponu (VDAC) na OMM u tumorskim stanicama nego u normalnim stanicama što uzrokuje oslobađanje Bcl-X<sub>L</sub> i njegovo vezanje na Bax, čime se prevenira Bax-Bax oligomerizacija ili Bak-Bak interakcija. HK II se natječe za vezno mjesto VDAC s antiapoptotičkim proteinom Bcl-X<sub>L</sub>. Glikogen sintaza kinaza 3β fosforilira VDAC te ga odvaja od HK II čime se promovira vezanje Bcl-X<sub>L</sub> na VDAC, ostavljajući Bax slobodan od Bcl-X<sub>L</sub>. Slobodni Bax ulazi u interakciju s Bak/Bax za oslobađanje citokroma c, što vodi do mitohondrijski posredovane apoptoze.

Resveratrol smanjuje translokaciju HK II na OMM i interakciju HK II-VDAC i olakšava odvajanje HK II od VDAC preko inhibicije RTK/PI3K/Akt/mTOR signalnog puta. Odvajanje HK II od mitohondrija može povećati osjetljivost mitohondrija na stanično oštećenje inducirano cisplatinom što vodi do povećane apoptotičke smrti stanica. Resveratrol također inhibira ekspresiju HIF-1α, transkripcijskog faktora koji reprogramira metabolizam kancerogenih stanica. HIF-1α je prekomjerno izražen u mnogim karcinomima u ljudi te je odgovoran za visoki udio glikolize indukcijom glikolitičkih enzima poput HK II.

6-fosfofrukto-1-kinaza (PFK1) katalizira prijenos fosfata s ATP-a na fruktoza-6-fosfat pri čemu nastaje fruktoza-1,6-difosfat i ADP. Ekspresija izoforme PFK-L je direktno povezana s agresivnošću i glikolitičkom učinkovitošću u staničnim linijama karcinoma dojke. Resveratrol smanjuje vijabilnost, potrošnju glukoze i sadržaj ATP-a u staničnoj liniji karcinoma dojke MCF-7 što se povezuje s inhibicijskim učinkom resveratrola na PFK1. Resveratrol direktno inhibira pročišćeni PFK1 kroz disocijaciju PFK1 iz potpuno aktivnog tetramera u manje aktivne dimere.

Piruvat kinaza (PK) katalizira defosforilaciju fosfoenolpiruvata u piruvat i ATP. mTOR signalni put povećava ekspresiju PK izoenzima M2 (PKM2) preko HIF-1α, a PKM2 promovira transkripcijsku aktivnost HIF-1α, aktivirajući glikolizu na nekoliko razina i kompenzirajući nisku glikolitičku aktivnost PKM2. Resveratrol smanjuje ekspresiju PKM2 inhibicijom mTOR signalnog puta što rezultira supresijom kancerogeneze.

### **1.2.2.5.8. RESVERATROL U KOMBINACIJSKOJ KEMOTERAPIJI**

Klinički dokazi resveratrola kao učinkovitog suplementa za prevenciju i liječenje karcinoma su oskudne. Provedene kliničke studije učinka resveratrola na kemoprevenciju se uglavnom odnose na karcinome dojke, jetre, kolona, pankreasa i prostate. Rezultati tih studija uglavnom pozitivno koreliraju s primjenom resveratrola osim u nekim slučajevima karcinoma dojke gdje je zabilježena promocija rasta tumora dojke ovisno o staničnom tipu i ostalim faktorima. Iz tog razloga se resveratrol u ljudi treba primjenjivati s oprezom.

Resveratrol ne može biti korišten kao primarni citostatik jer stanične strukture poput mikrotubula ili enzima sinteze nukleotida ne predstavljaju mete njegova djelovanja. Dodatak resveratrola standardnom kemoterapijskom režimu može biti korisno u prevenciji razvoja sekundarnih malignosti koje su rezultat mutagenih učinaka kemoterapije ili radioterapije. Osim toga, resveratrol pridonosi prevenciji dugotrajnih morbiditeta povezanih sa citostatskom terapijom poput kardiomiotoksičnosti koja nastaje primjenom antraciklinskog kemoterapeutika doksorubicina [43].

Osnovna strategija za liječenje tumora rezistentnih na kemoterapiju je korištenje kombinacije citostatika. Učinkovitost standardne kombinacijske kemoterapije je često ograničena i nezadovoljavajuća zbog različite farmakokinetike lijekova što uzrokuje smanjenje sinergističkog citostatskog učinka. Mnoge studije su pokazale da prirodne tvari poput resveratrola povećavaju terapijski odgovor karcinoma na kemoterapiju te smanjuju neželjene nuspojave i toksičnost.

Primjerice, kombinacija resveratrola i kurkumina predstavlja dodatnu terapijsku opciju za liječenje kolorektalnog karcinoma jer je sposobna značajno inhibirati rast tumorskih stanica kolona s popratnim povećanjem apoptotičkih stanica u tretiranim miševima.

Resveratrol ima kardioprotektivni učinak i povećava osjetljivost stanica karcinoma na kemoterapeutik. Kombinacija 10  $\mu\text{M}$  doksorubicina i  $\geq 100 \mu\text{M}$  resveratrola rezultira značajnim smanjenjem toksičnih učinaka doksorubicina na topoisomerazu II $\alpha$ . Pri visokim koncentracijama ( $\geq 200 \mu\text{M}$ ), resveratrol smanjuje unutarstaničnu koncentraciju doksorubicina, a posljedično i nepoželjne nuspojave [64].

Resveratrol pojačava citotoksični učinak kemoterapeutika doksorubicina i gemcitabina u B16 kemorezistentnim stanicama melanoma *in vitro* te inhibicijom rasta tumora *in vivo*. *In vitro* i *in vivo*, resveratrol sinergistički povećava antitumorski učinak 5-fluorouracila (5-FU) zaustavljanjem staničnog ciklusa u S fazi te apoptozom tumora. Kombinacija 5-FU i resveratrola značajno povećava udio apoptotičnih stanica i razinu aktiviranih kaspaza 3, odcjepljenog PARP-a i p53 te omjer Bax/Bcl-2. Također omogućuje učinkovitiju inhibiciju staničnog rasta i indukciju apoptoze u stanicama karcinoma u usporedbi sa samim 5-FU.

Primjena nanotehnologije predstavlja obećavajući pristup za dokazivanje učinkovitosti kombinacijske kemoterapije. Nanonosači mogu dostaviti relativno visoku koncentraciju kombinacijskih kemoterapeutika u ciljanu tumorsku stanicu unutar jednog sustava promičući njihov sinergistički učinak. Time osiguravaju inhibiciju efluksnih mehanizama kanceroznih stanica povećavajući učinkovitost liječenja. Osim toga, nanočestice s uklopljenim lijekom se mogu akumulirati u tumorskim stanicama zbog povećane permeabilnosti i učinka zadržavanja [7].



## 1.2.2.6. STARENJE KOŽE

Starenje kože se očituje kroničnom suhoćom i svrbežom, kontaktnim dermatitisom i upalom te malignim tumorima kože. Starenje kože je kompleksni degeneracijski proces koji uključuje genetske, okolišne i hormonalne mehanizme, a rezultat je intrinzičnih (kronoloških) i ekstrinzičnih (okolišnih) komponenata. Slobodni radikali ima ključnu ulogu na ekstrinzične i intrinzične čimbenike. Oni direktno djeluju na faktore rasta i receptore citokina u keratinocitima što dovodi do kožne upale. Za razliku od kronološkog starenja gdje se slobodni radikali stvaraju normalnim metabolizmom, u ekstrinzičnom starenju se slobodni radikali stvaraju nakon izlaganja kože ekstrinzičnim faktorima.

Intrinzično starenje ili kronološko starenje je mnogo kompleksniji progresivni proces obilježen gubitkom ekstracelularnog matriksa i ravnanjem dermalno-epidermalne veze. Stanično starenje uključuje zaustavljanje staničnog rasta u G1 fazi staničnog ciklusa kad stanice dosegnu kraj njihova replikacijskog životnog vijeka. Prirodno ostarjela koža je tanka, fragilna i fino izborana.

Ekstrinzično (prijevremeno) starenje je uzrokovano vanjskim čimbenicima poput UV zračenja, kemijskih zagađivača, loše prehrane, pušenja i konzumacije alkohola. Pušači u četrdesetima često imaju bore lica slične nepušačima u šezdesetima. Prepoznato je da duhanski dim ima negativni učinak na kožu iako molekularni mehanizam nije u potpunosti razjašnjen. Duhanski dim sadrži više od 3800 tvari uključujući brojne netopljive policikličke aromatske ugljikovodike (PAH) koji aktiviraju signalni put aril hidrokarbonskog receptora (AhR). Primjena inhibitora AhR puta poput flavonoida na kulturu fibroblasta, blokira ekspresiju CYP1B1 i MMP-1.

Glikacijski krajnji produkti (*engl. advanced glycation end-products, AGE*) doprinose razvoju kliničkih znakova starenja te uzrokuju aktivaciju citokina i matriksnih metaloproteinaza. Njihovo nakupljanje aktivira AGE receptor (RAGE) koji je izražen u fibroblastima, keratinocitima, imunološkim stanicama, neuronima, stijenkama krvnih žila, koštanim i tumorskim stanicama. Međusobne interakcije između upalnih signala i RAGE snažno podržavaju proizvodnju malignih stanica. Melanom, solidni tumori, kemijski inducirana kožna kancerogeneza i karcinom pločastih stanica imaju pojačanu ekspresiju RAGE koja pogoduje nastanku uvjeta za akutnu i kroničnu upalu te razvoj karcinoma.

Oštećenje i disorganizacija ekstracelularnih matriksnih proteina poput kolagena, fibronektina i elastina su glavne karakteristike intrinzičnog i ekstrinzičnog starenja kože zbog povećane aktivacije proteolitičkih enzima matriksnih metaloproteinaza poput kolagenaze i elastaze. Matriksne metaloproteinaze (MMP) su skupina transmembranskih cink endopeptidaza koje su odgovorne za razgradnju ekstracelularnog matriksa u koži.

Inhibicija enzimske aktivnosti matriksnih metaloproteinaza prirodnim biljnim produktima kao što su groždani polifenoli može predstavljati obećavajući pristup za prevenciju ekstrinzičnog starenja kože [46].

U epidermisu ljudskih kožnih modela, netoksične doze resveratrola (20 – 100  $\mu$ M) stimuliraju neosintezu GSH aktivacijom Nrf2 signalnog puta i štite epidermis od jakog oksidacijskog stresa. Time se prevenira smrt keratinocita. Također resveratrol inducira glutamilcisteinilgazu i glutation peroksidazu-2 što rezultira povećanjem razine glutationa u NHEK [66].

Učinak resveratrola na starenje keratinocita i proliferaciju je reguliran AMPK-FOXO3 signalnim putem te u nekim situacijama SIRT1. Resveratrol povećava razinu FOXO3 proteina u keratinocitima te inhibira staničnu proliferaciju [67].

Zbog njihova prirodna porijekla i niske toksičnosti, polifenoli su obećavajuća alatka u uklanjanju uzroka i posljedica starenja kože, kožnih bolesti i oštećenja kože. Njihova zaštitna uloga se očituje u prevenciji ili smanjenju progresije nekih lakših kožnih poremećaja poput bora i akne te ozbiljnih životno ugrožavajućih bolesti poput karcinoma kože [46].

### 1.2.2.6.1. FOTOKANCEROGENEZA

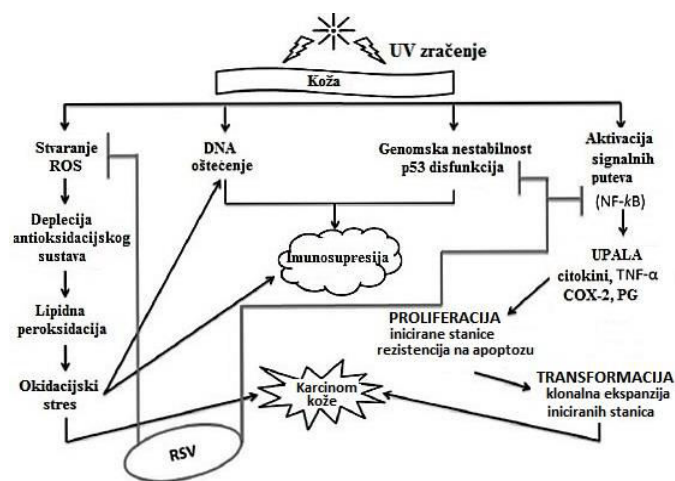
Ekstrinzično starenje ili fotostarenje je kumulativni proces koji nastaje kroničnim izlaganjem kože okolišnim čimbenicima poput duhanskog dima i ultraljubičastog (UV) zračenja koje ima glavnu ulogu u etiologiji fotostarenja i kožnih karcinoma. Indukcija matriksnih metaloproteinaza (MMP) ima važnu ulogu u patogenezi fotostarenja.

Fotoostarjela koža je karakterizirana promjenama u dermalnom vezivnom tkivu. Histopatološke dermalne promjene u fotostarenju se očituju smanjenjem kolagena i njegovih prekursora te degeneracijom elastičnih vlakana koja se zamjenjuju amorfnom masom. Razgradnja postojeće mreže vlakana je primarno povezana s ubrzanjem aktivnosti dermalnih elastaza koje proizlaze iz fibroblasta i iz infiltracije upalnih neutrofila kao odgovor na akutno UV zračenje. Zadebljala, hrapava i suha koža, grube linije i duboke bore, teleangiektazije, nepravilna pigmentacija, blijedilo, gubitak elastičnosti, purpurične lezije i maligne neoplazme su klinički znakovi fotooštećene kože. Za razliku od intrinzički ostarjele kože koja pokazuje jaku redukciju broja stanica, fotoostarjela koža je karakterizirana povećanjem broja fibroblasta koji postaju hiperplastični te povećanim brojem mastocita i mononuklearnih stanica kao rezultat kroničnog upalnog procesa. Fotoostarjela koža je karakterizirana povećanjem mutacija mitohondrijskog genoma odnosno povećanom mutacijom *mtDNA* u dermisu. Prisutnost velikih delecija *mtDNA* u ljudskim fibroblastima je uzročno povezana s fotostarenjem zbog promijenjene genske ekspresije u stanicama i posljedično sa strukturnim i funkcionalnim promjenama ljudskog dermisa koje su karakteristične za fotoostarjelu kožu [68].

Svaki sedmi Amerikanac godišnje oboli od karcinoma kože. Učestalost kožnih karcinoma je u stalnom porastu i predstavlja javno-zdravstveni problem na svjetskoj razini jer čini oko 30 % novodijagnosticiranih karcinoma odnosno 1,3 milijuna novih slučajeva godišnje u Americi. Glavni čimbenici odgovorni za povećanu učestalost kožnih karcinoma su starenje stanovništva odnosno kontinuirano povećanje očekivanog životnog vijeka, oštećenje ozonskog sloja i primjena izvora umjetnog UV zračenja poput solarija te promjena prehranbenih i životnih navika. Najčešći karcinomi kože su karcinom bazalnih stanica (76 %), karcinom skvamoznih stanica (19 %) i melanom (5 %). Melanom ima najveću stopu smrtnosti kožnih karcinoma s visokim potencijalom metastaziranja jer slabo reagira na kemoterapiju. Oko 68 000 ljudi godišnje oboli od melanoma, od kojih 8700 premine.

Brojni klinički i eksperimentalni dokazi pokazuju da imunološki čimbenici pridonose patogenezi UV induciranih kožnih karcinoma u miševa te vjerojatno i u ljudi. Poznato je da sunčevo zračenje djeluje imunosupresivno što je u korelaciji s visokim postotkom kožnih karcinoma u ljudi koji žive u regijama jake izloženosti sunčevom zračenju. Kronično izlaganje suncu uzrokuje stanjivanje *stratum corneum* i redukciju broja Langerhansovih stanica čime se objašnjava imunosupresija. Učestalost kožnih karcinoma, osobito SCC je povećana u transplantiranih pacijenata što je vjerojatno posljedica kronične imunosupresivne terapije.

Epidemiološke, kliničke, biološke i laboratorijske studije su pokazale da je sunčevo UV zračenje glavni uzročnik razvoja kožnih karcinoma i ostalih kožnih hiperproliferacijskih poremećaja poput aktiničkih keratoza za koje se smatra da prethode neoplastičnim promjenama. Prekomjerno i dugotrajno izlaganje kože UV zračenju dovodi do oksidacijskog stresa, oštećenja DNA i genskih mutacija, razvoja upale, poremećaja regulacije staničnih signalnih puteva te imunosupresije. Ove stanične promjene dovode do razvoja kožnih poremećaja poput hiperpigmentacije, fotostarenja ili prijevremenog starenja kože te razvoja melanomskih i nemelanomskih kožnih karcinoma.

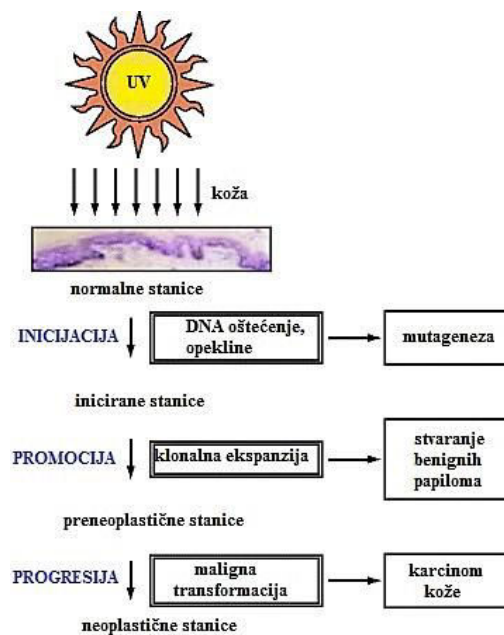


**Slika 29: Mogući stanični mehanizmi u patogenezi karcinoma kože (prilagođeno prema [31])**

Koža predstavlja prvu obrambenu barijeru od vanjskih fizičkih, kemijskih i okolišnih čimbenika uključujući sunčevo UV zračenje. Melanin može apsorbirati UV zračenje i štititi kožne stanice od štetnih učinaka UV zračenja. Ukoliko udio proizvedenog melanina nije dovoljan, pojavljuju se opekline kao rezultat upalnog procesa. Koža ima kompleksni endogeni antioksidacijski sustav koji je štiti od oksidacijskog stresa, uključujući neenzimske (askorbinska kiselina, tokoferol, ubikvinol i glutation) i enzimске antioksidanse (katalaza, superoksid dismutaza, tioredoksin reduktaza, glutation peroksidaza i reduktaza) [5].

Sunčevo UV zračenje penetrira u kožu i ulazi u interakciju s različitim stanicama lokaliziranim u različitim slojevima kože. Osim UV zračenja, NIR i IR zračenje također doprinose fotostarenju. NIR zračenje valne duljine 770 – 1400 nm duboko penetrira u ljudsku kožu, a opseg oštećenja kolagena na molekularnoj razini je sličan onom koje uzrokuje UVA zračenje. IR zračenje primarno apsorbiraju bakrovi ioni u kompleksu IV mitohondrijskog respiracijskog lanca.

Fotokancerogeneza je kompleksni višefazni proces posredovan različitim staničnim, biokemijskim i molekularnim promjenama koji se sastoji od inicijacije, promocije i progresije tumora. Inicijacija tumora je povezana s genotoksičnim učincima UV zračenja. Promocija tumora je reverzibilna, a nastaje klonalnom ekspanzijom iniciranih stanica te predstavlja pogodnu metu za prevenciju, povratak ili usporavanje procesa kancerogeneze. Progresija tumora podrazumijeva malignu transformaciju papiloma u karcinom uz dodatni genotoksični stimulans [13].

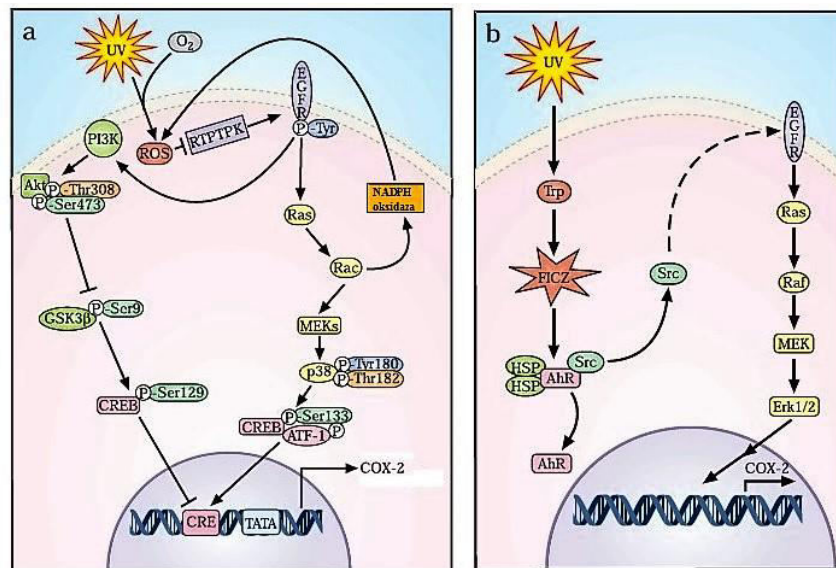


**Slika 30: Faze procesa fotokancerogeneze (prilagođeno prema [70])**

Niske doze UVB zračenja uzrokuju staničnu signalnu kaskadu koja obuhvaća povećanje ekspresije EGFR i GTP-vezanog regulatornog proteina p21Ras, ERK, JNK i p38. Energija se prenosi na molekularni kisik pri čemu nastaje ROS koji direktno reagira s cisteinom aktivnog mjesta tirozin fosfataza. ROS uzrokuje ligand neovisnu aktivaciju EGFR koja aktivira brojne signalne puteve poput Ras/Rac1/p38 MAPK i PI3K/Akt. Osim aktivacije p38 MAPK puta, Rac1 aktivacija inducira dodatnu sintezu ROS kroz aktivaciju NADPH oksidaze.

Aktivacija ovih signalnih puteva rezultira transkripcijskom aktivacijom gena za COX-2. p38 aktivacija MAPK uzrokuje fosforilaciju CREB i aktivaciju transkripcijskog faktora-1, koji se tada veže na CRE strani COX-2 genskog promotora, čime se aktivira transkripcija COX-2. Aktivacija PI3K puta uzrokuje fosforilaciju i aktivaciju Akt na Thr-308 i Ser-473 koji tada fosforiliranjem na Ser-9 inaktiviraju glikogen sintaza kinazu-3 $\beta$ .

Drugi mehanizam kojim UVB zračenje uzrokuje aktivaciju EGFR i indukciju COX-2 je AhR mehanizam. Apsorpcijom energije UVB zračenja, intracelularni triptofan konvertira u fotoprodukt, 6-formilindol-[2,3-b]-karbazol (FICZ), ligand arilhidrokarbonskog receptora. Vežanje liganda FICZ na AhR uzrokuje oslobađanje AhR iz inaktivnog kompleksa koji uključuje protein 90 toplinskog šoka (Hsp90) i udružene proteine poput Src. Src se tada translocira u staničnu membranu i aktivira EGFR. Rezultat ovog signalnog puta je aktivacija Ras/Raf/MEK/ERK1/2 puta što uzrokuje povećanu transkripciju COX-2 [5].



**Slika 31: Mehanizmi aktivacije EGFR i transkripcije COX-2 putem ROS-a (A) i putem AhR (B)**

(prilagođeno prema [71])

Rani događaj u UV induciranoj kancerogenezi predstavljaju značajne mutacije p53 tumor supresorskog gena i mutacijska inaktivacija p53 koja pridonosi skvamoznom staničnom karcinomu u ljudi i miševa. Fiziološke doze UVA zračenja induciraju p53 mutacije u ljudskoj koži što dokazuje da je UVA zračenje, isto kao i UVB zračenje, mutageno za keratinocite [60].

Genetički materijal je oštećen UV zračenjem jer DNA direktno apsorbira UVB zračenje. Time je olakšana dimerizacija pirimidinskih baza što uzrokuje mutacije i pogreške u replikaciji DNA. UVA zračenje također može inhibirati replikaciju i popravak DNA. Reaktivni kisik i dušik mogu direktno uništiti kromatin i promovirati mutagenezu cijepanjem lanca DNA, stvaranjem oksidacijskih adukata DNA, povezivanjem DNA i proteina ili iniciranjem signalnih transdukcijskih procesa koji vode upali [31, 54].

Promjene epigenetskog mehanizma metilacije DNA dovode do promjene u ekspresiji proteina na transkripcijskoj razini. Hipermetilacija i hipometilacija DNA doprinose kancerogenezi utišavanjem tumor supresorskih gena, stimulacijom onkogenih i/ili smanjenjem genetičke stabilnosti. Tumorska tkiva imaju 40 % nižu aktivnost DNMT, enzima koji katalizira prijenos metilne skupine iz S-adenozil-L-metionina na citozin u citozin-gvanin dinukleotidu, u odnosu na normalne stanice [14].

Jedan od najprihvaćenijih mehanizama starenja kože je UV inducirano oksidacijsko oštećenje koje stvara slobodne radikale. Prirodni endogeni kromofori kože poput triptofana, nikotinamid koenzima, riboflavina i mitohondrijske citokrom c oksidaze pretvaraju sunčeve fotone u ROS, superoksidni anion ili singlet kisika. UVA stimulira aktivnost NADPH oksidaze što uzrokuje drugi oksidacijski val stvaranjem superoksidnog aniona.

Multipla izlaganja kože UV zračenju uzrokuju povećanje razine proteinskih karbonilnih derivata koji nastaju tijekom oksidacijskog stresa iz aminokiselinskih ostataka lizina, arginina i prolina, a predstavljaju marker oksidacijskog oštećenja proteina [42].

Kronično izlaganje kože UVB zračenju uzrokuje upalni odgovor indukcijom ekspresije COX-2 što može dovesti do razvoja kožnog karcinoma. Dugotrajno izlaganje UVB zračenju uzrokuje značajno povećanje markera stanične proliferacije. Povećana ekspresija COX-2 je zabilježena u hiperplastičnoj koži, aktiničkim keratozama, benignim papilomima i SCC-u [12, 70].

Budući da je učestalost karcinoma kože u stalnom porastu te da melanomski oblik kožnog karcinoma sve slabije odgovara na klasičnu kemoterapiju, potrebno je razviti dokazane nove terapijske pristupe za prevenciju i terapiju karcinoma kože. U zadnjih dvadesetak godina, biljni polifenoli su postali vrlo interesantni mnogim znanstvenicima kao aktivne tvari u dermatološkim/kozmeceutičkim pripravcima za kemoprevenciju i usporenje kožnih tumorigeneza.

Biljni polifenoli predstavljaju učinkovitu strategiju za fotozaštitu kože i smanjenje incidencije kožnih tumora jer apsorbiraju cijeli spektar UVB zračenja te dio spektra UVA i UVC zračenja. Za potporu endogenog antioksidacijskog sustava, antioksidansi poput biljnih polifenola mogu biti primijenjeni oralno ili topikalno. Topikalna primjena polifenola je učinkovita u borbi protiv oksidacijskog stresa i fotostarenja kroz dulje vrijeme. Groždani polifenoli mogu neutralizirati ROS ili smanjiti njegovo stvaranje te inaktivirati MMP i smanjiti ekspresiju gena za hijaluronidazu 2 čime se postiže normalno stvaranje strukturnih kožnih proteina [10].

Proantocijanidini grožđanih sjemenki (GSP) imaju dokazani kemoprevencijski učinak na fotokancerogenezu uzrokovanu prekomjernim izlaganjem kože UV zračenju. U jednoj *in vivo* studiji na SKH-1 miševima je dokazano da primjena GSP smanjuje incidenciju UVB induciranih kožnih tumora, širenje tumora te malignu transformaciju benignih papiloma u karcinom. GSP ostvaruje svoj kemoprevencijski učinak na kožu smanjenjem oksidacijskog stresa i sprečavanjem deplecije endogenog antioksidacijskog zaštitnog sustava inducirane UVB zračenjem, prevencijom fotooksidacijske razgradnje lipida i proteina, inhibicijom aktivacije MAPK i NF- $\kappa$ B signalnih puteva u koži te imunosupresijom. GSP smanjuje UVB induciranu imunosupresiju u miševa smanjenjem razine IL-10 i povećanjem razine IL-12 koji regulira rast i funkciju T stanica te povećava razvoj Th1 stanica stimulacijom stvaranja IFN- $\gamma$  [13, 51].

Polifenoli mogu predstavljati vrlo važni aktivni sastojak u kozmetičkim formulacijama za njegu kože poslije sunčanja. Primjena polifenola poput resveratrola i kvercetina nakon izlaganja keratinocita UVB zračenju je učinkovitija u smanjenju razine intracelularnih peroksida i prekomjerne ekspresije gena za CYP1A1, CYP1B1, IL-1 $\beta$ , IL-6 i COX-2 [21, 24].

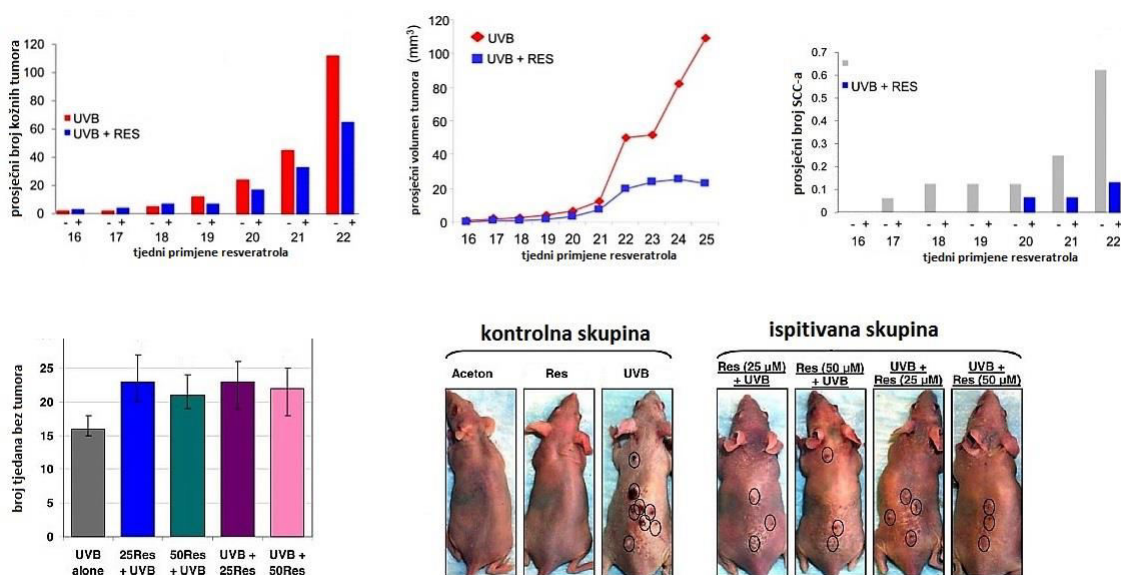
Protuupalni učinak resveratrola se ostvaruje značajnim smanjenjem UVB posredovane hiperplazije kože i infiltracije leukocita nakon topikalne primjene. Resveratrol uzrokuje značajnu inhibiciju UVB inducirano povećanja cdk-2, cdk-6 i ciklina D2 te umjerenu inhibiciju UVB inducirano povećanja cdk-4 i ciklina D1. Primjena resveratrola na koži izloženoj UVB zračenju uzrokuje povećanje razina inhibitora ciklin kinaza WAF1/p21 i tumor supresora p53.



Topikalna primjena resveratrola na koži miševa značajno inhibira UVB posredovano povećanje razine proteina PCNA.

U *in vivo* studiji na miševima, odgođena je UV inducirana kožna tumorigeneza i smanjena maligna transformacija benignih papiloma u karcinom skvamoznih stanica oralnom primjenom resveratrola. Dva tjedna prije prvog izlaganja UVB zračenju, oralno je primijenjena doza resveratrola od 200 mg/kg tri puta tjedno. Miševi su podvrgnuti zračenju od 180 mJ/cm<sup>2</sup> dva puta tjedno kroz 25 tjedana. Resveratrol uzrokuje smanjenje prosječnog broja kožnih tumora za 43 % u 22. tjednu i smanjenje prosječnog volumena tumora za 79 % u usporedbi s kontrolnim miševima. Skvamozni stanični karcinom se pojavljuje u ozračenim miševima netretiranim resveratrolom u 17. tjednu, a u životinja tretiranih resveratrolom pojava SCC-a je odgođena do 20. tjedna. Histološka istraživanja su pokazala da je broj SCC-a u miševima tretiranim resveratrolom 80 % manji u 22. tjednu u odnosu na kontrolne životinje.

Učinak i mogući putevi resveratrola u regulaciji rasta melanoma su još uvijek nepoznati. U *in vitro* studijama, resveratrol nije pokazao citotoksične učinke, ali može promijeniti morfologiju stanica. Sam resveratrol nema značajni učinak na staničnu proliferaciju i vijabilnost M624 stanica melanoma i HaCaT-a, ali u kombinaciji s imatinibom značajno smanjuje vijabilnost B16 stanica melanoma i razinu MMP-9 bez obzira na prisutnost  $\alpha$ -MSH te značajno inhibira invaziju stanica stimuliranih  $\alpha$ -MSH. Resveratrol se može koristiti kao adjuvantna terapija melanoma jer povećava citotoksičnost temozolomida i dakarbazina [72, 73].



Slika 32: Učinak resveratrola na UV induciranu kancerogenezu kože (prilagođeno prema [74])

Peritumoralna injekcija resveratrola inhibira rast tumora što se objašnjava apoptozom kroz mitohondrijske puteve primjerice smanjenjem potencijala mitohondrijske membrane i aktivacijom kaspaze-3. Topikalna primjena resveratrola na koži SKH-1 miševa prije izlaganja UVB zračenju značajno inhibira staničnu proliferaciju, ekspresiju mRNA survivina i fosforilaciju survivina. Ekspresija survivina prevenira regresiju papiloma i promovira pretvorbu u SCC te se povezuje s povećanom agresivnošću tumora i smanjenim preživljavanjem. *In vivo* studije su pokazale da inhibicija rasta melanoma smanjenjem ekspresije survivina može predstavljati novi terapijski pristup u liječenju melanoma. Resveratrol ima snažni kemoprevencijski učinak na UVB induciranu kožnu kancerogenezu koja je djelomično posljedica modulacije ekspresije i funkcije survivina. Primjena resveratrola prije i nakon izlaganja kože UVB zračenju rezultira značajnim smanjenjem fosforilacije survivina mitotičkom kinazom cdc2-ciklin B1 na Thr<sup>34</sup>. Fosforilacija survivina na Thr<sup>34</sup> regulira razinu survivina u tumorskim stanicama, a sekvencijska ablacija aktivnosti p34cdc2 kinaze može smanjiti razinu survivina i povećati apoptozu u tumorskim stanicama [46, 74].

Polifenolni ekstrakti su vrlo važni aktivni sastojci kozmetičkih proizvoda za zaštitu kože od sunčeva zračenja kao i za njegu kože nakon sunčanja. Polifenoli mogu apsorbirati zračenje valnih duljina cijelog UVB spektra te dio valnih duljina UVC i UVA spektra. Zaštitni faktor (SPF) flavonoida, stilbena i derivata hidroksicimene kiseline se nalazi u rasponu 7 – 29 što odgovara području niske zaštite (SPF 2 – 12) i srednje zaštite od sunčeva zračenja (SPF 12 – 30). Visoki molarni apsorpcijski koeficijent resveratrola pri 304 nm ( $\epsilon=29,580$ ) i 321 nm ( $\epsilon=30,470$ ) ukazuje na visoku učinkovitost u pretvaranju fotona između ovih valnih duljina u ekscitacijsku energiju u usporedbi s popularnim UV filterom etilheksilmetoksicinatom (OMC) ( $\epsilon=25$ ). Drugim riječima, *trans*-resveratrol je dobar UV apsorber.

Resveratrol i beta karoten u fotozaštitnim sredstvima djeluju kao antioksidansi koji povećavaju fotostabilnost avobenzena, čestog UV filtera. U *stratum corneum* penetrira 90 % UV-filtera i 80 % antioksidansa. Beta karoten u kombinaciji s resveratrolom smanjuje kožnu retenciju UV filtera prosječno za 63 % u *stratum corneum* i vijabilni dermis [23, 75 – 77].

Smatra se da resveratrol štiti od prekanceroznih promjena poput aktiničkih keratoza te da kao APE/Ref-1 inhibitor pojačava terapijsku učinkovitost dakarbazina, standarda u liječenju melanoma. Ovime pokazuje veliki potencijal za njegovu primjenu u liječenju melanoma kao adjuvantnog terapeutika [56].

### 1.2.2.6.2. HIPERPIGMENTACIJE

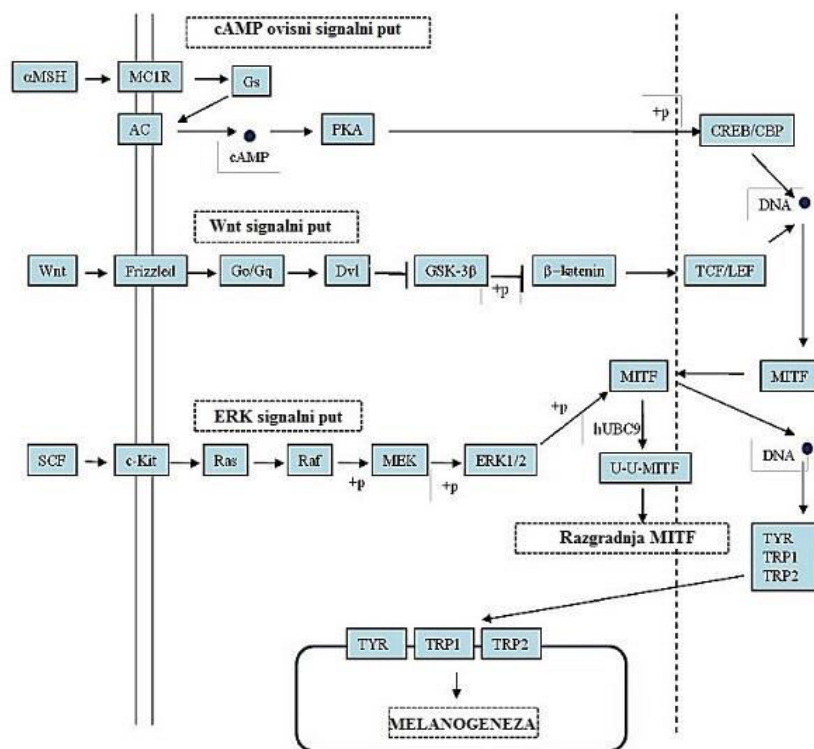
Zdravi izgled kože bez tamnih mrlja je želja svakog individualca, osobito žena. Boja kože se povezuje s ljudskom ljepotom i atraktivnošću. Ona je određena sastavom i raspodjelom različitih kromofora poput melanina, hemoglobina, bilirubina i karotenoida.

Melanin je glavni tamni pigment u koži, kosi i očima koji pruža zaštitu od štetnog ultraljubičastog zračenja odgovornog za fotostarenje i fotokancerogenezu. Učestalost pojave karcinoma kože je niža kod ljudi tamnije kože koji imaju pojačanu sintezu melanina. Međutim, pojačano stvaranje melanina i njegova nepravilna raspodjela može uzrokovati estetske probleme poput hiperpigmentacija te melazme i staračke pjege. Njihov nastanak je pod utjecajem brojnih čimbenika poput etničke pripadnosti, genetičkih faktora, starenja kože, izlaganja štetnom sunčevu zračenju, trudnoće, bolesti i primjene nekih lijekova. Višak melanina može biti kancerogen i potencijalno povezan s malignim stanjem. U patološkim stanjima poput melanoma, visoka razina tirozinaze u serumu i tkivima uzrokuje prekomjerno stvaranje melanina.

Melanogeneza je kompleksni biosintetski proces reguliran enzimskim i kemijskim reakcijama koji je najčešće induciran sunčevim UV zračenjem. Izlaganjem kože sunčevom UV zračenju, keratinociti su stimulirani na lučenje  $\alpha$ -melanocitnog stimulirajućeg hormona ( $\alpha$ -MSH) koji se veže na specifični receptor melanokortina 1 (MC1R) na melanocitima. Vežanjem  $\alpha$ -MSH na MC1R na membrani melanocita povećava se koncentracija cAMP-a aktivacijom enzima adenilat ciklaze. Konačni stanični odgovor je aktivacija melanogeneze povećanjem genske ekspresije specifičnog transkripcijskog faktora udruženog s mikroftalmijom (MITF) preko fosforilacije CREB [79].

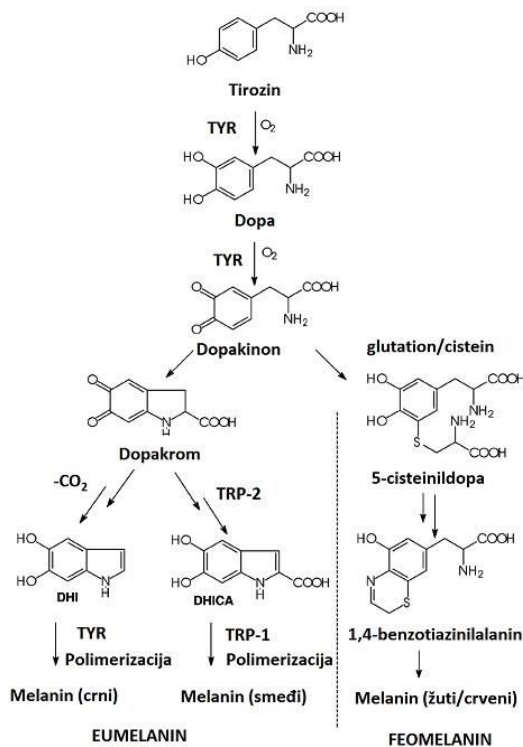
MITF je transkripcijski faktor uključen u regulaciju diferencijacije, pigmentacije, proliferacije i preživljavanja melanocita te regulaciju genske ekspresije enzima melanogeneze i to: tirozinaze, TRP-1 i TRP-2. Izoforma MITF-M ima dvojni ulogu u signalnom Wnt putu te djeluje kao nuklearna meta i nuklearni medijator u Wnt/ $\beta$ -katenin signaliziranju. Aktivacija Wnt puta uzrokuje inaktivaciju glikogen sintaza kinaze-3 $\beta$ , nakon čega slijedi akumulacija  $\beta$ -katenina i njegova translokacija u jezgru te povećanje ekspresije MITF.

Signalni ERK put regulira melanogenezu razgradnjom MITF proteina. Aktivacija ERK fosforilira MITF na Ser-73 nakon čega slijedi ubikvitinacija MITF i njegova razgradnja posredovana proteasomom. Aktivacija ERK puta inhibira melanogenezu zbog smanjene aktivnosti MITF.



**Slika 33: Signalni putevi uključeni u regulaciju melanogeneze (prilagođeno prema [80])**

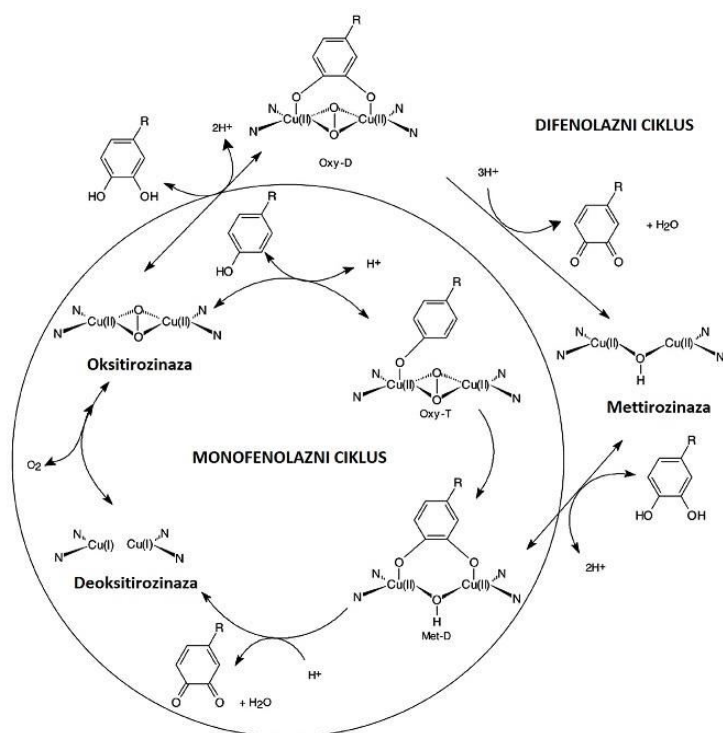
Melanociti sintetiziraju melanin u bazalnom sloju epidermisa uz enzime melanogeneze. Tirozinaza (dihidroksifenilalanin oksidoreduktaza) je multifunkcionalni enzim koji katalizira *o*-hidroksilaciju monofenola koristeći molekularni kisik (monofenolazna aktivnost) i oksidaciju *o*-difenola u *o*-kinone (difenolazna aktivnost). Ona katalizira početnu oksidaciju L-tirozina i L-3,4-dihidroksifenilalanina (DOPA) u DOPA kinon koji s cisteinom ili glutationom stvara konjugate 5-S-cisteinil DOPA i glutationil DOPA. Ovi konjugati postupno polimeriziraju u crvenkasto-žuti feomelanin. Oksidacijom i ciklizacijom DOPA kinona nastaje dopakrom koji daljnjim reakcijama kataliziranim TRP-2 tvori 5,6-dihidroksiindol (DHI) i 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilnu kiselinu (DHICA). Njihovom polimerizacijom nastaje smečkasto-crni eumelanin. Tirozinaza (TYR) je glavna meta za kontrolu neželjene pigmentacije kože. Njeni inhibitori su potencijalne tvari za izbjeljivanje kože.



**Slika 34: Melanogeneza (prilagodeno prema [81])**

Aktivna mjesta tirozinaze sadrže dva atoma bakra koji mogu biti u tri različita oksidacijska stanja te se razlikuju metitirozinaza, deoksitirozinaza i oksitirozinaza.

Monofenolazni ciklus tirozinaze započinje vezanjem supstrata monofenola na atom bakra oksitirozinaze. *O*-hidroksilacijom monofenola nastaje *o*-difenol koji se oslobađa s enzima. Enzim tada prelazi u met oblik (metitirozinaza) koji može katalizirati reakciju stvaranja *o*-kinona u difenolaznom ciklusu. Oslobađanjem *o*-kinona s metitirozinaze, nastaje deoksitirozinaza koja, vezanjem molekuskog kisika, regenerira oksidirani oblik enzima.



**Slika 35: Mehanizam monofenolazne i difenolazne aktivnosti tirozinaze (prilagođeno prema [81])**

Većina istraživanja koristi tirozinazu gljiva zbog lakše dostupnosti, ali biokemijska svojstva ljudske i gljivne tirozinaze se dosta razlikuju. Radi toga se sve više koristi stanična linija nemelanocitnih humanih embrionalnih stanica bubrega (HEK 293) koja je podvrgnuta transfekciji s plazmidom koji kodira za sintezu ljudske TYR.

Istraživanja resveratrola kao potentnog inhibitora gljivne tirozinaze ukazuju na važnost SAR-a. Jaka inhibicija tirozinaze zahtjeva prisutnost 4-hidroksifenilne skupine. Uvođenje hidroksilne ili metoksilne skupine na 4-hidroksifenilnu skupinu značajno reducira sposobnost inhibicije gljivne tirozinaze. Istraživanja odnosa učinka i kemijske strukture (SAR) ukazuju na važnost molekulske veličine i dvostruke olefinske veze u stilbenskom skeletu te stupnja polimerizacije. Dihidroresveratrol ima vrlo slabo inhibicijsko djelovanje na tirozinazu u odnosu na resveratrol koji posjeduje dvostruku vezu. Oligomeri resveratrola imaju slabiji inhibicijski učinak na enzim. Molekule koje sadrže hidroksilnu skupinu u *para* položaju su učinkovitije od molekula s hidroksilnom skupinom u *orto* ili *meta* položaju. Tirozinaza pokazuje visok afinitet za metoksilirane derivate te nizak afinitet za glikozilirane. Glikozilacija smanjuje inhibicijsku aktivnost zbog vrlo slabe reaktivnosti fenolne skupine kao glikozilnog akceptora, visoke pK<sub>a</sub> vrijednosti aglikona i anomerizma na C-1. Supstitucija hidroksilne skupine na C-4 (*para*) položaju resveratrola potpuno blokira enzimsku oksidaciju tirozinazom [78].

Glavni terapijski pristupi u liječenju hiperpigmentacija obuhvaćaju topikalnu primjenu inhibitora melanogeneze, kemijske pilinge, krioterapiju i lasersku terapiju. Mehanizmi inhibicije melanogeneze su direktna inhibicija katalitičke aktivnosti, ubrzana razgradnja i inhibicija transkripcije mRNA tirozinaze smanjenjem aktivnosti MITF što rezultira smanjenjem staničnih razina cAMP-a, akumulacijom citoplazmatskog  $\beta$ -katenina ili aktivacijom ERK [82].

Najčešći inhibitori melanogeneze koji se koriste u liječenju hiperpigmentacija za topikalnu primjenu su arbutin, azelaična kiselina, kojična kiselina i hidrokinon koji predstavlja zlatni standard u izbjeljivanju kože. Međutim, korištenje hidrokinona i kojične kiseline se povezuje s nekim neželjenim reakcijama te je njihova primjena pod strogom kontrolom FDA u Americi i zabranjena u kozmetičkim proizvodima u EU [78].

Resveratrol je visoko potentni i selektivni inhibitor ljudske TYR ( $IC_{50}=0,39 \mu\text{g/mL}$ ) u usporedbi s *p*-kumarinskom kiselinom ( $IC_{50}=0,66 \mu\text{g/mL}$ ) i arbutinom ( $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ ) koji inhibira sintezu melanina u ljudskim epidermalnim melanocitima pri suptoksičnim koncentracijama. Resveratrol može smanjiti aktivnost tirozinaze za 30 – 45 %. Resveratrol ima mnogo slabiji učinak na gljivnu TYR u odnosu na ljudsku TYR jer ga ona oksidira te postaje suicidalni inhibitor. Resveratrol smanjuje ekspresiju proteina melanogeneze poput tirozinaze, TRP1 i TRP2 te MITF na razini mRNA u ljudskim melanocitima i  $\alpha$ -MSH stimuliranim stanicama melanoma. Osim što smanjuje stvaranje melanina, smanjuje staničnu vijabilnost i invazivnost melanoma. Dva su osnovna mehanizma djelovanja resveratrola kao inhibitora tirozinaze. Prvo, resveratrol smanjuje razinu proteina tirozinaze što rezultira smanjenjem njene aktivnosti nakon 18 – 24 h. Drugo, resveratrol ima sposobnost direktno inhibirati katalitičku aktivnost tirozinaze. Resveratrol ometa prijenos tirozinaze iz ER-a u Golgijev aparat što vodi do dramatičnog smanjenja funkcionalne tirozinaze [82].

Primjena resveratrola u kozmetici je djelomični izazov zbog njegove kemijske nestabilnosti. Resveratrol triacetat (RTA) i resveratrol triglikolat su prolijekovi koji mogu povećati stabilnost resveratrola. Resveratrol pri koncentraciji od 0,5 % inducira slabu kožnu iritaciju. Primjenom kozmeceutičke formulacije koja sadrži 0,4 % RTA dvaput dnevno na kožu podlaktice u 22 zdrava dobrovoljna pacijenta kroz osam tjedana, prosječni intenzitet UV induciranih hiperpigmentacijskih mrlja je smanjen za 2,67 % u testnoj skupini bez izazivanja iritacije kože i 1,46 % u kontrolnoj skupini što se smatra statistički značajnom razlikom [46, 83].

Resveratrol triglikolat (RTG) je derivat glikolne kiseline koja se koristi u kozmeceuticima zbog njezine odlične penetracije u kožu. RTG u koncentraciji 3 – 10  $\mu\text{M}$  smanjuje razinu melanina u  $\alpha$ -MSH stimuliranim B16/F10 stanicama smanjenjem ekspresije tirozinaze, TRP1 i MITF na razini proteina i razini mRNA [83].

Oksiresveratrol je potentni kompeticijski inhibitor gljivne tirozinaze ( $IC_{50}=1,2 \mu M$ ) čiji je inhibicijski učinak 32 i 45 puta jači od kojične kiseline i resveratrola. Suprotno od kojične kiseline, oksiresveratrol smanjuje  $V_{max}$  vrijednost, ali ne mijenja  $K_m$  vrijednost gljivne tirozinaze. Oksiresveratrol ima devet puta jači inhibicijski učinak na tirozinazu od resveratrola zbog prisutnosti dodatne slobodne hidroksilne skupine na C-2 koja povećava aktivnost.

(+)-*trans-ε*-viniferin je najpotentniji inhibitor ljudske tirozinaze ( $IC_{50}=4,1 \mu M$ ) čiji je inhibicijski učinak na aktivnost tirozinaze 4, 12 i 62 puta jači od kojične kiseline ( $IC_{50}=16,9 \mu M$ ), resveratrola ( $IC_{50}=52,8 \mu M$ ) i askorbinske kiseline ( $IC_{50}=255 \mu M$ ).



### 1.2.2.6.3. SIRTUINI

Optimizacija ekspresije sirtuina predstavlja vrlo važnu anti-age strategiju. Aktivacija sirtuina pokazuje pozitivne učinke u poremećajima vezanim uz starenje tzv. *age-related diseases*.

Sirtuini (engl. *Silent Information Regulator SIR*) su regulatorni proteini koji reguliraju životni vijek u kvascima i jednostavnim organizmima. Primjerice, dodatna kopija *SIR2* gena povećava životni vijek kvasaca za 30 %, a njegova delecija ili mutacija skraćuje životni vijek za 50 %. Otkriveno je 7 humanih sirtuina SIRT 1 – 7 od kojih je SIRT1 najviše istražen. Sirtuini su uključeni u procese genomske stabilnosti, popravka DNA i utišavanja gena, blokiranja apoptoze i promoviranja staničnog preživljavanja, glukoneogeneze, adipogeneze, rezistencije na oksidacijski stres, regeneracije tkiva, staničnog razvoja, metabolizma lipida i ugljikohidrata, stvaranja heterokromatina i produljenja životnog vijeka kalorijskom restrikcijom.

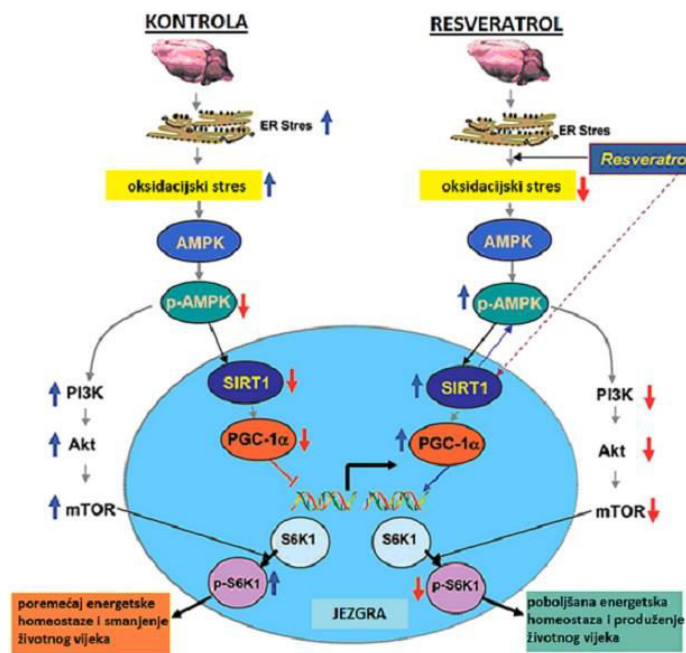
Sirtuini imaju važnu ulogu u signalnim putevima povezanim sa starenjem poput popravka oštećene DNA, skraćivanja telomera i oksidacijskog stresa što ukazuje na njihov potencijalni anti-age učinak u ljudi. Na staničnoj razini, SIRT1 ulazi u interakciju s anti-age transkripcijskim faktorima poput FoxO1 [18, 31, 84].

Sirtuini predstavljaju obitelj  $NAD^+$  ovisnih histon deacetilaza klase III (HDAC) i/ili adenzin difosfat riboziltransferaza (ADPRT) koje uklanjaju acetilne skupine s lizina na histonskim repovima uzrokujući čvrsto omatanje histona oko DNA i posredovanje u transkripciji gena blokiranjem pristupa transkripcijskim faktorima. Konačni stanični odgovor je smanjenje genske ekspresije.

Interes za molekulom resveratrola je naglo porasla 2003. godine nakon otkrića *Howitza*. Njegovo istraživanje je rezultiralo zaključkom da male molekule mogu aktivirati sirtuine te time produljiti životni vijek u kvascima, crvima i kratkoživućim ribama. Ovo otkriće još uvijek predstavlja debatu prvenstveno radi toga jer je teško za pretpostaviti da je starenje pod kontrolom samo jednog „gumba“ SIRT1.

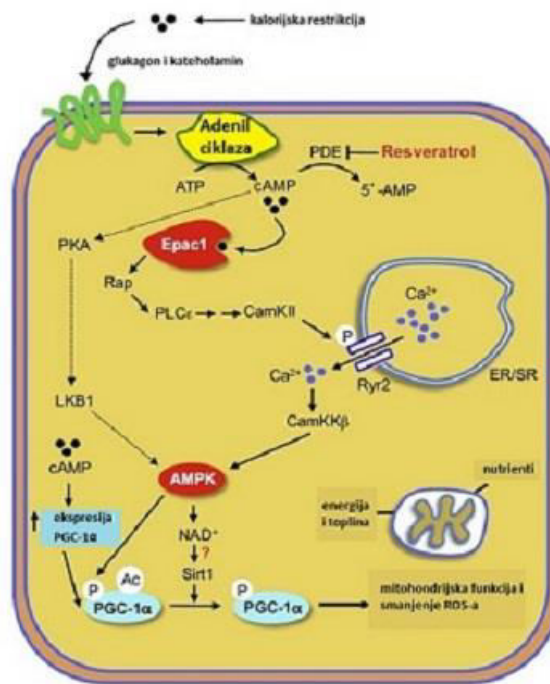
Jedan od učinkovitih tzv. STAC-a (engl. *sirtuin activator compounds*) je resveratrol koji ima dokazani učinak na produljenje životnog vijeka u miševa, kvasaca, nematoda (*Caenorhabditis elegans*), vinskih mušica (*Drosophila melanogaster*, *Anastrepha ludens*) i riba (*Nothobranchius furzeri*). Resveratrol produljuje životni vijek kvasaca za 70 % i kratkoživućih riba za 59 %. U *in vivo* studiji, aktiviranjem SIRT1 resveratrol djeluje na produljenje životnog vijeka miševa hranjenih visokokaloričnom hranom koja je sadržavala visoku koncentraciju masti uz očuvanje inzulinske osjetljivosti i povećanje mitohondrijskog sadržaja [85].

Djelovanje resveratrola na aktivaciju sirtuina je odgovorno za njegov anti-age učinak. Resveratrol povećava ekspresiju SIRT1 na razini transkripcije i translacije. Ključni mehanizam za anti-age učinak resveratrola je povećanje mitohondrijske funkcije preko aktivacije SIRT1 i PGC-1 $\alpha$  te Nrf2 signalnog puta. Aktivacijom SIRT1, resveratrol deacetilira PGC-1 $\alpha$  čime se povećava njegoa aktivnost. Time se povećava mitohondrijska funkcija i smanjuje oksidacijski stres što ima pozitivni utjecaj na energetska homeostazu [86].



**Slika 36: Resveratrol aktivacijom sirtuina produljuje životni vijek (prilagođeno prema [87])**

Metabolički učinci resveratrola su rezultat kompeticijske inhibicije razgradnje cAMP-a. Resveratrol je neselektivni inhibitor fosfodiesteraza (PDE) što uzrokuje povećanu razinu cAMP-a i posljedičnu aktivaciju Epac1. Epac1 je cAMP efektorski protein koji povećava unutarstaničnu koncentraciju Ca<sup>2+</sup> i aktivira CamKK $\beta$ -AMPK put preko fosfolipaze C i rijanodin receptor Ca<sup>2+</sup> oslobađajućeg kanala. Posljedično, resveratrol povećava NAD<sup>+</sup> i aktivnost SIRT1. U normalnim uvjetima, aktivnost sirtuina je inhibirana vezanjem NAD-a na specifičnoj receptorskoj strani. Tvari poput resveratrola pojačavaju deacetilacijsku aktivnost ljudskog SIRT1, inhibiraju vezanje NAD-a te povećavaju njegovu razinu. Pri koncentraciji od 31,6  $\mu$ M resveratrola, aktivnost SIRT1 je povećana za 239 % [86].



**Slika 37: Učinak resveratrola na kalorijsku restrikciju (prilagodeno prema [90])**

Osim što je zabilježen učinak sirtuina kao tumor supresora, literatura nudi i kontroverzne podatke o sirtuinima kao potencijalnim onkogenima. Naime, oni inhibiraju apoptozu inhibicijom p53 tumor supresora.

Uloga sirtuina u dermatologiji nije u potpunosti razjašnjena, a istraživanja su još uvijek u ranoj fazi. Sirtuini su uključeni u stanične puteve povezane s kronološkim starenjem, fotostarenjem te razvojem upale i fotokancerogeneze. Također imaju važnu ulogu u epigenetici i različitim staničnim funkcijama poput stanične proliferacije i popravka DNA.

Usporedne studije mlađe i starije kože nisu pokazale značajne razlike u razini SIRT1 u normalnim uvjetima. Međutim, mlađa koža ima sposobnost visokog stupnja adaptacije na stres. Izlaganjem kože UVB zračenju ( $50 - 200 \text{ mJ/cm}^2$ ), pojačava se nuklearna ekspresija SIRT1 ovisno o dozi zračenja do  $100 \text{ mJ/cm}^2$ , što korelira sa slabim tkivnim oštećenjem i slabom ekspresijom p53 koja zaustavlja stanični ciklus prevencijom proliferacije nepravilnih stanica i promoviranjem mehanizama popravka DNA. Pri višim dozama zračenja ekspresija p53 je mnogo veća, a ekspresija SIRT1 manja što dovodi do stanične smrti uzrokovane apoptozom. Sposobnost adaptacije kože na stres se može povećati primjenom tvari koje selektivno aktiviraju sirtuine (STAC) što korelira sa smanjenjem ekspresije markera starenja poput  $\beta$ -galaktozidaze.

Histološke studije na uzorcima ljudske kože kojoj je povećana aktivnost SIRT1 su pokazale bolju očuvanost morfologije, strukture i integriteta u odnosu na kontrolni uzorak kože. Stanična vijabilnost je povećana 9 – 28 % u stanicama s povećanom ekspresijom SIRT1 u odnosu na kontrolni uzorak [86].

Dva ključna medijatora oštećenja kože, UV zračenje i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> smanjuju ekspresiju SIRT1 u kulturi keratinocita. Resveratrol aktivira SIRT1 u keratinocitima izloženim UV zračenju što rezultira p53 posredovanom apoptozom. Smanjena ekspresija SIRT1 nije zabilježena u kronološki ostarjeloj koži što ukazuje na činjenicu da sirtuini mogu biti potencijalne mete samo za prevenciju fotostarenja.

SIRT6 je važni regulator starenja kože. Modulacija ekspresije SIRT6 bi mogla biti korisna u liječenju hipertrofičnih i keloidnih ožiljaka jer štiti telomere od stanične disfunkcije te predstavlja dodatnu anti-age metu budući da SIRT6 štiti kromatin telomera od starenja i kromosomskih nepravilnosti povezanih sa starenjem. Ljudski fibroblasti s utišanim SIRT6 pokazuju smanjeni sadržaj hidroksiprolina i smanjenu ekspresiju kolagena tipa I. Predloženi mehanizam smanjenja dermalnog kolagena je povećana genska ekspresija NF-κB.

Upala je važna komponenta u patogenezi starenja kože i različitih dermatoloških bolesti poput atopijskog dermatitisa, buloznih dermatoza, kolagenskih vaskularnih poremećaja i psorijaze. Uloga sirtuina u upalnim kožnim poremećajima je kompleksna i istraživanje je u ranoj fazi. Trenutna istraživanja podupiru ulogu sirtuina u upali kroz modulaciju kompleksa NF-κB i supresiju mTOR fosforilacije. Resveratrol aktivira SIRT1 i smanjuje upalu u *in vivo* i *in vitro* eksperimentalnim modelima preko inhibicije TNF-α inducirane ekspresije citokina, iNOS i MMP-9. SIRT6 s druge strane, ulazi u interakciju s kompleksom NF-κB za promjenu kromatinske strukture te smanjuje ekspresiju meta NF-κB povezanih sa starenjem te povećava stvaranje TNF-α na posttranskripcijskoj razini u prisutnosti NAD<sup>+</sup>. Selektivna inhibicija SIRT6 rezultira smanjenom translacijom TNF-α i predstavlja strategiju za liječenje upalnih poremećaja. Moguće je da se modulacija sirtuinske funkcije, direktno inhibicijom TNF-α (preko povećanja SIRT1 i/ili interakcijom SIRT6 s NF-κB ili smanjenjem SIRT6 na posttranskripcijskoj razini) može koristiti u razvoju terapeutika za psorijazu i ostale upalne kožne bolesti. U sistemskom lupusu eritematosusu je smanjena ekspresija IκB što dovodi do prekomjerne transkripcijske aktivnosti NF-κB.

Resveratrol povećanjem ekspresije SIRT1 u HaCaT keratinocitima uzrokuje smanjenje razine p62 proteina i posljedično apoptozu te blokira fosforilaciju Akt što vodi do stanične smrti. Ovaj apoptotički učinak resveratrola je koristan u hiperproliferacijskim kožnim poremećajima poput psorijaze.

Vitiligo je stečena i progresivna hipomelanotična bolest koja se manifestira ograničenim depigmentacijskim slojevima na koži. SIRT1 regulira signalni put MAPK preko Akt-apoptoza signalne regulirajuće kinaze 1 i smanjenja proapoptotičnih molekula što uzrokuje smanjenje oksidacijskog stresa i apoptotične stanične smrti u perilezionalnim vitiligo keratinocitima. Aktivacija SIRT1 je novi pristup u zaštiti perilezionalnih vitiligo keratinocita [86].

Povećana ekspresija sirtuina je karakteristična za rani stadij karcinoma te aktiničke keratoze u odnosu na normalne stanice. Predloženi mehanizam je deacetilacija tumor supresorskog retinoblastoma proteina (Rb) i mTOR inhibicija deacetilazne aktivnosti SIRT1. Inhibicija SIRT1 preko mTOR vodi do povećane ekspresije antiapoptotičkih proteina Bcl-1/A1, transkripcijskih faktora NF- $\kappa$ B [86].

### 1.2.3. FARMAKOKINETIKA RESVERATROLA

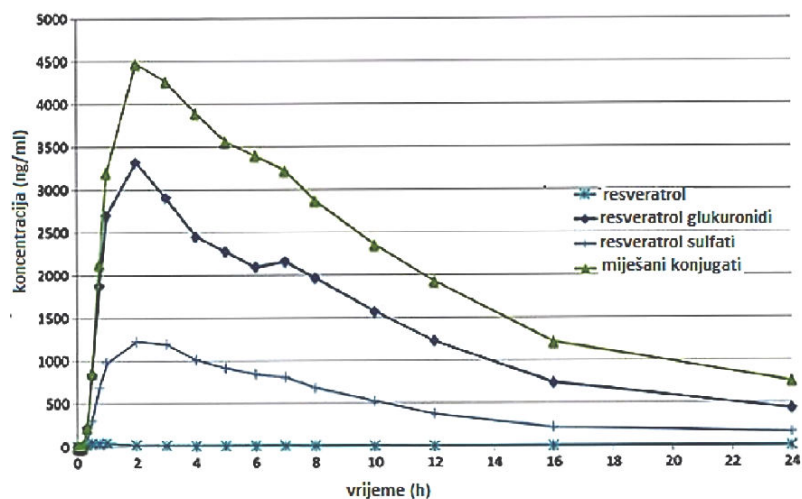
Biološka aktivnost polifenola ovisi o njihovoj bioraspoloživosti. U ljudi, cirkulirajuća razina nepromijenjenog *trans*-resveratrola iznosi 2 % serumske koncentracije ukupnog slobodnog resveratrola nakon jedne doze od 25 mg na 70 kg tjelesne mase. Bioraspoloživost *trans*-resveratrola ovisi o nekoliko glavnih čimbenika poput biološkog ritma, individualne varijabilnosti, prehrambenih faktora i doze.

U odnosu na čisti aglikon, bioraspoloživost glikozida resveratrola je niža vjerojatno zbog utjecaja sadržaja šećera. Farmakokinetika *trans*-resveratrola pokazuje varijacije cirkadijanog ritma, a njegova je bioraspoloživost viša nakon jutarnje primjene. Najvažnije ograničenje bioraspoloživosti *trans*-resveratrola je visoka individualna varijabilnost koja ovisi o jetrenoj funkciji i metaboličkoj aktivnosti lokalne intestinalne mikroflore [89].

Neka istraživanja su pokazala da je bioraspoloživost *trans*-resveratrola ovisna o obroku i njegovom sadržaju lipida. Konzumacijom 300 ml crvenog vina i obroka bogatog mastima nije detektiran slobodni *trans*-resveratrol u serumu. Konzumacijom 600 ml vina na prazan želudac u 60 % slučajeva se detektira serumski resveratrol. Novija istraživanja pokazuju da alkohol nema učinak na bioraspoloživost resveratrola. Kontroliranom randomiziranom kliničkom studijom na jedanaest zdravih muškaraca je utvrđeno da je biodostupnost *trans*-resveratrola iz vina ili grožđanog soka šest puta veća u odnosu na tablete [38].

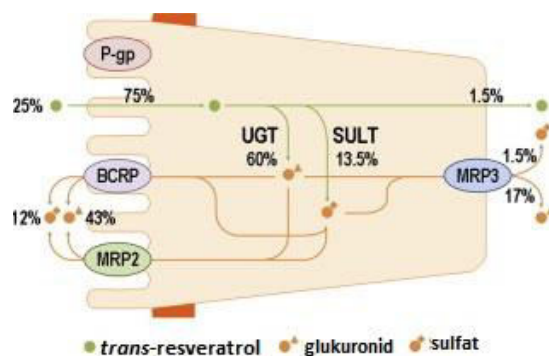
Ovisno o primijenjenoj dozi, plazmatska koncentracija resveratrola i njegovih metabolita varira od nanomolarnih do mikromolarnih veličina. Povećanjem doze, linearno se povećava plazmatska koncentracija resveratrola. Oralnom primjenom 25 mg resveratrola u ljudi, u plazmi se može detektirati slobodni resveratrol samo u tragovima (< 5 ng/ml) te metaboliti (491±90 ng/ml) s poluvremenom raspada u plazmi  $t_{1/2}=9,2\pm 0,6$  h. Primjenom tableta sa 500 mg resveratrola u kliničkoj studiji na 15 volontera, nakon 24 h  $C_{max}$  za resveratrol, glukuronidirani i sulfatirani resveratrol iznosi 71,2±42,4 ng/ml, 4083,9±1704,4 ng/ml i 1516,0±639,0 ng/ml.

Primjena ponovljenih i/ili kroničnih doza može rezultirati saturacijom metabolizma što vodi do viših plazmatskih i tkivnih razina resveratrola. Primjenom jedne doze od 5 g *trans*-resveratrola, postiže se maksimalna plazmatska koncentracija 1,5 h nakon primjene ( $C_{max}=538,8$  ng/ml). Primjenom doze od 5 g *trans*-resveratrola slijedećih 29 dana postiže se  $C_{max}=958,6$  ng/ml.



Slika 38: Farmakokinetika resveratrola (prilagođeno prema [88])

Bioraspoloživost resveratrola je ograničena ABC transporterima od kojih su najvažniji BCRP (*engl. breast cancer resistance protein*) i MRP3 (*engl. multi-drug resistance protein 3*).



Slika 39: Utjecaj P-glikoproteina i ABC transportera na bioraspoloživost i metabolizam resveratrola (prilagođeno prema [91])

### 1.2.3.1. APSORPCIJA

Oralno primijenjeni resveratrol se brzo apsorbira i postiže vršnu plazmatsku koncentraciju 30 minuta nakon primjene. U ljudi, oralno primijenjen resveratrol doseže maksimalnu plazmatsku koncentraciju nakon 1 h. Šest sati nakon primjene, pojavljuje se drugi pik resveratrola dobiven iz krivulje koncentracija-vrijeme. Njegova pojava je u skladu s hipotezom da resveratrol ulazi u enterohepatičku cirkulaciju konjugiranih metabolita reapsorpcijom nakon intestinalne hidrolize. Tragovi resveratrola mogu zaostati u plazmi i do 72 h nakon ingestije [20, 50].

U ljudi, oralna apsorpcija resveratrola je visoka i aproksimativno iznosi 75 % zbog lipofilnih karakteristika resveratrola. Resveratrol se apsorbira na seroznoj strani jejunuma pasivnom difuzijom ili stvaranjem kompleksa s membranskim transporterima poput integrina. Međutim, oralna bioraspoloživost je niska (< 1 %) zbog jakog i brzog enterohepatičkog metabolizma u crijevima i jetri [35].

### 1.2.3.2. DISTRIBUCIJA

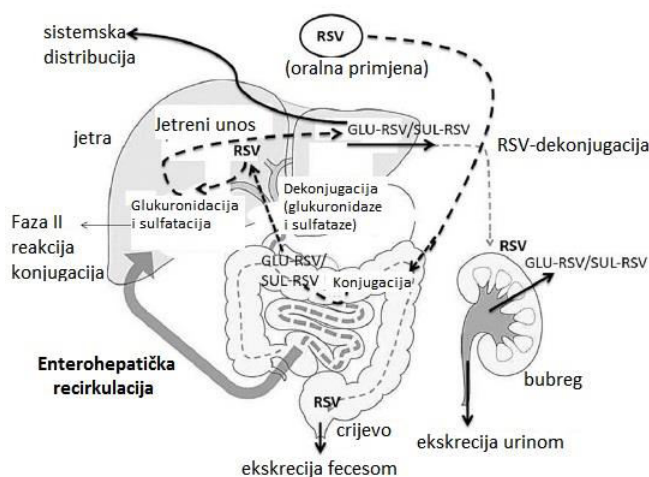
Resveratrol se raspodjeljuje u različita tkiva poput jetre i bubrega, te u pluća, slezenu i srce. Prolazi kroz krvno-moždanu i krvno-testisnu barijeru. Stvaranjem hidrofobnih interakcija, 50 % resveratrola se veže na serumske proteine poput lipoproteina, hemoglobina i albumina što olakšava njegov aktivni transport u ciljna tkiva. Resveratrol ima veći afinitet vezanja za humani serumski albumin u odnosu na hemoglobin. Albumin ima važnu ulogu u raspodjeli i bioraspoloživosti cirkulirajućeg resveratrola, a smatra se da albumin predstavlja prirodni spremnik resveratrola *in vivo* [8, 20, 89].

### 1.2.3.3. METABOLIZAM

Većina fenolnih tvari se metabolizira crijevnom mikroflorom u gastrointestinalnom sustavu reakcijama deglikozilacije odnosno reakcijama razgradnje prstenaste strukture polifenola do fenolnih kiselina i aldehida. Bakterije crijevne mikroflore koje sudjeluju u metabolizmu flavonoida predstavljaju rodovi *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Eggertheilla*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Individualni profil crijevne mikroflore određuje crijevne metabolite groždanih polifenola i sekundarno utječe na aktivnost enzima faze I i faze II. GSP može značajno reducirati omjer *Firmicutes*:*Bacteroides* u *in vitro* uvjetima intestinalnog mikrobnog ekosustava te time djelovati na kontrolu tjelesne težine.



Niska koncentracija resveratrola u krvi je posljedica brzog metabolizma u jetri i ulaska u enterohepatičku recirkulaciju. Resveratrol podliježe opsežnim metaboličkim reakcijama faze I (oksidacija, redukcija i hidroliza) i faze II (glukuronidacija, sulfatacija, metilacija) čime nastaju glukuronidi, sulfati i miješani sulfoglukuronidi resveratrola u jetri i intestinalnim epitelnim stanicama te dihidroresveratrol i piceatanol u gastrointestinalnom traktu mikrobnom fermentacijom *trans*-resveratrola.



**Slika 40: Metabolizam resveratrola u ljudi (prilagodeno prema [31])**

Sulfati su zastupljeniji metaboliti pri niskim dozama (do 2,5 g resveratrola), a resveratrol-3-glukuronid je predominantni konjugat pri višim dozama resveratrola zbog inhibicije supstrata sulfata. Za razliku od životinja, glavni metaboliti resveratrola u urinu ljudi su sulfati (*cis*-resveratrol-4'-sulfat 84 %, *cis*-resveratrol-3-O-glukuronid 8 %).

*Trans*-resveratrol se brzo metabolizira u hepatocitima štakora. Glavni metaboliti su *trans*-resveratrol-3-O-sulfat i *trans*-resveratrol-3-O-glukuronid. Suprotno, u ljudskim hepatocitima, *trans*-resveratrol-4'-O-glukuronid, *trans*-resveratrol-3-O-glukuronid i *cis*-resveratrol-3-O-glukuronid su učestaliji od sulfata.

Glukuronidacija je glavni put faze II biotransformacije resveratrola koji je ovisan o koncentraciji supstrata. Glukuronidacijom *trans*-resveratrola nastaje *trans*-resveratrol-4'-O-glukuronid i *trans*-resveratrol-3'-O-glukuronid uz enzim uridin-5'-difosfo-glukuronozil-transferazu (UGT). U ljudskim i psećim jetrenim mikrosomima, glukuronidacija u R3G i R4G se pojavljuje u 65 % primijenjene doze, a značajno je snižena na 10 % kad se koncentracija supstrata poveća deset puta. U štakora, jetreni mikrosomi glukuronidiraju oko 90 % primijenjenog resveratrola neovisno o koncentraciji supstrata. U miševa i štakora, resveratrol se konjugira na poziciji 3, dok se u ljudi također konjugira i na poziciji 4' (omjer R3G:R4G=5:1) [89].

Glukuronidacija resveratrola je regioselektivna i stereoselektivna. Ona je brža 5 – 10 puta s *cis*-stereoizomerom te preferira 3-poziciju oba izomera. UGT1A1 je podložan genetičkom polimorfizmu i uglavnom je uključen u 3-O-glukuronidaciju *trans*-resveratrola, dok je UGT1A6 ograničen na *cis*-resveratrol.

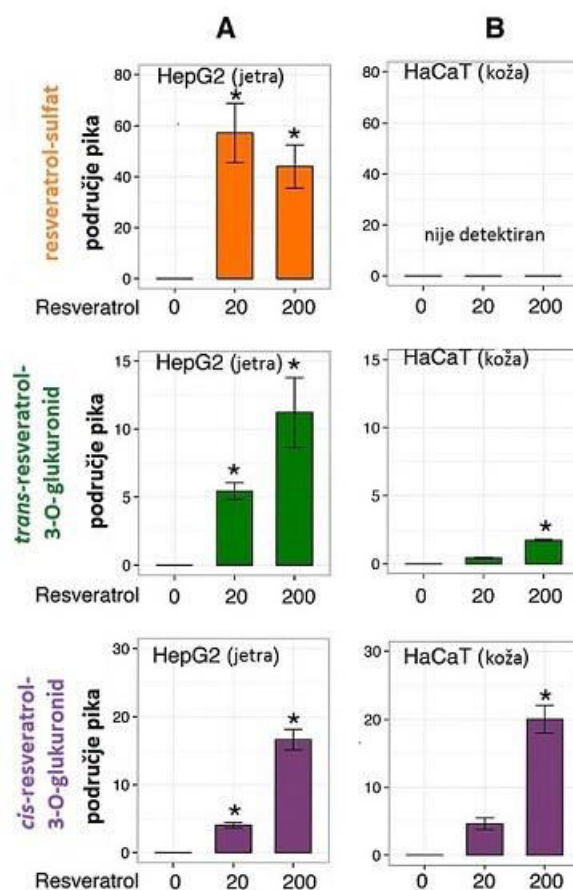
Resveratrol je bolji supstrat za glukuronozil transferazu ( $K_m=0,15$  mM) nego sulfotransferaze ( $K_m=0,60$   $\mu$ M). Sulfatacijom resveratrola sulfotransferazama (SULT) u ljudskoj jetri mogu nastati *trans*-resveratrol-3-O-4'-O-disulfat, *trans*-resveratrol-4'-O-sulfat i *trans*-resveratrol-3-O-sulfat. U ljudi, aktivnost sulfotransferaza je viša u duodenumu nego u jetri. Pri koncentraciji od 10  $\mu$ M resveratrola, *trans*-3-O-sulfat je glavni metabolit resveratrola. Njegova se koncentracija drastično smanjuje pri višim koncentracijama resveratrola (200  $\mu$ M), vjerojatno zbog saturacije ili inhibicije metabolizma.

Djelovanjem bakterijskih enzima intestinalne mikroflore ( $\beta$ -glukuronidaza) odnosno hidrogenacijom alifatske dvostruke veze nastaje reducirani dihidroresveratrol koji čini i do 50 % oralne doze resveratrola. Stanice sisavaca ne mogu metabolizirati resveratrol u dihidroresveratrol.

Iako se resveratrol inaktivira enterohepatičkim metabolizmom, postoje znanstveni dokazi da su konjugati resveratrola biološki aktivni. Konjugati 3-O-sulfata i 4'-O-sulfata zadržavaju neke biološke aktivnosti resveratrola poput indukcije kinon reduktaze 1, „hvatanja“ slobodnih radikala, inhibicije aktivnosti NF- $\kappa$ B i COX te aktivacije SIRT1. Za razliku od *trans*-resveratrola, sulfatirani metaboliti resveratrola pokazuju slabu citotoksičnost u ljudskim malignim i nemalignim staničnim linijama karcinoma dojke. Oligomeri *trans*-resveratrola, *trans*-resveratrol-3-O-glukuronid i glukozidi imaju znatno višu antioksidacijsku aktivnost u odnosu na *trans*-resveratrol.

Resveratrol sulfat se aktivnim prijenosom unosi u stanice i osigurava rezervoar intracelularnog resveratrola. Novija istraživanja dokazuju da se resveratrol dostavlja u stanice kao sulfatni konjugat koji se u stanicama metabolizira do resveratrola [63].

Prepostavlja se da se resveratrol slično metabolizira nakon oralne ili intravenske primjene. Glukuronidni metaboliti su brojniji u koži nakon topikalne u odnosu na oralnu primjenu. Transdermalnom primjenom se postižu visoke razine *cis*-resveratrol-3-O-glukuronida i *trans*-resveratrol-3-O-glukuronida samo u dorzalnoj koži. Iz ovih saznanja se može zaključiti da je koža sposobna direktno metabolizirati resveratrol u resveratrol glukuronide. Usporedbom oralne i topikalne primjene resveratrola *in vivo*, može se zaključiti da se topikalnom primjenom resveratrol ne metabolizira u sulfate već samo u glukuronide [91].



**Slika 41: Metabolizam resveratrola nakon oralne (A) i topikalne primjene (B) (prilagođeno prema [91])**

Ekstremno brza sulfokonjugacija u crijevima/jetri je ograničavajući korak u biodostupnosti resveratrola. Ona može biti inhibirana mnogim flavonolima poput kvercetina u pikomolarnim koncentracijama. Kvercetin inhibira i glukuronidaciju resveratrola u jetri i duodenalnom tkivu povećavajući njegovu bioraspoloživost [23].

#### 1.2.3.4. ELIMINACIJA

Resveratrol ima kratko vrijeme poluživota ( $t_{1/2}$  = 8 – 14 min) i brz klirens ( $C_l$  = 11 L/h/kg) [61].

Oralno primijenjen resveratrol se primarno izlučuje bubrezima (3 – 61 %). Neke studije ukazuju da se resveratrol u manjoj mjeri može izlučivati preko kože znojenjem te dišnim sustavom.

U ljudi, 24,6 % oralno primijenjene doze resveratrola se pojavljuje u urinu, uključujući metabolite. Udio nepromijenjenog resveratrola izlučenog urinom 24 h nakon primjene iznosi 0,04 % primijenjene doze. Potpuna eliminacija resveratrola je zabilježena nakon 72 h [41].

## 1.2.4. INTERAKCIJE

Flavonoidi mogu modulirati metabolizam lijekova djelovanjem na ekspresiju i/ili aktivnost enzima CYP P450, djelovanjem na efluks lijekova posredovan P-glikoproteinom i/ili inhibicijom intestinalne glukuronidacije lijeka.

Oralna primjena resveratrola, čak i u visokoj dozi od 750 mg/kg tjelesne težine dnevno kroz 13 tjedana nije pokazala neželjene učinke. Međutim, postoji rizik od krvarenja zbog njegova inhibicijskog učinka na agregaciju trombocita ukoliko se primijeni zajedno s varfarinom, heparinom, klopidogrelom ili acetilsalicilnom kiselinom. Visoke doze resveratrola, kvercetina i kempferola mogu inhibirati CYP P450 i ući u interakciju s transporterima što posljedično modificira metabolizam nekih lijekova poput statina, blokatora kalcijevih kanala i antiaritmika uzrokujući ozbiljne nuspojave [91].

Primjenom 1 g resveratrola dnevno kroz četiri tjedna u zdravih volontera, zabilježeno je povećanje enzimске aktivnosti CYP1A2 za 16 % izmjereno kao smanjenje omjera kofeina i paraksantina te smanjenje enzimске aktivnosti CYP3A4 za 33 % izmjereno kao povećanje AUC buspirona, smanjenje CYP2D6 za 70 % izmjereno kao povećanje omjera dekstrometorfana i dekstrorfana [34, 38].

Inhibicija CYP3A4 rezultira povećanom koncentracijom lijeka u plazmi te može voditi do povećane toksičnosti. Teoretski, primjena veće količine resveratrola može povećati bioraspoloživost i rizik od toksičnosti lijekova koji se prvim prolaskom kroz jetru metaboliziraju enzimom CYP3A4. Iako jetra predstavlja glavni metabolički put, nedavne *in vitro* i *in vivo* studije su pokazale važnost uloge crijevnog mikrobioma u metaboličkoj sudbini polifenola u ljudi. One predlažu postojanje kompleksnih interakcija između polifenola i enzima CYP3A4 [92].

Enzim CYP2D6 je odgovoran za konverziju tamoksifena u aktivni anti-estrogen, endoksifen. Osobe sa smanjenim metabolizmom CYP2D6 zbog genetičkog polimorfizma ili enzimске inhibicije imaju smanjene razine endoksifena u krvi te povećan rizik od relapsa karcinoma dojke.

Polifenoli pokazuju inhibicijski učinak na enzim CYP2C9 koji je uključen u biotransformaciju različitih lijekova poput tolbutamida, fenitoina, diklofenaka i varfarina. Aromatski prsten B strukture polifenola stvara  $\pi$ - $\pi$  interakcije s aminokiselinskim ostatkom Phe100 u aktivnom mjestu enzima. Polifenoli se mogu vezati na isto vezno mjesto enzima kao i flurbiprofen stvarajući vodikove veze s molekulom vode u veznom mjestu.

Kombinacijska terapija diklofenaka i resveratrola može predstavljati novi pristup za smanjenje doziranja diklofenaka što rezultira smanjenjem gastrointestinalnih nuspojava.

Resveratrol inhibira aktivnost P-glikoproteina u *in vitro* i *in vivo* modelima. P-glikoprotein (P-gp) je ATP ovisan transporter MDRP (engl. *multi-drug resistant protein*) koji je uglavnom izražen na apikalnoj membrani crijeva. P-gp promiče eliminaciju mnogih lijekova u intestinalnom lumenu te ograničava njihovu gastrointestinalnu apsorpciju. P-gp može smanjiti intracelularnu koncentraciju mnogih citostatika te je uključen u rezistenciju tumorskih stanica na različite lijekove. Resveratrol potencira citotoksičnu aktivnost P-gp supstrata poput feksofenadina, docetaksela i daunorubicina zbog povećanih intracelularnih koncentracija. Resveratrol povećava kemoosjetljivost doksorubicina u stanicama karcinoma dojke rezistentnim na kemoterapiju povećanjem staničnog infliksa doksorubicina.

Resveratrol povećava ekspresiju *in vitro* enzima faze II te hem oksigenaze I i kinon reduktaze I *in vivo* što rezultira povećanom tolerancijom ishemije i povećanom rezistencijom na toksičnost menadiona.

Kempferol i kvercetin inhibiraju intestinalnu UDP-glukuronozil transferazu što uzrokuje povećanje bioraspoloživosti nekih lijekova. Resveratrol pokazuje sinergistički učinak s kvercetinom koji inhibira glukuronidaciju i sulfataciju resveratrola.

Primjena resveratrola u trudnoći je kontraindicirana. Resveratrol može interferirati s oralnim kontraceptivima zbog svog djelovanja na estrogenske receptore. Ne preporuča se primjena u trudnica jer su uočeni abnormalni razvojni učinci u fetalnom pankreasu primata [7, 8, 19].

## 1.2.5. TOKSIKOLOGIJA

Znanstveni podaci o sigurnosti primjene resveratrola u ljudi su ograničeni. Visoke doze resveratrola (600 – 700 mg/kg/dan) primijenjene na štakorima i psima kroz tri mjeseca nisu pokazale sistemsku toksičnost, genotoksičnost, reproduktivnu toksičnost kao ni nuspojave [1, 19].

Resveratrol nema hemolitički učinak na eritrocite u dozi od 100 µg/ml. Mehanizam citotoksičnosti resveratrola nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da se resveratrol brzo oksidira stvarajući vodikov peroksid. Za razliku od konvencionalnih antitumorskih lijekova, resveratrol ne uzrokuje mutagenezu. Međutim, uzrokuje smrt stanica karcinoma rezistentnih na kombinacijsku kemoterapiju. Ovo saznanje čini resveratrol i groždane polifenole atraktivnim kandidatima za adjuvantne kemoterapeutike.

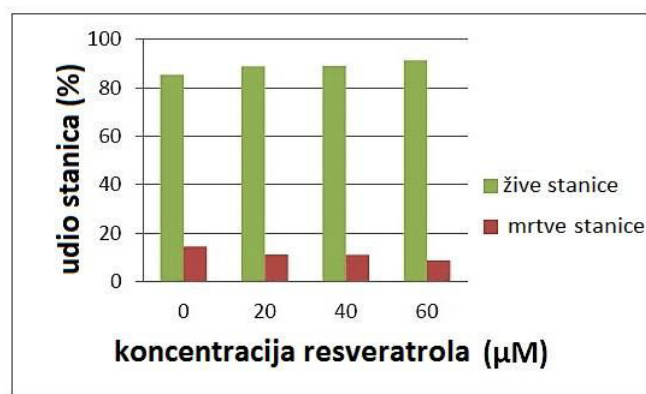
Resveratrol u visokoj dozi (3 g/kg) uzrokuje nefrotoksičnost. Oralna primjena resveratrola u dozi od 3000 mg/kg tjelesne mase u štakora kroz 28 dana je rezultirala povećanim serumskim razinama kreatinina, povećanom masom bubrega te povećanim brojem histopatoloških promjena u bubrezima. Primjena 300 ili 1000 mg resveratrola/kg/dan ne uzrokuje nefrotoksične događaje. Predominantni klinički znakovi nefrotoksičnosti su dehidracija s hiperalbuminemijom, piloerekcija i krv u urinu te anemija [18].

Farmakovigilancijske studije u ljudi su zabilježile gastrointestinalne nuspojave (nadutost, abdominalna bol, proljev, mučnina) kroničnom oralnom primjenom srednje visokih doza resveratrola (2 – 5 g). *Trans*-resveratrol se dobro podnosi u ljudi, a doza od 450 mg/dan predstavlja sigurnu dozu za osobu od 70 kg [20].

NUSPOJAVA	UČESTALOST (%)
dijareja	9,5 %
dispepsija	7,1 %
povećani apetit	4,8 %
promjena raspoloženja	4,8 %
menstrualne promjene	2,4 %
snovi	2,4 %
napadi vrućine	2,4 %
nesanica	2,4 %
smanjeni apetit	2,4 %
flatulencija	2,4 %
mučnina	2,4 %
abdominalna bol	2,4 %
miris urina	2,4 %

Slika 42: Najčešće nuspojave resveratrola nakon oralne primjene (prilagođeno prema [94])

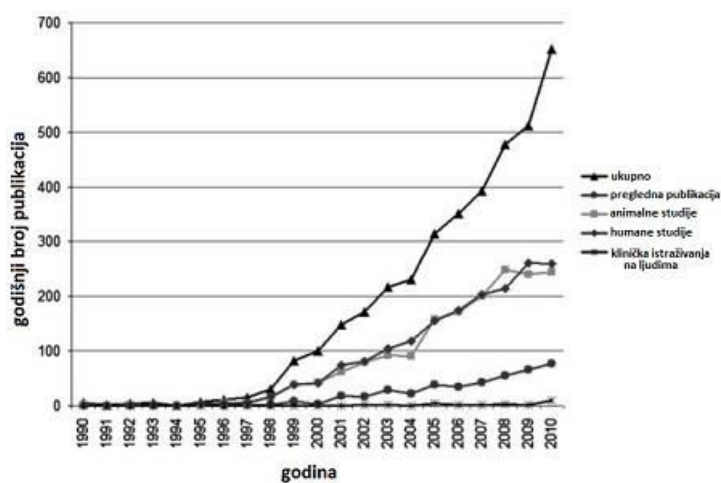
Objavljene studije su dokazale odsutnost akutne kožne i očne iritacije te ostalih alergogenih znakova. NOAEL za resveratrol iznosi 300 mg/kg/dan. U skladu s procjenom sigurnosti kozmetičkih proizvoda, maksimalna dozvoljena koncentracija ekstrakta lista vinove loze u kozmetičkim proizvodima koji se ne ispiru (parfemi) iznosi 3 %. Dozvoljena koncentracija ekstrakta grožđa i grožđanog soka iznosi 2 % u proizvodima za čišćenje lica i maskama koji se ispiru. Svi ostali se koriste u formulaciji < 1 % [93].



Slika 43: Učinak resveratrola na vijabilnost stanične linije HaCaT (prilagođeno prema [95])

## 1.2.6. KLINIČKE STUDIJE

Širok raspon farmakoloških aktivnosti groždanih polifenola na kožu je dokazan velikim brojem provedenih *in vitro* studija na staničnim modelima. Međutim, provedeno je samo nekoliko kliničkih studija koje dokazuju učinkovitost polifenola i njihove anti-age učinke.



Slika 44: Klasifikacija vrste provedenih studija kroz vrijeme (prilagođeno prema [34])

Većina istraživača u svojim istraživanjima koristi slobodni oblik resveratrola u koncentracijama koje su 10 – 100 puta veće od koncentracija postignutih u ljudskoj plazmi nakon oralne primjene što ne predstavlja realnu situaciju. Osim toga, resveratrol je otopljen u različitim organskim otapalima (DMSO, aceton) što također nije prihvatljivo za dostavu lijeka *in vivo*. Dostupno je samo nekoliko kliničkih studija o sigurnosti i bioraspoloživosti resveratrola, a podaci o resveratrolu u prevenciji starenja kože su u početnom stadiju.

**Tablica 3: Klasifikacija razine dokaza (prilagođeno prema [100])**

stupanj	razina dokaza
A	multipla dvostruko slijepa kontrolirana klinička studija
B	jedna dvostruko slijepa kontrolirana klinička studija
C	najmanje jedna kontrolirana ili komparativna klinička studija
D	nekontrolirana, osmatrana, animalna ili samo <i>in vitro</i> studija

Primjenom hidrogela CMC-a koji sadrži 1 µg/g resveratrola na 20 pacijenata u jednostruko slijepoj kontroliranoj pilot studiji kroz 60 dana je ispitan učinak na akne vulgaris. HPLC analizom je utvrđeno da resveratrol uklopljen u CMC gel i skladišten pri 4 °C ne konvertira u *cis*-izomer kroz 30 dana. Klinička evaluacija rezultata ispitivanja, na strani lica tretiranoj resveratrolom je pokazala smanjenje GAGS od 53,75 % u usporedbi s čistim CMC gelom od 6,10 % što predstavlja klinički relevantni i značajni učinak. Histološka analiza je pokazala redukciju površine komedona od 66,7 % na koži lica tretiranoj resveratrolom.

U jednoj kliničkoj studiji, oralnom primjenom 13,75 mg GSP-a dvaput dnevno tijekom 180 dana, na 47 muškaraca starosti 30 – 45 godina s fototipom kože I – IV prema Fitzpatrickovoj skali, dokazani su anti-age učinci na kožu. Smanjen je intenzitet tamnih mrlja udružen s pojavom proširenja pora. Korneometrijom je izmjereno povećanje hidratacije za 8,3 hidratacijskih jedinica te smanjenje pH kože za 0,2. Zabilježeno je povećanje dermalne gustoće za 38,4 jedinica. Biopsija je pokazala značajno povećanje sadržaja kolagena (+43 – 57 %) i elastičnih vlakana (+20 – 31 %) na licu fotoizloženog područja [98].

U dvostruko slijepoj kliničkoj studiji na 50 pacijenata u dobi od 35 – 65 godina, ispitana je anti-age učinkovitost oralne primjene resveratrola i procijanidina nakon 60 dana. Jedna kapsula Revidox®-a sadrži 8 mg *trans*-resveratrola i 14 mg procijanidina. Sistemski oksidacijski stres je značajno snižen, a razina kožnih



antioksidansa i antioksidacijski kapacitet plazme su značajno povećani u odnosu na placebo skupinu. Poboljšana je vlažnost i elastičnost kože, a hrapavost i dubina bora su smanjene kao i intenzitet staračkih pjega [82].

Kontroliranom kliničkom studijom kroz 12 tjedana na 55 žena u dobi od 40 – 60 godina topikalnom primjenom noćne kozmetičke formulacije sastavljene od resveratrola, baikalina i vitamina E je dokazan učinak na fine linije i bore, čvrstoću, elastičnost, ton kože, hiperpigmentacije, sjaj i hrapavost. Izmjerena biodostupnost resveratrola u koži je  $1,46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  [67].

Savršene kliničke studije su dvostruko slijepe, s kontroliranim placebo i velikim brojem volontera kroz dulje vrijeme kako bi dale statistički relevantne podatke. Međutim, takve kliničke studije za resveratrol još uvijek ne postoje. Dobivanje podataka iz dobro dizajniranih i provedenih studija je dugotrajni proces [100].

**Tablica 4: Provedene kliničke studije s učinkom resveratrola na kožu (prilagođeno prema [34])**

Stupanj dokaza	Broj volontera i trajanje	Učinak	Komentar
C	N=20 60 dana	terapijski učinak na akne	smanjenje GAGS-a za 53,7 % i broja mikrokomedona i ostalih lezija za 66,7 % inhibicijom upale i rasta <i>P. acnes</i>
C	N=15 4 dana	učinak na UV inducirano oštećenje kože	prevencija nastanka UVB induciranog eritema i povećanja sadržaja melanina
B	N=50 60 dana kapsula s 8 mg resveratrola	topikalni i sistemski učinci na kožne parametre i razinu sistemskog oksidacijskog stresa	značajno povećanje plazmatskog antioksidacijskog kapaciteta hidratacija i elastičnost kože su poboljšani, a hrapavost i dubina bora te intenzitet tamnih mrlja značajno sniženi
C	N= 47 kapsula s 13,75 mg GSP dvaput dnevno 180 dana	sistemski učinci na kožne parametre	povećanje hidratacije, dermalne gustoće te sadržaja kolagena i elastina  smanjenje pH kože i intenziteta tamnih mrlja udruženih s pojavom proširenih pora
C	N=55 90 dana topikalna noćna formulacija	poboljšanje kožnih parametara	poboljšanje kožnih parametara (fine linije i bore, čvrstoća i elastičnost, ton, hiperpigmentacije, sjaj, hrapavost) i povećanje ekspresije gena za HO-1 i kolagen tipa III
C	N= 16 (90 dana)	smanjenje rozaceje	smanjenje rozaceje u 80 % ispitanika

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je bio izrada preglednog rada o topikalnoj primjeni i učinku nanočestica s resveratrolom koji se temelji na objektivnom i kritičkom osvrtu na provedena *in vitro* istraživanja na staničnim kulturama i *in vivo* istraživanja na animalnim modelima te eventualnim kliničkim studijama na ljudima.

Također, cilj rada je bio odgovoriti na sljedeća pitanja:

1. Što možemo očekivati od molekule resveratrola? Budući "multitarget" lijek, dodatak prehrani za prevenciju bolesti ili oboje?
2. Na koji način se mogu poboljšati loša farmakokinetička svojstva groždanih polifenola, posebno resveratrola?
3. Može li topikalna primjena nano-resveratrola riješiti sve probleme farmakokinetike resveratrola?

### 3. MATERIJALI I METODE

Materijal za izradu ovog rada su znanstveni članci koji daju pregled stručnih informacija o resveratrolu i njegovim farmakodinamičkim učincima te mogućnosti njegove topikalne primjene.

U ciljanoj pretrazi na certificiranim i akreditiranim bazama podataka poput Pubmeda (Medline), Elsevier ScienceDirecta, Scopus, Evolvea, Knovela, Reaxysa, ClinicalKeya, Allied and Complementary Medicine Databasea, Natural Medicine Comprehensive Databasea, Embase i Cochrane Librarya, Human Metabolome Databasea, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomesa te ISI Web of Knowledge Science Citation Index Expandeda i Phenol Explorera 2.0 su korištene konstruktivne sintakse. Pretraživanje znanstvene literature je trajalo do kolovoza 2016. godine.

Ključni pojmovi u pretraživanju na engleskom jeziku su: vino, francuski paradoks, groždani polifenoli, izolacija polifenola, antocijani, flavonoidi, resveratrol, izolacija, farmakodinamika, farmakokinetika, biodostupnost, metabolizam, sigurnost i citotoksičnost resveratrola, dermalna dostava, formulacije, viniferin, koža, topikalna primjena resveratrola, hiperpigmentacija, tirozinaza, melanogeneza, kolagenaza, elastaza, sirtuini, anti-age učinak, antioksidacijska, protuupalna i antitumorska aktivnost, fotokancerogeneza, fotostarenje kože, paradoks resveratrola, mikroemulzije, nanotehnologija, SLN, NLC, ciklodekstrini, kitozan i oksidacijski stres.

## 4. RASPRAVA

### 4.1. PRISTUPI ZA POVEĆANJE BIORASPOLOŽIVOSTI RESVERATROLA

U zadnjih nekoliko godina, farmakoterapijski učinci resveratrola privlače pozornost mnogih istraživača. Međutim, slaba farmakokinetička svojstva poput niske topljivosti u vodi, niske fotostabilnosti i jakog metabolizma prvog prolaska kroz jetru rezultiraju slabom bioraspoloživošću.

Pristupi koji se mogu koristiti za povećanje bioraspoloživosti resveratrola su:

1. sinteza i/ili evaluacija prolijekova resveratrola i konjugiranih metabolita resveratrola koji mogu biti dekonjugirani u ciljnim organima
2. kombiniranje resveratrola s *in vivo* inhibitorima metabolizma resveratrola
3. primjena poboljšivača permeacije u sustavu mikroemulzija i polimernih otopina za topikalnu primjenu resveratrola
4. primjena nanotehnologije.

Razvoj prolijeka resveratrola poput karbamatnih estera omogućuje uvođenje novih fizikalno-kemijskih svojstava poput modifikacije topljivosti i osigurava prevenciju metaboličkih reakcija faze II čime se povećava njegova bioraspoloživost. Tri hidroksilne skupine resveratrola se mogu fosforilirati kako bi se smanjila razgradnja i osigurala veća fotokemijska stabilnost. Modificirani resveratrol se defosforilira u nativni, aktivni oblik enzimima koji se nalaze u epidermisu poput proteaza, esteraza, lipaza i fosfataza. Idealni prolijek ima dobru apsorpciju i karakteristike biotransformacije. Glikozilacija može predstavljati alternativni topljivi oblik za primjenu resveratrola koji ga štiti od oksidacije te povećava njegovu topljivost u citoplazmi [96].

Djelomičnom inhibicijom metabolizma resveratrola se mogu poboljšati farmakokinetička svojstva resveratrola poput njegove bioraspoloživosti i usporiti njegova eliminacija. *In vivo*, primjena alkaloida piperina iz crnog papra inhibira glukuronidaciju resveratrola, a flavonoidi poput kvercetina mogu inhibirati sulfataciju i glukuronidaciju resveratrola u jetri i dudodenalnom tkivu povećavajući njegovu bioraspoloživost [31].

### 4.1.1. TOPIKALNA PRIMJENA RESVERATROLA

Groždani polifenoli se široko primjenjuju u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji kao atraktivni anti-aging funkcionalni sastojci jer mogu proći *stratum corneum* i penetrirati do epidermisa i dermisa. Topikalno primjenjeni polifenoli se koriste za njegu i fotozaštitu kože te prevenciju karcinoma kože.

Topikalna primjena resveratrola predstavlja atraktivnu alternativu oralnoj i bukalnoj primjeni jer omogućuje izbjegavanje prvog prolaska kroz jetru, kontinuiranu dostavu, smanjenje nuspojava i bolju suradljivost pacijenata. Topikalna primjena može imati za cilj postizanje lokalnog učinka (dermalna primjena) ili postizanje sistemskog učinka (transdermalna primjena). Transdermalna dostava resveratrola je vrlo ograničena zbog vezanja na albumin koji je prisutan u velikoj količini u dermisu. Topikalna primjena resveratrola omogućuje direktno djelovanje na mjestu primjene izbjegavajući nepoželjne učinke povezane sa sistemskim metabolizmom.

Resveratrol ne utječe na morfologiju i vijabilnost epidermisa. Primjena 10 mM i 20 mM resveratrola na kulturi NHEK uzrokuje indukciju gena koji kodiraju za antioksidacijske enzime poput NQO1, glutation peroksidaze, glutation reduktaze i glutation S-transferaze.

U zadnje vrijeme, javlja se povećani interes za sistemskom i topikalnom primjenom groždanih polifenola za zaštitu kože od štetnog sunčevog zračenja s obzirom na mnogobrojne *in vitro* i *in vivo* studije koje su potvrdile njihovu fotozaštitnu ulogu.

Sredstva za zaštitu od sunca ne mogu apsorbirati, reflektirati ili raspršiti sve UV fotone što znači da ne mogu osigurati 100 % UV zaštitu kože. Proizvođači dermokožmetike radi ove činjenice ne smiju koristiti tvrdnju "sunblock" jer se precjenjuje njihova učinkovitost. Fenolne kiseline i flavonoidi u kombinaciji s UV filterima mogu osigurati uspješnu fotozaštitu kože smanjenjem oksidacijskog stresa, upale i imunosupresije te predstavljaju važnu sastavnicu kozmetičkih formulacija za primjenu prije i nakon sunčanja. Topikalna primjena UV filtera i antioksidansa je preporučljiva kako bi se minimizirala UV oštećenja kože nakon izlaganja suncu, kada su razine endogenih antioksidansa značajno snižene.

UV filteri se moraju zadržavati u *stratum corneum* da bi bili sigurni i učinkoviti. S druge strane, antioksidansi moraju penetrirati do vijabilnih kožnih slojeva jer UV zračenje penetrira duboko u kožu. Međutim, penetracija UV filtera u kožne slojeve može uzrokovati fotoosjetljivost i povećati rizik od toksičnih ili alergijskih reakcija.

Rezultati jedne *in vitro* studije pokazuju da beta karoten, sam ili u kombinaciji s resveratrolokom smanjuje zadržavanje UV filtera za 63 %. U *stratum corneum* je pronađeno oko 90 % UV filtera i 80 % antioksidansa. Kombinacija antioksidansa i UV filtera u fotozaštitnim kozmetičkim formulacijama povećavaju sigurnost primjene kozmetičke formulacije smanjenjem dostave UV filtera u *stratum corneum* i vijabilni dermis [54, 76].

#### 4.1.1.1. PENETRACIJA I PERMEACIJA RESVERATROLA

Penetracija polifenola je ograničena slabom topljivošću u vodenim i organskim otapalima. Slaba topljivost u vodi sprečava ugradnju visoke koncentracije čistog resveratrola u topikalne proizvode. Ovo je potvrđeno činjenicom da vodeći topikalni pripravci resveratrola često sadrže manje od 1 % čistog resveratrola u konačnoj formulaciji. Povećanje učinkovitosti uklapanja polifenola u kožu može smanjiti primijenjenu dozu i nuspojave kako bi se postigao željeni farmakološki učinak [21, 41,85].

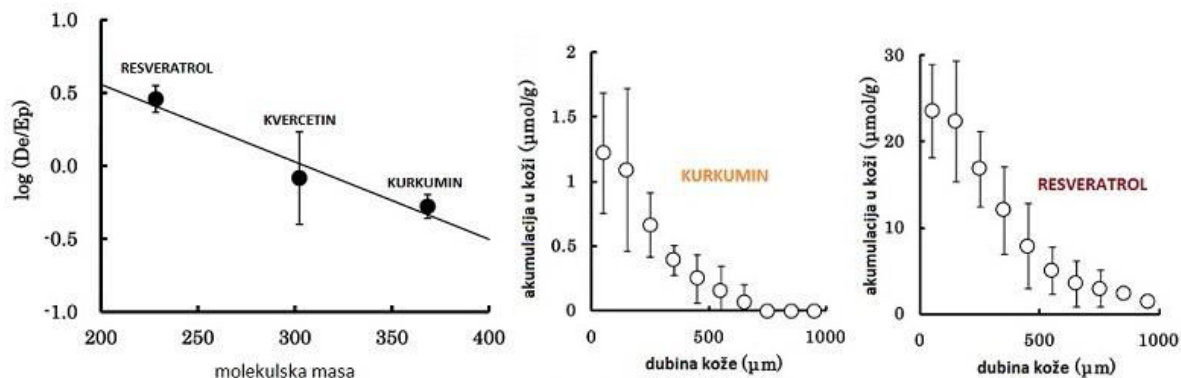
Oslobađanje resveratrola *in vitro* slijedi kinetiku pseudo 1. reda (Higuchi model) s difuzijom temeljenom na Fickovom zakonu od  $138,5 \mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$  i zastojnim (*lag*) vremenom od 0,49 h. Nakon 24 h, 62,6 % resveratrola permeira kroz ljudsku kožu. Topikalnom primjenom 49,30  $\mu\text{g}$  resveratrola ustanovljeno je da se 9,5  $\mu\text{g}$  resveratrola veže na receptore; 20,48  $\mu\text{g}$  resveratrola penetrira u *stratum corneum* i 21,41  $\mu\text{g}$  resveratrola je zadržano u vijabilnom epidermisu i dermisu [101].

Permeabilnost polifenola ovisi o vrsti polifenola, molekulskoj veličini i naboju, lipofilnosti te stabilnosti. Lipofilnije molekule kao i one neionizirane u odnosu na slabe baze/kiseline dublje prodiru kroz *stratum corneum*. Najviši stupanj permeacije imaju polifenoli najmanje veličine i najveće hidrofobnosti. Polifenoli veće hidrofilitnosti poput katehina i kurkumina se koncentriraju u *stratum corneumu*, a mala hidrofobna molekula resveratrola se uglavnom raspodjeljuje u dermisu. *In vivo* studijom na koži miševa je dokazano da neionski resveratrol u vodenoj otopini ima odličnu permeabilnost, čak i u odsutnosti poboljšivača apsorpcije poput  $\alpha$ -terpineola i oleinske kiseline. Ionizacija resveratrola se povećava porastom pH koji utječe na difuziju lijeka. Vijabilni epidermis/dermis čini barijeru za permeaciju neionskog resveratrola, a *stratum corneum* čini barijeru za anionski resveratrol. Resveratrol ima višu permeabilnost u potpuno ili djelomično neutralnim uvjetima u usporedbi s ionizirajućim uvjetima [4, 46, 96].

Da bi se osigurala dobro penetracija resveratrola kroz kožu, potrebno je spriječiti njegovo taloženje u nosaču formulacije što je teško postići zbog slabe topljivosti. Jedan od pristupa je korištenje surfaktanata poput polioksietilensorbitan monolaurata koji sprečava nastanak kopolimera i pospješuje solubilizaciju. Pritom treba imati na umu tzv. polarni paradoks koji podrazumijeva veću učinkovitost nepolarnih antioksidansa u vodi te njegova ograničenja na emulzije koje sadrže emulgatore sličnih svojstava fosfolipidima.



Kožna akumulacija resveratrola je veća u Aerosol OT mikroemulziji (2,2 %) u odnosu na mikroemulziju Tweena 80 (0,15 %) iako je topljivost resveratrola manja. Omjer akumulirane količine između epidermisa i dermisa za resveratrol iznosi 1:3.



**Slika 45: Utjecaj molekulske mase na udio permeacije polifenola (prilagođeno prema [111])**

Pri uklapanju resveratrola u emulziju potrebno je obratiti pozornost na promjenu reoloških svojstava. Primjerice, smanjenje viskoznosti se događa zbog interakcije polifenola i emulgatora, polifenola i proteina ili polifenola i polisaharida. Interakcija polifenola i proteina može rezultirati reverzibilnim kompleksiranjem koje uključuje stvaranje nekovalentnih veza (vodikove i hidrofobne veze te Van der Waalsove sile) ili ireverzibilnom agregacijom sa stvaranjem kovalentnih veza zbog oksidacije, procesa nukleofilne adicije ili enzimske transformacije. Stvaranje interakcija između polifenola i proteina može biti inhibirano nekim ionskim polisaharidima poput ksantanske gume ili pektina. Oni najčešće stvaraju gel mrežu u kojoj ksantanska guma stvara hidrofobne džepove te može uklopiti i kompleksirati polifenole.

Permeacija polifenola ovisi i o sastavu podloge. Povećanje sadržaja ulja u emulziji značajno smanjuje difuzijski koeficijent unutar formulacije. Niži sadržaj ulja u emulzijama zbog niže viskoznosti olakšava oslobađanje fenolnih tvari.

Permeacija flavonoida kroz kožu iz emulzije je ovisna o vrsti polialkohola i surfaktanta. Permeacijski koeficijent smanjuje se povećanjem duljine oksietilenskog lanca surfaktanta, a povećava se povećanjem molekulske mase polietilenglikola do vrijednosti 1500. Penetracijska sposobnost flavonoida ovisi o koncentraciji primijenjenih kozmetičkih aditiva. Uklapanje klorogenične kiseline, resveratrola, kurkumina i kvercetina u U/V mikroemulzije koje sadrže sukroza laurat ili di-2-etilheksil natrijev sulfosukcinat povećava njihovu penetraciju u dermis *in vitro* u odnosu na mikroemulzije koje sadrže Tween 80.

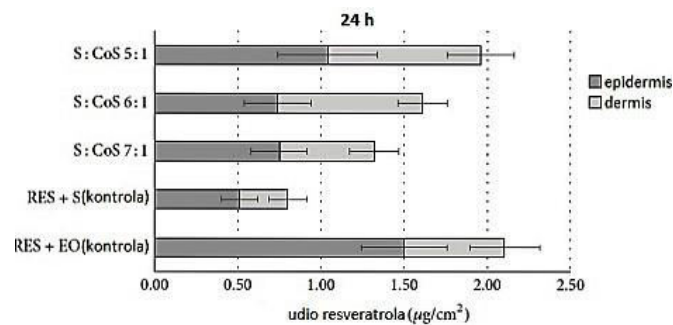
Apsorpcijska i penetracijska učinkovitost resveratrola nakon transdermalne primjene se može povećati koristeći vodotopljive baze poput makrogola i CMC gela u usporedbi s resveratrolom otopljenim u etanolu. Permeacija resveratrola se smanjuje povećanjem sadržaja CMC-Na u hidrogelu. *In vivo* permeacija resveratrola opada u slijedećem nizu: pufer pH 6 > CMC-Na hidrogel > sojino ulje. Resveratrol favorizira zadržavanje u sojinom ulju zbog svoje lipofilnosti, a zbog veće viskoznosti i rigidnije strukture je otežana difuzija. U odnosu na otopine, hidrogelovi omogućuju produljeno oslobađanje lijeka, a zbog velikog sadržaja vode bolja je permeabilnost. CMC-Na pokazuje umjerenu viskoznost i dobru bioadhezivnost na kožu. Polarnost i križno povezivanje unutar gela utječe na permeaciju lijeka. Transkutana penetracija i akumulacija slobodnog resveratrola u živom epidermisu miševa je poboljšana u vodenim, srednje kiselim puferima (pH=6) u obliku topikalno primijenjenih hidrogelova [96].

Hiperhidracija kože primjenom formulacije s visokim sadržajem vode dovodi do povećane kožne permeabilnosti odnosno transdermalne dostave topikalno primijenjenih lijekova zbog reorganizacije lipidnih lamelarnih struktura [10].

### 4.1.1.2. MIKROEMULZIJE

Mikroemulzije su termodinamički stabilni sustavi visokog solubilizacijskog kapaciteta i niske vizkozности sastavljeni od vodene i uljne faze, surfaktanta i kosurfaktanta koji olakšavaju ugradnju hidrofilnih i lipofilnih lijekova u kožu. Mikroemulzije osiguravaju povećanu apsorpciju djelovanjem površinski aktivnih tvari (PAT), dugotrajnu stabilnost i visoki kapacitet uklapanja te kontrolirano oslobađanje kozmeceutika i privlačna kozmetička svojstva. Poboljšana penetracija kozmeceutika u kožu je posljedica visokog koncentracijskog gradijenta i smanjenja barijerne funkcije rožnatog sloja.

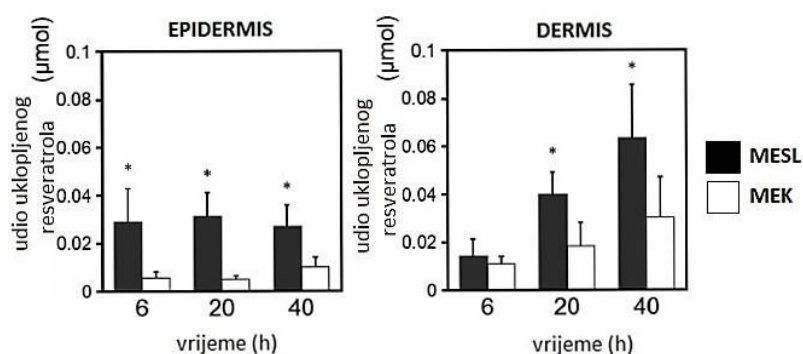
U dizajniranju i formuliranju optimiziranih formulacija mikroemulzija za topikalnu dostavu resveratrola koriste se pseudoternarni fazni dijagrami kako bi se smanjio broj eksperimenata i vrijeme potrebno za formuliranje optimalne mikroemulzije. Topljivost resveratrola je 160 puta veća u surfaktantu (PEG-8 kaprilni gliceridi) u odnosu na uljnu fazu. Najveća penetracija resveratrola kroz kožu *ex vivo* ( $1,96 \pm 0,41 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) je zabilježena u mikroemulziji pri omjeru surfaktanta i kosurfaktanta 5:1 [107].



**Slika 46: Utjecaj omjera surfaktanta i kusurfaktanta na kumulativni udio resveratrola (prilagođeno prema [22])**

Mikroemulzije imaju potencijal za razvijanje lokalne iritacije kože zbog ugradnje velike količine surfaktanta i kosurfaktanta (20 %). Kako bi se smanjio rizik od iritacije kože, koriste se surfaktanti niskog iritacijskog potencijala poput estera masnih kiselina sukroze. Esteri masnih kiselina sukroze su netoksični i biorazgradivi neionski surfaktanti koji sadrže hidrofilnu sukrozu i lipofilne masne kiseline. Sukroza smanjuje barijernu funkciju *stratuma corneuma* jer doprinosi njegovoj hidrataciji ugradnjom dugog ugljikovodičnog lanca estera masnih kiselina sukroze u lipofilne repove dvosloja.

Formulacijskim i penetracijskim studijama je uspoređen učinak estera masnih kiselina sukroze i Tweena 80 kao surfaktanata na penetraciju resveratrola u različite kožne slojeve. Resveratrol ima veću topljivost u mikroemulzijskom sustavu s Tweenom 80 (MEK) u odnosu na mikroemulzijski sustav koji sadrži estere masnih kiselina sukroze kao surfaktant (MESL). Uklapanjem resveratrola u U/V mikroemulzijski sustav MESL, udio resveratrola u dermisu raste s vremenom, a udio resveratrola u epidermisu je stalan 6 – 40 sati. U usporedbi s MEK, permeacija resveratrola iz MESL-a 40 sati nakon primjene je 19 puta veća u epidermisu (0,19 %) i 15 puta veća u dermisu kože svinje (0,45 %).



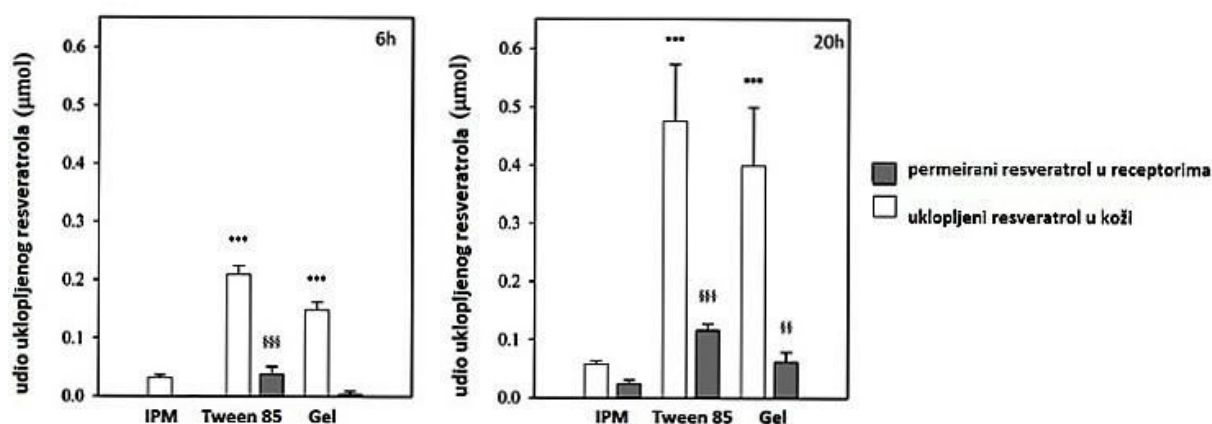
**Slika 47: Udio uklopljenog resveratrola tijekom vremena u epidermisu i dermisu svinje iz različitih mikroemulzijskih sustava (prilagođeno prema [108])**

Pooljšana permeacija resveratrola iz MESL se objašnjava većim koeficijentom difuzije resveratrola koji je rezultat niže viskoznosti te povećanom fluidizacijom i hidratacijom *stratuma corneuma* uzrokovanom penetracijom surfaktanta sukroza laurata [109].

U *in vivo* studiji, topikalna primjena U/V mikroemulzije oksiresveratrola (ORME) pet puta dnevno nakon HSV-1 infekcije u miševa uzrokuje odgađanje razvoja kožnih lezija i zaštitu od smrti. Mikroemulzija oksiresveratrola u koncentraciji od 25 % i 30 % je učinkovitija u inhibiciji rasta HSV-1 od 30 % oksiresveratrola u vazelinu te je jednako učinkovita kao 5 % krema aciklovira topikalno primijenjena pet puta dnevno. Niža viskoznost ORME u odnosu na oksiresveratrol u vazelinu rezultira višom permeacijom oksiresveratrola. *In vitro* permeacija oksiresveratrola kroz kožu zmiđe je 93 puta veća kad je oksiresveratrol uklopljen u mikroemulziju u odnosu na konvencionalni pripravak [4, 110].

Topikalna primjena resveratrola uklopljenog u mikroemulzijski gel povećava fotozaštitni učinak resveratrola na dorzalnoj koži gvinejskih svinja te potpuno prevenira UVB inducirano stvaranje eritema *in vivo*. Resveratrol uklopljen u mikroemulzijski gel, dobiven dodatkom 6,5 % Aerosila 200, značajno inhibira lipidnu peroksidaciju i stvaranje tiobarbituratne kiseline, TBA za 29,5 % u usporedbi s kontrolnim gelom bez resveratrola. Ovaj učinak se djelomično objašnjava većom učinkovitošću uklapanja resveratrola (0,23 %) u mikroemulzijski gel u odnosu na mikroemulzijski sustav s Tweenom 80 (0,15 %).

Aerosol OT mikroemulzija (di-2-etil-heksil-sulfosukcinat natrij) ima 5 – 10 puta veći udio ugradnje polifenola u kožu u odnosu na mikroemulziju Tweena 80 u koži gvinejskih svinja [111].



Slika 48: Učinak vrste surfaktanta na udio uklapanja resveratrola (prilagođeno prema [111])

## 4.1.2. NANOTEHNOLOGIJA

Ogromni terapijski potencijal resveratrola je ograničen nepovoljnim fizikalno-kemijskim i farmakokinetičkim karakteristikama. Veliki broj nedavnih istraživanja se temelji na uvođenju inovativnih formulacijskih strategija kojima se resveratrol uklapa u različite terapijske sustave. Nanotehnologija, u ovom kontekstu, predstavlja vrlo moćnu strategiju.

Nanomedicina predstavlja novo istraživačko polje koje ima mnoge tehnološke prednosti, izazove i ograničenja. Primjena nanotehnologije omogućuje poboljšanje slabih farmakokinetičkih svojstava resveratrola poput niske topljivosti i fotokemijske nestabilnosti, izbjegavanje metabolizma prvog prolaska kroz jetru te ulaska u enterohepatičku cirkulaciju čime doprinosi povećanju bioraspoloživosti. Osim navedenih prednosti, nanotehnološki pristupi osiguravaju smanjenje nuspojava u odnosu na konvencionalnu oralnu terapiju te kontrolirano i ciljano oslobađanje lijeka.

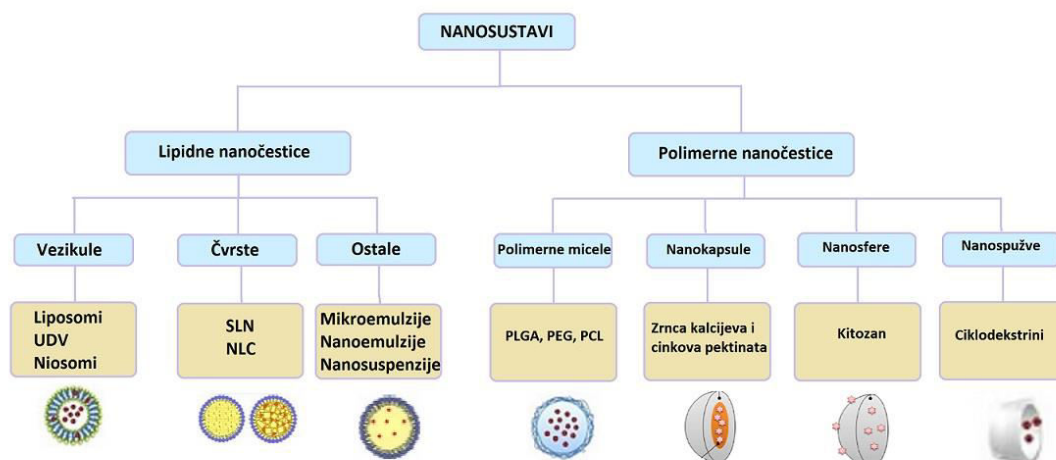
Nanotehnologija se široko primjenjuje u formuliranju dermokozmetičkih proizvoda jer osigurava povećanu topikalnu bioraspoloživost, stabilnost i kontrolirano oslobađanje bioaktivnih tvari te smanjeni rizik od iritacije kože i olakšanu primjenu dermokozmetičkog pripravka [97].

Karakteristike nanočestica poput veličine i polidisperznosti čestica, zeta potencijala, stupnja kristaliničnosti i lipidne modifikacije utječu na stabilnost i kinetiku oslobađanja lijeka. Zeta potencijal je ključni faktor u evaluaciji stabilnosti koloidne disperzije zbog njegove funkcije površinskog naboja. Čestice su stabilno dispergirane iznad apsolutne vrijednosti zeta potencijala od 30 mV zbog električke repulzije između čestica.

Prednosti nanočestica su moguća proizvodnja u industrijskom mjerilu, dugotrajna stabilnost, kontrolirano i odgođeno oslobađanje, izbjegavanje organskih otapala, mogućnost liofilizacije, mogućnost autoklaviranja i sterilizacije  $\gamma$  zračenjem te zaštita kože s organskim tvarima. Nedostaci nanočestica su visoki sadržaj vode u disperziji, niski kapacitet uklapanja hidrofilnih lijekova te cijena proizvodnog postupka.

Nanočestice imaju tendenciju pasivno prolaziti kroz propusnu vaskulaturu solidnih tumora zbog angiogenih krvnih žila u tumorskom tkivu koje imaju praznine veličine 400 – 800 nm. Također imaju sposobnost akumulacije zbog povećanog permeabilnog i retencijskog učinka. Povećanje koncentracije lijeka blizu stanične membrane povećava koncentracijski gradijent koji promovira fluks lijeka u stanicu. Dodatno, nanočestice ulaze u stanicu endocitozom što rezultira povećanim staničnim unosom uklopljenog lijeka te izbjegavanjem učinka pumpe P-glikoproteina [26, 28, 50, 89].

Idealne nanočestice moraju biti netoksične, biokompatibilne, biorazgradljive i neimunogene. Glavni izazov nanotehnologije predstavlja potencijalna toksičnost nanočestica.



Slika 49: Podjela nanočestica resveratrola (prilagođeno prema [104])

## **4.1.2.1. LIPIDNE NANOČESTICE**

### **4.1.2.1.1. VEZIKULARNE NANOČESTICE**

Vezikularni nanosustavi su najistraženiji nanonosači razvijeni inovativnim tehnološkim pristupima kako bi se povećala dermalna i transdermalna dostava lijeka do mjesta djelovanja te smanjile nuspojave i toksičnost lijeka [47].

#### **4.1.2.1.1.1. FOSFOLIPIDNE VEZIKULE**

##### **4.1.2.1.1.1.1. LIPOSOMI**

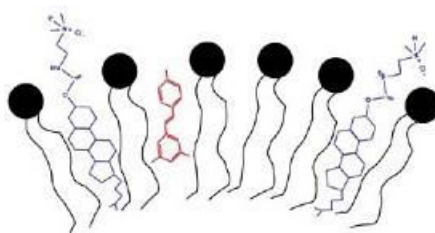
Liposomi predstavljaju najstarije terapijske nanosustave u kliničkoj primjeni i optimalne nosače zbog njihove biokompatibilnosti, širokog izbora fizikalno-kemijskih svojstava i lake pripreme. Lipofilni lijekovi se smještaju unutar fosfolipidnog dvosloja, a hidrofilni lijekovi se uklapaju u vodenu jezgru liposoma. Fosfolipidi koji najčešće čine liposome mogu biti neutralni poput fosfatidiletanolamina i fosfatidilkolina ili negativno nabijeni poput fosfatidne kiseline, fosfatidilinozitola, fosfatidilglicerola i fosfatidilserina.

Liposomi resveratrola se pripremaju miješanjem otopine lipida u kloroformu i otopine resveratrola u etanolu. Rehidracijom suhog lipidnog filma dobivenog otparavanjem otapala u vakuumu nastaju multilamelarni liposomi. Za dobivanje unilamelarnih liposoma potrebno je slijediti tri koraka: homogenizaciju putem osam ciklusa smrzavanja i odmrzavanja u tekućem dušiku te vodenoj kupelji na 50 °C, sonikaciju kroz pet ciklusa 20 sekundi na 70 % snage te ekstruziju kroz polikarbonatne membrane promjera pora od 100 nm. Nastale vezikule su veličine oko 100 nm te pokazuju prihvatljivu homogenu raspodjelu veličina sa stupnjem polidisperznosti, P.I.=0,25. Zeta potencijal je uvijek negativan (-30/-39 mV) zbog prisutnosti oleinske kiseline koja sprečava agregaciju vezikula stajanjem odnosno superficijalnom elektrostatskom repulzijom. Stabilitetne studije su pokazale da nema značajnih promjena ( $< \pm 10\%$ ) u fizikalno-kemijskim svojstvima tijekom 90 dana.



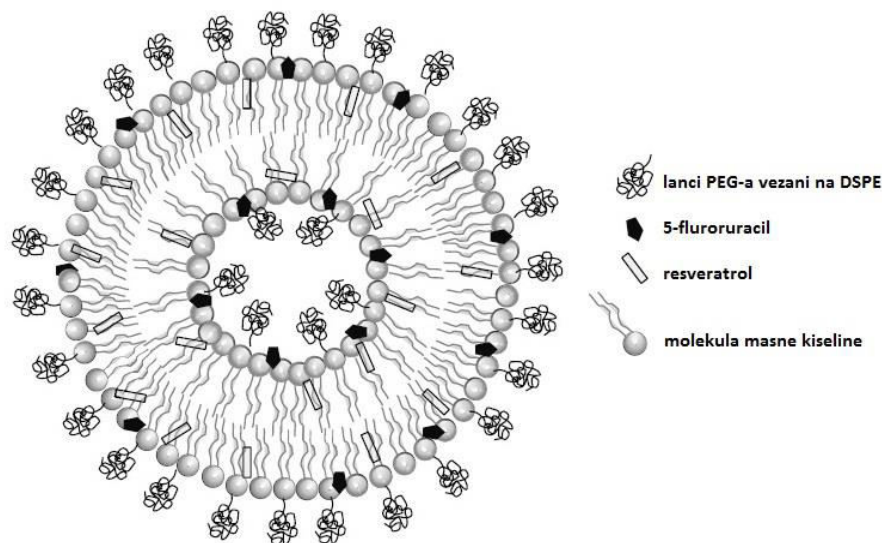
Liposomi s uklopljenim resveratrolom najčešće sadrže zasićeni fosfatidilkolin i kolesterol ili njihove pozitivno nabijene derivate. Resveratrol ulazi u interakciju s dvoslojem te je dublje uklopljen u kationske liposome u odnosu na zwitterionske liposome. Liposomalne formulacije s kationskim 3 $\beta$ -(N,N-dimetil-aminoetankarbamoil) kolesterolom (DC-CHOL) omogućuju povećani stanični unos resveratrola u usporedbi s zwitterionskim 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolinom (DPPC) zbog stvaranja elektrostatskih interakcija između nanočestica i anionskih proteina stanične membrane. Zwitterionski liposomi se oslanjaju na klatrin ovisnu i neovisnu endocitozu staničnog unosa, ali ovaj proces je obično nedovoljan. Resveratrol može povećati membransku fuziju kao posljedicu interakcije između kationskih liposoma i delokaliziranih konjugiranih  $\pi$  elektrona na polifenolima.

Primjerice, uklapanjem resveratrola u liposome koji su sastavljeni od polietilenglikol 2000-distearil fosfatidiletanolamina (DSPE-PEG 2000), smanjuje se veličina čestica sa 120 nm na 100 nm radi povećane lateralne repulzije površine u prisutnosti jake hidracije omotača oko polarnih glava DSPE-PEG 2000. Resveratrol pojačava učinak kemoterapeutika primjenom mitohondrijski ciljanog pristupa koji se koristi u kombinacijskoj kemoterapiji. Modificirani dekvalinijum-polietilenglikol-distearoilfosfatidil etanolamin (DQA-PEG 2000-DSPE) omogućava povećani stanični unos liposoma s uklopljenim resveratrolom u stanice karcinoma pluća rezistentnog na konvencionalnu kemoterapiju. Konačni stanični odgovor je povećana indukcija apoptoze radi povećanog staničnog unosa i akumulacije lijeka unutar mitohondrija što uzrokuje povećanu mitohondrijsku depolarizaciju.



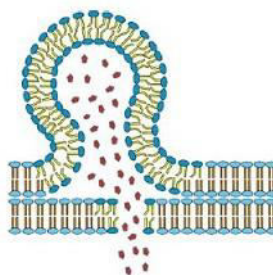
**Slika 50: Ugradnja resveratrola u fosfolipidni dvosloj liposoma (prilagođeno prema [102])**

Uklapanje resveratrola u liposome koji sadrže 5-fluorouracil (5-FU) je smanjeno zamjenom lipidne faze fosfatidilkolina s DSPE-PEG 2000 vjerojatno zbog povećane hidrofilnosti na površini liposoma. Prisutnost DSPE-PEG 2000 i resveratrola jako utječe na učinkovitost uklapanja 5-FU. Niske koncentracije resveratrola djeluju antagonistički, a visoke koncentracije resveratrola djeluju sinergistički na kemoterapijski učinak 5-FU. Uklapanjem 5-FU u liposome značajno se smanjuje udio resveratrola potrebnog za postizanje smrti u 50 % stanica (5,2 mM) u odnosu na liposome koji sadrže samo uklopljeni resveratrol (31 mM).



**Slika 51: Shematski prikaz PEGiliranih liposoma s uklopljenim resveratrolom i 5-fluorouracilom (prilagodeno prema [112])**

Liposomi se u dermatologiji koriste za povećanje topljivosti slabo topljivih lijekova te poboljšanje farmakokinetičkih svojstava i bioraspoloživosti. Oni povećavaju penetraciju hidrofilnih lijekova i smanjuju sistemsku apsorpciju lipofilnih lijekova smanjenjem njihove permeacije. Liposomi ulaze u interakciju s kožom koja se može temeljiti na adsorpciji (fuziji) liposoma, prolasku intaktnih vezikula te transfolikularnom (transglandularnom) putu. Fuzija liposomalne i stanične membrane omogućuje oslobađanje lijeka u citoplazmi.



**Slika 52: Fuzija liposoma (prilagodeno prema [129])**

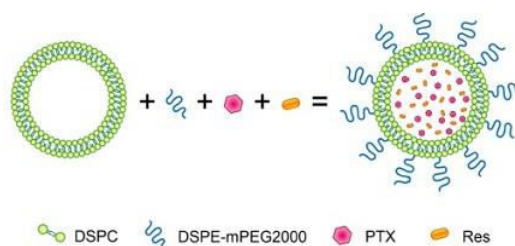
Liposomi se uglavnom zadržavaju u gornjim slojevima *stratum corneum* te djeluju kao spremnici lijeka smanjujući sistemsku apsorpciju lijeka. Oni poboljšavaju svojstva rožnatog sloja smanjenjem transepidermalnog gubitka vode (engl. *transepidermal water loss*, TEWL) te nadoknadom izgubljenih kožnih lipida povećavajući glatkoću kože. Prazni liposomi obnavljaju narušenu epidermalnu barijeru i povećavaju hidrataciju kože. Topikalnom primjenom resveratrola uklopljenog u fosfolipidne vezikule, zabilježen je visoki stupanj hidratacije, a toksičnost vezikularne formulacije *in vitro* na 3T3 fibroblastima nije dokazana nakon 24 h inkubacije. Visoki stupanj hidratacije se objašnjava stvaranjem okluzivnog filma vezikula na površini kože koji uzrokuje višu akumulaciju resveratrola [103].

Liposomi štite uklopljeni lijek od svjetla i ostalih razgradnih procesa te osiguravaju produljeno i kontrolirano oslobađanje lijeka čime se smanjuje rizik od iritacije kože. Resveratrol se uklapa u liposome s učinkovitošću od 70 – 83 % ovisno o vrsti lipida fosfolipidnog dvosloja. Uklapanje resveratrola u vezikule ne utječe na unutarnju antioksidacijsku aktivnost. Resveratrol uklopljen u liposome pokazuje dugotrajnu stabilnost te se zadržava na površini liposoma kao *trans*-stereoizomer. Primjerice, kemijska stabilnost *trans*-resveratrola je zadržana uklapanjem u liposome i skladištenjem na 4 °C i 37 °C kroz 48 h zaštićeno od svjetla. Stupanj izomerizacije resveratrola uklopljenog u liposome je značajno niži (29,3 %) nakon izlaganja UV zračenju tijekom 16 min u odnosu na resveratrol u slobodnom obliku (90 %) [20, 102].

Liposomi imaju važnu ulogu u prevenciji fotokemijske izomerizacije. Linearna konfiguracija *trans*-stereoizomera ne utječe na integritet dvosloja. Fotoizomerizacija resveratrola može potencijalno oštetiti integritet liposomalnog dvosloja jer posljedična izomerizacija u nelinearni *cis*-stereoizomer može uzrokovati destabilizaciju i fragmentaciju liposoma. Iako osiguravaju najveću stabilnost *trans*-resveratrola odnosno najniži stupanj fotoizomerizacije resveratrola (29,3 %) nakon 4 h izlaganja UV zračenju u odnosu na ostale nanočestice, liposomi su nestabilni nakon produljenog izlaganja (8 h) UV zračenju. Bez obzira na sposobnost prevencije fotokemijske izomerizacije resveratrola, liposomalne formulacije se preporučuje čuvati zaštićeno od sunčeva svjetla. Studijom kemijske stabilnosti je dokazano da liposomi s uklopljenim resveratrolom imaju potrebnu fizikalnu stabilnost čuvanjem na 4 °C do dva mjeseca s neznčajnim promjenama veličine čestica ili stupnja polidisperznosti.

Liposomi mogu sadržavati toksične koncentracije resveratrola u slobodnom obliku (100  $\mu$ M) jer je oslobađanje resveratrola iz liposomalne formulacije sporo i kontrolirano čime se izbjegava citotoksičnost. Uklapanjem resveratrola u liposome se povećava stanična vijabilnost za 233 % u odnosu na kontrolu nakon tri sata zračenja zbog sinergističkog učinka liposoma i resveratrola [4, 77].

Resveratrol je uklopljen standardnom ultrasoničnom disperzijskom metodom s paklitakselom u PEGilirane liposome za kombinacijsku kemoterapiju tumora rezistentnih na konvencionalnu kemoterapiju. Nanočestice veličine > 200 nm su „uhvaćene“ makrofagima u jetri i slezeni. PEGilirani liposomi s uklopljenim resveratrolom i paklitakselom su manje podložni djelovanju retikuloendotelnog sustava jer imaju čestice veličine oko 50 nm. Učinkovitost uklapanja paklitaksela iznosi 52 %, a resveratrola 56 %. U prva 24 h se brzo oslobodi 86 % paklitaksela i 71 % resveratrola iako liposomalna formulacija osigurava kontrolirano oslobađanje. Liposomi s uklopljenim resveratrolom pokazuju blagu, a kombinirani liposomi i liposomi paklitaksela jaku citotoksičnost u MCF-7 stanicama karcinoma dojke. Liposomi s uklopljenim resveratrolom i paklitakselom su pokazali najjaču citotoksičnost. Slobodni paklitaksel i resveratrol se brzo uklanjaju iz sistemske cirkulacije nakon primjene lijeka. Liposomalna formulacija osigurava visoke koncentracije paklitaksela i resveratrola u krvi s dužim vremenom cirkulacije. *In vivo* studije na miševima su dokazale povećanu bioraspoloživost lijekova i povećano zadržavanje u tumorima rezistentnim na terapiju. Kombinirani liposomi s uklopljenim resveratrolom i paklitakselom učinkovitije inhibiraju rast tumora osjetljivih i rezistentnih na terapiju *in vivo* bez značajnog povećanja toksičnosti.

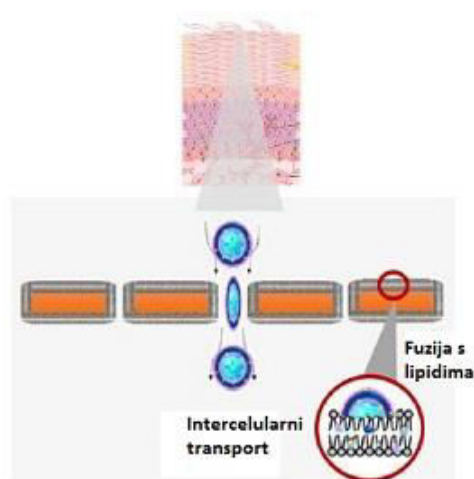


**Slika 53: Shematski prikaz PEGiliranih liposoma s uklopljenim resveratrolom i paklitakselom**  
(prilagođeno prema [113])

#### 4.1.2.1.1.2. ULTRADEFORMABILNE VEZIKULE

Ultradeformabilne vezikule (UDV) se koriste kao inovativne nanočestice u terapijskom pristupu za topikalnu i transdermalnu primjenu, a obuhvaćaju transferosome, etosome i transetosome. Sve ultradeformabilne vezikule su prikladne za dublju kožnu penetraciju jer imaju sposobnost prolaska kroz intaktnu kožu te mogu dostaviti uklopljene lijekove u dermis i sistemska cirkulaciju. Ultradeformabilne vezikule tvore netoksične i termodinamički stabilne formulacije. Deformabilni liposomi imaju manji promjer od konvencionalnih liposoma i manju uspješnost uklapanja djelatnih tvari.

Transferosomi su ultrafleksibilne elastične nanovezikule sastavljene od fosfolipida i rubnih aktivatora čija je prisutnost odgovorna za deformabilnost membrane. Najčešći rubni aktivatori su natrijev kolat i deoksikolat, Span 60, Span 65, Span 80, Tween 20, Tween 60 i Tween 80. Oni mogu penetrirati kroz kožne slojeve različitim mehanizmima ovisno o njihovom sastavu te dostaviti lijek u nekluzivnim uvjetima koji dopuštaju isparavanje vode iz formulacije i održavanje gradijenta hidratacije. Transferosomi lako mogu promijeniti svoj oblik i proći kroz kožnu barijeru zbog djelovanja rubnih aktivatora u odgovoru na mehanički stres smanjenjem membranske elastične energije do minimalne razine. Transferosomi imaju visoko deformabilnu membranu te mogu proći kroz pore kože čiji je promjer deset puta manji od veličine transferosoma. Udio penetracije transferosoma ne ovisi o koncentracijskom gradijentu. Transferosomi štite lijek od brzog klirensa te promiču zadržavanje lijeka u kožnim slojevima. Visoka topljivost *trans*-resveratrola u lipidnoj fazi i niska topljivost u vodi doprinosi visokoj učinkovitosti uklapanja *trans*-resveratrola u transferosome.



Slika 54: Shematski prikaz permeacije i penetracije ultradeformabilnih vezikula kroz kožu

(prilagođeno prema [49])

Etosomi su elastične vezikule veličine 150 – 200 nm koje se sastoje od fosfolipida, vode i velikog udjela etanola (20 – 45 %). Fosfolipidi poput fosfatidiletanolamina, fosfatidilinozitola, fosfatidilkolina i hidrogeniranog fosfatidilkolina se najčešće koriste u koncentraciji 0,5 – 10 %. Točan mehanizam permeacije i penetracije etosoma kroz kožu nije u potpunosti poznat. Etanol ulazi u interakciju s polarnim skupinama glave lipidnih molekula *stratuma corneuma* što uzrokuje smanjenje točke taljenja lipida *stratuma corneuma* te povećanje fluidnosti lipidnih dvosloja i povećanje permeabilnosti stanične membrane. Etanol isparava pod neokluzivnim uvjetima te se dostava lijeka etosomima može provoditi pod okluzivnim i neokluzivnim uvjetima. Sinergistička kombinacija povećane fluidnosti lipidnog dvosloja i etanola je vjerojatno odgovorna za promociju permeacije *trans-resveratrola* kroz kožu.

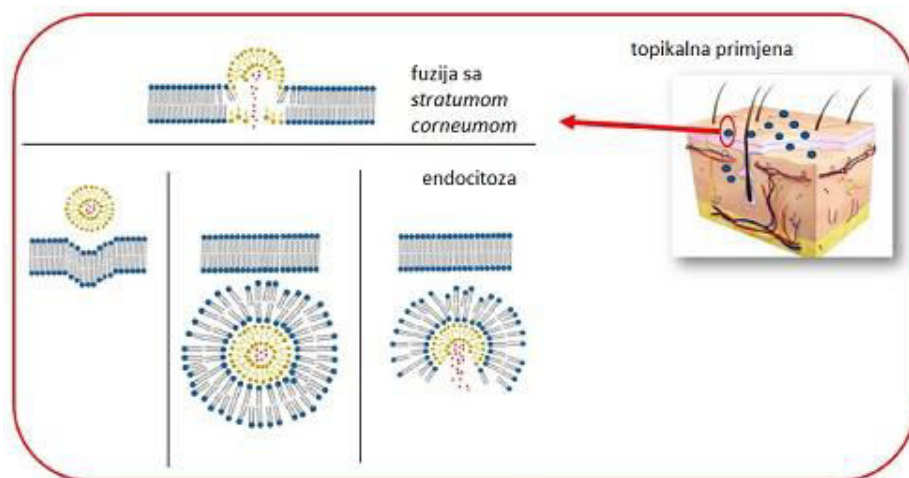
Prisutnost visoke koncentracije etanola (40 %) i posljedično visoka topljivost *trans-resveratrola* u hidracijskoj fazi može objasniti slabo uklapanje *trans-resveratrola* u etosomima. Toksičnost nanočestica je pod jakim utjecajem korištenog surfaktanta i koncentracije etanola.

Transetosomi su lipidne vezikule temeljene na transferosomima i etosomima. Sadrže visok sadržaj etanola (do 30 %) i rubni aktivator te su zbog toga nepravilna sferična oblika i povećane elastičnosti što uzrokuje preuređenje lipidnog dvosloja ovih vezikula. Udio penetracije transetosoma ne ovisi o koncentracijskom gradijentu. Zbog njihove nestabilne prirode i slabe kožne permeabilnosti prikladni su samo za topikalnu primjenu. Bez obzira na njihova svojstva elastičnosti i deformabilnosti, glavni nedostatak ovih vezikula je teškoća uklapanja hidrofobnih lijekova [104].

#### 4.1.2.1.1.2. NIOSOMI

Niosomi predstavljaju dobru alternativu liposomima, osobito u topikalnoj dostavi resveratrola. Primjena niosoma osigurava višu kemijsku stabilnost, nižu toksičnost i nižu cijenu u odnosu na liposome. Niosomi su vezikularni nanonosai koji povećavaju penetraciju lijeka te predstavljaju lokalni depo za produljeno oslobađanje lijeka. Niosomi su strukturno slični liposomima, a umjesto fosfolipida sadrže kolesterol i neionogene surfaktante poput sorbitanskih estera masnih kiselina (Span), parcijalnih estera masnih kiselina i polioksietilensorbitana (Tween, polisorbati). Neionogeni surfaktanti u niosomima su biorazgradivi, neimunogeni, netoksični i biokompatibilni te doprinose povećanju penetracije lijeka adsorpcijom, interakcijom s biološkim membranama, povećanjem barijerne funkcije i hidratacije *stratuma corneuma*.

Niosomi ulaze u interakciju sa staničnom membranom fuzijom ili endocitozom. Endocitozom se razgrađuje membranska struktura niosoma te se oslobađa uklopljena tvar u citoplazmu. Niosomi povećavaju barijernu funkciju *stratuma corneuma* reverzibilnom perturbacijom lipidne organizacije i hidrataciju *stratuma corneuma* smanjenjem TEWL-a.

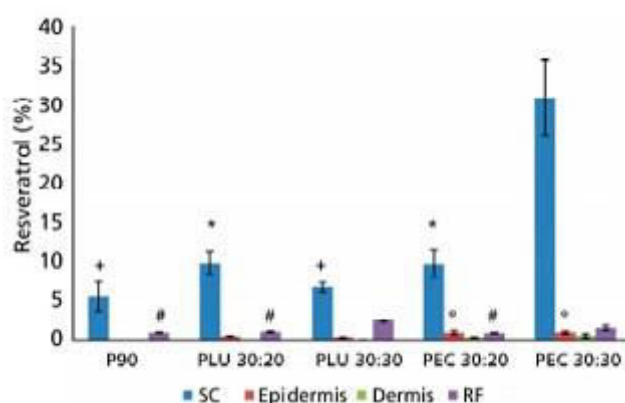


**Slika 55: Mogući mehanizmi djelovanja niosoma (prilagođeno prema [114])**

U odnosu na tzv. FILM metodu, metodom etanolnog injiciranja nastaju niosomi s uklopljenim resveratrolom čija je veličina čestica manja (299 – 402 nm), a učinkovitost uklapanja i stabilnost veća. *Ex vivo* transdermalna studija na svinjskoj koži pokazuje bolju penetraciju resveratrola (+21 %) iz niosoma pripremljenih metodom etanolnog injiciranja [105].

Usporedbom s liposomima, niosomi predstavljaju bolje nanonosae resveratrola jer omogućuju penetraciju resveratrola u dublje slojeve kože. Inovativni niosomi se pripremaju korištenjem različitih omjera biokompatibilnih oleina poput poligliceril-3-dioleata (PLU) ili glicerol monooleata (PEC) i kolesterola koji djeluju kao promotori penetracije. Niosomi s poligliceril-3-dioleatom (182 nm) su manji od niosoma s glicerol monooleatom (214 – 252 nm) zbog utjecaja hidrofилности. Kolesterol se koristi kao stabilizator membrane i njegova prisutnost je važna za stvaranje niosoma, ali njegov udio jako ne utječe na veličinu vezikula. PLU niosomi pokazuju fenomen sedimentacije i/ili vrhnjenja zbog veće gustoće PLU i niske gustoće kolesterola. PEC niosomi pokazuju samo fenomen vrhnjenja zbog niske gustoće obje komponente.

Niosomi sastavljeni od 30 mg/ml PEC-a i 30 mg/ml kolesterola omogućuju najvišu akumulaciju resveratrola u *stratum corneumu*. Primjena lamelarnih vezikula poput liposoma i niosoma uzrokuje interkorneocitne lamelarne šupljine, stvarajući kanale koji dopuštaju brzi i visoki fluks lijeka kroz kožu koji je najveći kad se koristi omjer PLU i PEC niosoma u omjeru 30:30 [47, 105].



**Slika 56: Udio akumuliranog resveratrola u *stratum corneumu*, epidermisu, dermisu i receptorima nakon topikalne primjene P90 liposoma te PLU niosoma i PEC niosoma (prilagođeno prema [105])**

Niosomi štite tvari od fotokemijske razgradnje te su prikladni za dostavu osjetljivih lijekova. Niosomi imaju negativnije vrijednosti zeta potencijala (-40 mV) u odnosu na liposome što ukazuje na veću stabilnost niosoma na agregaciju te rukovanje i skladištenje niosoma ne zahtjeva posebne uvjete.

Nedostaci niosoma poput fizikalno-kemijske nestabilnosti, agregacije i fuzije vezikula te gubljenja ili hidrolize uklopljena lijeka mogu smanjiti poluživot niosoma.



Toksičnost niosoma je povezana sa sposobnošću surfaktanata da razgrade eritrocitnu membranu. Primjerice, neionski surfaktanti su biokompatibilniji i manje toksični od anionskih, amfoternih i kationskih surfaktanata. Kraći ugljikovi lanci jače interkaliraju u membranu eritrocita, razaraju njihovu molekulsku organizaciju, niosomi teže ulaze u interakciju s biološkim membranama što rezultira značajnom hemolizom.

Niosomi s uklopljenim resveratrolom, alfa-tokoferolom i kurkuminom pokazuju sinergistički učinak na antioksidacijsku aktivnost u smanjenju slobodnih radikala. Niosomi s uklopljenim resveratrolom i kurkuminom uzrokuju 40 % inhibiciju slobodnih radikala, a niosomi s uklopljenim alfa-tokoferolom i kurkuminom uzrokuju potpunu inhibiciju slobodnih radikala (100 %). Međutim, niosomi s uklopljenim resveratrolom i kurkuminom pokazuju optimalnu učinkovitost s obzirom na veću permeaciju antioksidansa kroz kožu [31].

#### **4.1.2.1.1.3. FITOSOMI**

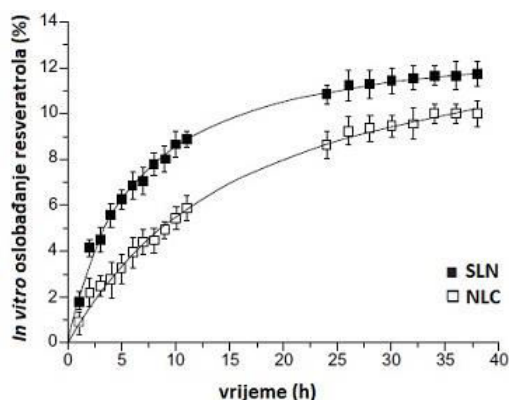
U fitofosfolipidnom kompleksu jedna ili više molekula fosfatidilkolina umotavaju molekulu polifenola. Fitosomi povećavaju oralnu bioraspoloživost i transdermalnu permeaciju polifenola. Particijski koeficijent fitosoma između n-oktanol i vode se nalazi u rasponu 1,16 – 1,92 što je povoljno za kožnu penetraciju. Fitosom je hibridna molekula koja ulazi u intestinalni trakt, njegove velike amfipatske karakteristike povećavaju njegovu tranziciju iz vodotopljivog okoliša intestinalnog lumena u lipidni okoliš stanične membrane enterocita. Permeacijskom studijom je dokazana bolja penetracija resveratrola kroz nepropusni *stratum corneum* iz fitosoma (37 %) u odnosu na slobodni resveratrol (21 %). SEM i XRD difraktogrami su prikazali smanjenu kristaliničnost resveratrola u kompleksu [26].

#### 4.1.2.1.2. ČVRSTE LIPIDNE NANOČESTICE

Čvrste lipidne nanočestice resveratrola su razvijene kao alternativni sustavi tradicionalnim koloidnim nosačima kako bi se izbjegla ograničenja slabe topljivosti i bioraspoloživosti, kratkog vremena poluživota, brzog metabolizma i eliminacije te fotokemijske nestabilnosti. Čvrste lipidne nanočestice se međusobno razlikuju prema građi i načinu uklapanja lijeka, a sastavljeni su od biorazgradivih i biokompatibilnih lipida koji imaju tzv. GRAS status (engl. *generally recognized as safe*) te predstavljaju nanosigurne nosače. Topikalno primijenjene čvrste lipidne nanočestice imaju niski iritacijski potencijal kože i nisku citotoksičnost za normalne ljudske keratinocite te osiguravaju kontrolirano oslobađanje lijeka.

Lipofilna priroda resveratrola ( $\log P=3,1$ ) preferira raspodjelu resveratrola u hidrofobnu koru čvrstih lipidnih nanonosaa. Uklapanje resveratrola u čvrste lipidne nanočestice je favorizirano jer njegova prisutnost smanjuje razinu uređenosti kristala smanjenjem entalpije taljenja bez učinka na točku taljenja. Manja razina uređenosti kristalne strukture uzrokovana uklapanjem resveratrola može spriječiti prerano oslobađanje resveratrola iz nanočestica i promovirati kontrolirano oslobađanje. Čvrste lipidne nanočestice s uklopljenim resveratrolo pokazuju dobru stabilnost tijekom 60 dana jer se stajanjem ne mijenjaju njihove karakteristike poput veličine čestica, zeta potencijala, indeksa polidisperznosti i učinkovitosti uklapanja. Veličina čestica i koncentracija resveratrola ne utječu na prosječnu učinkovitost uklapanja resveratrola u čvrste lipidne nanočestice koja iznosi 70 %.

Oslobađanje resveratrola iz čvrstih lipidnih nanočestica je bifazične prirode. Nakon brzog oslobađanja (oko 40 % resveratrola) u početnoj fazi slijedi kontrolirano oslobađanje. Prva faza brzog oslobađanja se objašnjava adsorpcijom molekula resveratrola na površinu čestice, a druga faza difuzijom resveratrola iz srži lipidnog matriksa. Bifazično ponašanje je u skladu s fizikalno-kemijskom prirodom resveratrola i njegovom interakcijom s lipidnim nanočesticama. Resveratrol je lipofilan te ima tendenciju lokalizacije u srži lipidnih nanočestica, ali zbog prisutnosti tri hidroksilne skupine koje imaju tendenciju lokalizacije blizu ljuske favorizira početno brzo oslobađanje unutar pet sati. Oslobađanje resveratrola je sporije iz NLC u odnosu na SLN što je posljedica razlike u kristaliničnosti lipidnog matriksa. Maksimalno oslobađanje resveratrola iznosi 12 % za SLN i 10 % za NLC [115].



**Slika 57: Bifazični profil *in vitro* oslobađanja resveratrola iz čvrstih lipidnih nanočestica (prilagođeno prema [115])**

Sferična struktura čvrstih lipidnih nanočestica (engl. *solid lipid nanoparticles*, SLN) sastavljena od hidrofobne jezgre čvrstih lipida okružene hidrofilnim surfaktantom omogućuje vrlo lako uklapanje hidrofobnih lijekova poput resveratrola u jezgru, iako i hidrofilni lijekovi mogu biti uklopljeni u čestice. SLN povećavaju kemijsku stabilnost uklopljenih lijekova zaštitom od hidrolize, oksidacije i fotorazgradnje te na taj način produljuju rok trajanja dermokozmetičkog proizvoda. SLN se pripravlja zamjenom tekućeg lipida U/V (nano)emulzije čvrstim lipidom ili smjesom čvrstih lipida tako da je matriks lipidne čestice čvrst pri sobnoj i tjelesnoj temperaturi. Resveratrol uklopljen u SLN ima veću bioraspoloživost, topljivost, fotokemijsku stabilnost i antilipoperoksidacijsku aktivnost u odnosu na konvencionalnu formulaciju resveratrola [20, 66].

Glavni nedostatak SLN-a predstavlja gubitak djelatne tvari (engl. *drug expulsion phenomena*) uzrokovan uređenom strukturom, relativno mali sadržaj uklopljenog lijeka zbog ograničene topljivosti u čvrstim lipidima i niska koncentracija lipida u vodenoj disperziji (0,1 – 30 %).

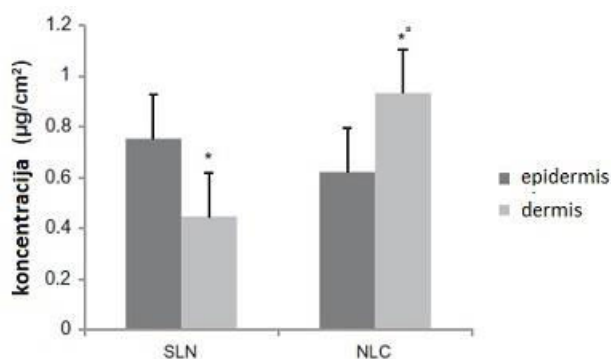
SLN sastavljeni od 5 % stearinske kiseline; 3,5 % poloksamera 407; 1,2 % sojinog fosfatidilkolina i 0,1 % resveratrola ostvaruju permeaciju kroz kožu od 45 % tijekom 24 h te su učinkovitiji u inhibiciji tirozinaze od klasičnih formulacija. Također nisu pokazali toksičnost na HaCat keratinocite.

SLN ostvaruju dobru permeaciju i akumulaciju u tumorskom tkivu zbog nepravilnosti i disfunkcije tumorske vaskulature te loše limfne drenaže. Klasične formulacije resveratrola i doksorubicina smanjuju vijabilnost HaCaT-a za 50 % pri koncentraciji od 4,4 µg/ml i 0,6 µg/ml. SLN s uklopljenim resveratrolom i doksorubicinom pokazuju nisku toksičnost. Ove nanočestice pokazuju citoksičnost pri koncentraciji od 25 µg/ml zadržavajući 85 % stanične vijabilnosti.

SLN kao nosači resveratrola u keratinocitima prolaze staničnu membranu, raspodjeljuju se u citosolu i lokaliziraju u perinuklearnoj regiji bez izazivanja citotoksičnosti. Ovi nanonosai su prikladni za topikalnu i transdermalnu primjenu resveratrola zbog mogućnosti pripreme bez upotrebe organskih otapala i sposobnosti prolaska kroz kožnu barijeru. Time osiguravaju produljeno i kontrolirano oslobađanje resveratrola u neoplastičnim stanicama kože bez uzrokovanja značajnih promjena u staničnoj morfologiji, metaboličkoj aktivnosti ili staničnom ciklusu [78].

Nanostrukturirani lipidni nosači (engl. *nanostructured lipid carriers*, NLC) su razvijeni kako bi se prevladala određena potencijalna ograničenja SLN-a poput ekspulzije lijeka. Sastoje se od uljne jezgre okružene polimernim omotačem stabiliziranim surfaktantom u vodenom mediju. Lipidnu jezgru čini smjesa čvrstih lipida i tekućih lipida u masenom omjeru 70:30 do 99,9:0,1. NLC ima visoki kapacitet za uklapanje slabo topljivih tvari te su prikladni za sistemsku i topikalnu primjenu lijekova [116].

NLC penetrira dublje u kožu u odnosu na SLN te je prikladniji za topikalnu primjenu. Koncentracija NLC-a s uklopljenim resveratrolom je najviša u dermisu. Permeabilnost resveratrola kroz sloj Caco-2 stanica je povećana 1,5 puta uklapanjem u NLC. Nakon četiri sata, kontrolirano oslobađanje resveratrola je sporije (5 %) iz NLC u odnosu na SLN (10 %) radi manje uređenosti lipidnog matriksa uzrokovane prisutnošću tekućih lipida u NLC čime se omogućava bolje uklapanje resveratrola. Prisutnost tekućih lipida u sastavu NLC-a uzrokuje veću fleksibilnost nanočestica i povećanje permeacije resveratrola vjerojatno paracelularnim transportom [28].



**Slika 58: Udio penetracije resveratrola uklopljenog u čvrste lipidne nanočestice u epidermisu i dermisu štakora (prilagođeno prema [117])**

Optimalna formulacija SLN-a i NLC-a se temelji na omjeru lipida i lijeka 60:1. U NLC-u optimalna koncentracija lipida iznosi 15 %. U formulaciju se može uklopiti 1 % resveratrola korištenjem hidrotopa kofeina i niacinamida kako bi se postigla optimalna koncentracija resveratrola u koži [117].

Klinička primjena resveratrola i kurkumina je trenutno ograničena slabom topljivošću. Uklapanjem resveratrola u NLC, povećava se njegova topljivost, bioraspoloživost i fotokemijska stabilnost te se smanjuju gastrointestinalne nuspojave. Ukoliko se u NLC s resveratrolom uklopi kurkumin, resveratrol penetrira u dublje kožne slojeve. NLC s uklopljenim polifenolima značajno ne utječu na profil stanične vijabilnosti ljudskih fibroblasta [4, 31, 119].

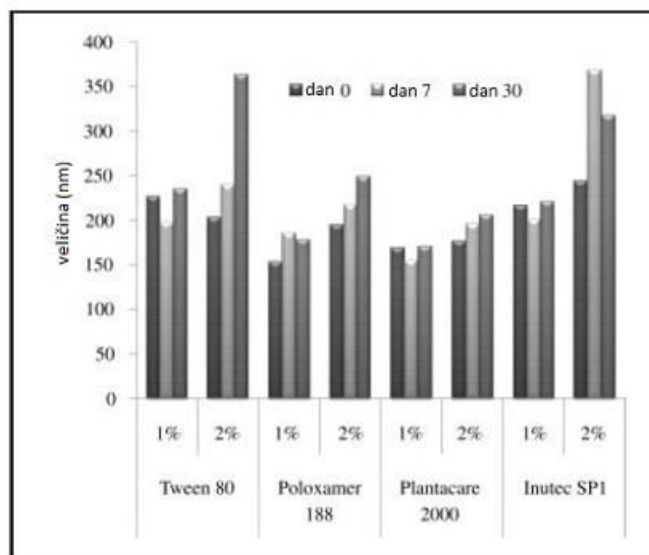
Čvrste lipidne nanočestice kao biorazgradivi i biokompatibilni nosači su izuzetno prikladni za topikalnu primjenu resveratrola zbog mogućnosti pripreme bez upotrebe organskih otapala te njihovih povoljnih učinaka na kožu. Čvrste lipidne nanočestice osiguravaju poboljšanu hidrataciju kože stvaranjem okluzivnog filma koji sprečava isparavanje vode na površini kože. Također djeluju kao fizički blokatori UV zračenja te mogu smanjiti potrebnu količinu UV filtera u formulaciji. Resveratrol uklopljen u NLC penetrira u dublje slojeve kože te time osigurava jači antioksidacijski učinak protiv oksidacijskog stresa uzrokovanog UV zračenjem.

#### 4.1.2.1.3. NANOSUSPENZIJE

Farmaceutski interes za razvoj nanosuspenzija je uglavnom fokusiran na oralnu i intravensku primjenu. Interes za razvojem topikalno primijenjenih nanosuspenzija se počinje javljati tek 2005. godine. Nanosuspenzija je submikronska koloidna disperzija čestica lijeka s dodatkom stabilizatora i surfaktanata koji osiguravaju veću topljivost i brži profil oslobađanja lijeka povećanjem omjera površine i volumena nanočestica manjih od 1  $\mu\text{m}$ .

Slaba topljivost i kristalinični oblik resveratrola predstavljaju glavni problem pri ugradnji resveratrola u mikročestice i konačni topikalni proizvod. Topljivost resveratrola se može povećati smanjenjem čestica iz mikrometarskih u nanometarske veličine. Nanosuspenzija resveratrola se u laboratorijskom mjerilu najčešće priprema "bottom-up" metodom. Resveratrol i surfaktanti se otope u etanolu čime nastaje otopina organske faze koja se filtrira kroz pore filtera od 0,22  $\mu\text{m}$ . Faza protuotapala se pripremi dispergiranjem specifične koncentracije stabilizatora u destiliranoj vodi. Otopina etanola se brzo uvodi u otopinu protuotapala (ispod 3 °C) uz snažno miješanje (9000 rpm). Suvremeniji način pripreme nanosuspenzije resveratrola (150 – 220 nm) predstavlja proces visokotlačne homogenizacije pri 1500 bara kroz 30 ciklusa u vodenoj otopini stabilizatora. Povećanjem broja ciklusa, smanjuje se veličina čestica i povećava topljivost resveratrola.

Nanosuspenzije za topikalnu primjenu se stabiliziraju steričkim stabilizatorima (polimeri ili makromolekule) ili neionskim surfaktantima koji ne iritiraju kožu. Osim zeta potencijala, stabilnost nanosuspenzije ovisi o koncentraciji korištenog stabilizatora. Primjerice, u stabilitetnoj studiji tijekom 30 dana na sobnoj temperaturi, 2 % otopina stabilizatora (Tween 80, Poloxamer 188, Plantacare 2000, Inutec SP1) je pokazala jednaku ili čak manju stabilnost nanosuspenzije s 5 % resveratrola od 1 % otopine stabilizatora. Kratkotrajne studije stabilnosti su pokazale da 2 % otopina stabilizatora nema prednost pred 1 % otopinom. Resveratrol ima entalpiju taljenja od 254,9 J/g i točku taljenja pri 270 °C. Dodatak stabilizatora smanjuje točku taljenja (259,2 – 260,6 °C) [120].



**Slika 59: Stabilnost nanosuspenzije resveratrola ovisi o vrsti primijenjenog stabilizatora (prilagođeno prema [120])**

Za dugotrajnu stabilnost konačnog proizvoda, svježe pripremljena nanosuspenzija se liofilizira s 3 % manitolom. Nakon brzog smrzavanja u tekućem dušiku, nanosuspenzije se suše smrzavanjem u liofilizatoru u vakuumu pri tlaku od 20 Pa kroz 48 h za dobivanje suhog liofiliziranog praška [121].

Uklapanjem resveratrola u nanosuspenziju postiže se dobivanje gotovo sferičnih čestica u amorfnom stanju te povećana topljivost i brzina otapanja kao posljedica povećanja površine. U odnosu na konvencionalnu formulaciju, antioksidacijska aktivnost nanoresveratrola određena DPPH metodom je jednaka, a maksimalna koncentracija resveratrola u plazmi  $C_{max}$  i vrijednost AUC su 3,35 i 1,27 puta veće u nanosuspenziji. Konačno, nanosuspenzije osiguravaju uklapanje veće količine resveratrola te više terapijske koncentracije resveratrola na mjestu djelovanja za postizanje boljeg farmakološkog učinka.

## 4.1.2.2. POLIMERNE NANOČESTICE

Polimerne nanočestice imaju važnu ulogu u nanokemoprevencijskom pristupu te osiguravaju fotokemijsku stabilnost, produljeno oslobađanje i povećanu bioraspoloživost lijeka. Polimerni nanonosaci imaju hidrofilni omotač i hidrofobnu jezgru u koju mogu biti uklopljeni slabo topljivi lijekovi poput resveratrola.

Primjena polimera mliječne kiseline (PLA) je ograničena slabom topljivošću u vodi. Polimeri kaprolaktona (PCL) se razgrađuju mnogo sporije od ostalih polimera te su prikladni za produljeno oslobađanje lijeka. Polimeri PLGA (engl. *polylactic-co-glycolic acid*), PEG (engl. *polyethylene glycol*), PCL (engl. *polycaprolactone*) i PLA (engl. *polylactic acid*) su biokompatibilni, biorazgradivi i netoksični nanonosaci te su odobreni za oralnu i topikalnu primjenu od FDA.

Sferične biorazgradive mikročestice PHBV-a i PCL-a s uklopljenim resveratrolom omogućuju odgođeno i kontrolirano oslobađanje. Mikročestice PHBV-a imaju hrapavu površinu s porama, a mikročestice PCL-a glatku površinu. U usporedbi s česticama PHBV-a koje imaju visoki indeks polidisperznosti, PCL mikročestice imaju homogeniju distribuciju veličina. Antioksidacijski potencijal uklopljenog resveratrola u PHBV/PCL mikročestice je zadržan, a ovisi o morfologiji mikročestica i profilu oslobađanja. Termogravimetrijskom analizom je utvrđeno da su PCL mikročestice termički stabilnije od PHBV mikročestica.

Uklapanje resveratrola u polimerni matriks nanočestica je ovisan o inicijalnom udjelu resveratrola. Učinkovitost uklapanja resveratrola u mikročestice PHBV-a iznosi 80 % uz omjer polimera i resveratrola 4:1 (20 % resveratrola). Ukoliko se smanji udio resveratrola na 5 % odnosno pri omjeru polimera i resveratrola 19:1, učinkovitost uklapanja se povećava s 80 % na 93 % [51].

Polimerne nanočestice koje sadrže amfilne kopolimere poput mPEG-PCL su sposobne uklopiti lipofilne lijekove u nanosferičnu strukturu s hidrofilnom vanjskom ovojnicom i hidrofobnom unutarnjom jezgrom. Stanični unos se odvija endocitozom što povećava penetraciju lijeka u stanicu te pokazuje višu terapijsku učinkovitost od primjene slobodnog lijeka. Uklapanje resveratrola u mPEG-PCL nanočestice uzrokuje značajno povećanje antilipoperoksidacijske aktivnosti resveratrola i povećanje citotoksičnosti na maligne glioma stanice u odnosu na ekvivalentne doze slobodnog resveratrola [20].



Polimerne nanočestice pokazuju bifazični profil oslobađanja. U početnom oslobađanju tijekom osam sati se oslobodi oko 35 % lijeka, iza čega slijedi produljeno oslobađanje tijekom pet dana. Nanočestice hidrofobnog polimera mliječne i glikolne kiseline (PLGA) s uklopljenim resveratrolo ostaju stabilne kroz šest mjeseci, a osiguravaju produljeno oslobađanje resveratrola tijekom 12 dana. Uklapanje resveratrola u PLGA nanočestice povećava udio apsorpcije sedam puta i AUC deset puta u usporedbi sa slobodnim oblikom što ukazuje na značajno povećanje bioraspodivnosti. Međutim, brzi retikuloendotelni sustav skraćuje cirkulacijsko vrijeme PLGA nanočestica unešenih procesom endocitoze. PEGilacija PLGA nanočestica je korisna strategija za prevenciju brzog unosa resveratrola i produljenog sistemskog cirkulacijskog vremena prevencijom vezanja opsonina na površinu nanočestica. PEGilacijska strategija se koristi za povećanje topljivosti i stabilnosti PLGA nanočestica, smanjenjem intermolekulske agregacije i imunogeničnosti.

Nanosustavi sastavljeni od biokompatibilnih PCL:PLGA-PEG COOH konjugata pripremljeni nanoprecipitacijskom metodom mogu kontrolirati oslobađanje resveratrola pri pH 6,5 i 7,4 čime se oponaša kiseli tumorski okoliš i fiziološki uvjeti. U fluidu koji oponaša gastrointestinalne uvjete, nanočestice oslobađaju oko 55 % resveratrola u prva dva sata u kiselom mediju te ukupni sadržaj resveratrola unutar slijedećih pet sati pri pH 7,4.

PEG-PLA nanočestice (PNP) i transferinom modificirane PEG-PLA nanočestice (Tf-PNP) s uklopljenim resveratrolo osiguravaju produljeno oslobađanje s najviše 10 % oslobođenog resveratrola u prva 24 h. Slobodni resveratrol, PNP i Tf-PNP pokazuju citotoksičnost u C6 glioma i U87 stanicama s tim da nanočestice s uklopljenim lijekom pokazuju veću citotoksičnost od samog resveratrola. Prazne nanočestice ne pokazuju citotoksičnost. Resveratrol, PNP i Tf-PNP se akumuliraju u moždanom tkivu i značajno smanjuju volumen tumora te omogućuju produljeno preživljavanje štakora s C6 gliomom.

Antikancerogena aktivnost bikalutamida uklopljenog u PEGilirane nanočestice resveratrola je mnogo veća od slobodnog bikalutamida što ukazuje da konjugati imaju sinergistički citotoksični učinak na stanice karcinoma.

Glavni nedostatak polimernih micela predstavlja ograničenje „*scale-up*“ procesa te ograničena stabilnost polimernih micela u krvi [50].

#### 4.1.2.2.1. PEKTINI

Pektini su heterogeni polisaharidi koji se sastoje od djelomično metoksilirane poli- $\alpha$ -1,4-D-galakturonske kiseline vezane L-ramnozom. Pektini su otporni na želučane i crijevne enzime, ali mogu biti potpuno razgrađeni bakterijskim enzimima u kolonu te predstavljaju prikladne nosače za specifičnu i ciljanu dostavu lijeka u kolon.

Slabo metoksilirani pektini (LMP) imaju više slobodnih karboksilnih skupina koje se mogu križno povezati s divalentnim kationima kalcija i cinka čime se povećava topljivost. Ionske interakcije između negativno nabijenih karboksilnih skupina molekule pektina i pozitivno nabijenih divalentnih kationa uzrokuju intermolekularno mrežno povezivanje odnosno stvaranje tzv. „egg-box“ konformacija. Cink je bolji agens za križno povezivanje pektinskih lanaca od kalcija jer stvara jaču mrežu pektinata te osigurava profil produljenog oslobađanja u kolonu. Međutim, u cinkovu pektinatu je slabije uklapanje resveratrola u odnosu na kalcijev pektinat koji ima manje čestice zbog stvaranja jače mreže pektinata.

Visoko metoksilirani pektini su manje topljivi od pektina nižeg stupnja metoksilacije. Kozmetičke formulacije s pektinima su stabilne (99 %) čak i nakon šest mjeseci ukoliko se skladišti na sobnoj temperaturi ili pri 4 °C te > 90 % kada se formulacija skladišti na 40 °C [20].

Kuglice cinkova pektinata se pripremaju ionotropnom gelacijskom metodom gdje pektinske kapi u kontaktu s divalentnim kationima stvaraju ionske interakcije između negativno nabijenih karboksilnih skupina pektinskih lanaca i pozitivno nabijenih divalentnih kationa. Preliminarne studije su pokazale da 1 – 10 % otopina cinkova acetata i 3 – 6 % otopina pektina daju pravilno oblikovana zrnca, a 5 % otopina cinkova acetata i 5 % otopina pektina se pokazala kao optimalna formulacija. Optimalno vrijeme reakcije je 30 min. Dulje vrijeme reakcije uzrokuje stvaranje većih i težih zrnaca s manjom efikasnoću uklapanja resveratrola. Slaba vodena topljivost resveratrola pridonosi uklapanju resveratrola u zrnca pektinata. Kuglice cinkova pektinata mogu uklapati visoki udio resveratrola te se mogu koristiti u formulaciji resveratrola s odgođenim oslobađanjem koje slijedi kinetiku nultog reda [106].

Stvaranje gela kalcijeva pektinata započinje dodavanjem kapi otopine dvovalentnog kalcija u vodenu otopinu pektina koja sadrži netopljivi resveratrol. Amidirani pektini jače reagiraju s kalcijem od neamidiranih pektina jer je smanjena hidrofilnost pektina čime se povećava njegova sposobnost stvaranja gela. Ove interakcije u amidiranom LMP-u omogućuju čvršće mrežno povezivanje između pektinskih lanaca što uzrokuje stvaranje kompaktnije mreže kalcijeva pektinata od neamidiranih i/ili HMP-a. Povećanje veličine čestica korelira s povećanom koncentracijom kalcijeva klorida što se objašnjava povećanom retencijom kalcija što vodi do povećane vodene retencije u zrcima zbog higroskopnog karaktera kalcijeva klorida. Visoka učinkovitost uklapanja resveratrola (> 97,7 %) se objašnjava slabom vodenom topljivošću resveratrola. Malo povećanje u učinkovitosti uklapanja se može postići povećanjem koncentracije kalcijeva klorida, resveratrola i pektina te smanjenjem vremena reakcije i pH [107].

#### 4.1.2.2.2. KITOZAN

Kitozan je biokompatibilni, biorazgradivi, netoksični i slabo imunogeni biopolimer sastavljen od  $\beta$ -(1,4)-vezanih jedinica D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina koji se široko primjenjuje u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Fizikalno-kemijska i biološka svojstva kitozana ovise o molekularnoj masi i stupnju deacetilacije koji utječe na broj protoniranih aminoskupina te time određuje svojstva polimera poput topljivosti, hidrofobnosti i sposobnosti elektrostatskih interakcija s polianionima.

Kemijske modifikacije kitozana omogućuju dobivanje željenih fizikalno-kemijskih svojstava. Prisutnost reaktivnih funkcionalnih skupina omogućuje modifikaciju kitozana sa žučnim kiselinama, šećerima i ciklodekstrinima te stvaranje tiolnih, karboksialkilnih i kvaterniziranih (N, N, N-trimetilkitozan, TMC) oblika kitozana. Primjerice, tiolni derivat kitozana ima mukoadhezivna svojstva zbog stvaranja disulfidnih veza s domenom glikoproteina bogatom cisteinom, amonij-kitozan pokazuje jača antimikrobna svojstva, a karboksimetilkitozan (CMC) ima veću topljivost. Nanočestice karboksimetilkitozana s uklopljenim resveratrolom pokazuju povećanu *in vivo* apsorpciju, produljeno vrijeme djelovanja te 3,516 puta veću relativnu bioraspoloživost u odnosu na klasičnu formulaciju resveratrola [121].

Kitozan je bioadhezivni i biokompatibilni polimer koji ima nezamjenjivu sposobnost stvaranja filma pri neutralnim i alkalnim pH vrijednostima te uzrokuje povećanje penetracije lijeka bez stvaranja kožnog stresa u koži. Elektrostatske interakcije između pozitivno nabijenih aminoskupina kitozana i negativno nabijenih glikoproteinskih ostataka na površini stanica uzrokuju uspješnu apsorpciju lijeka u osnovnom epitelu procesom pasivne difuzije.

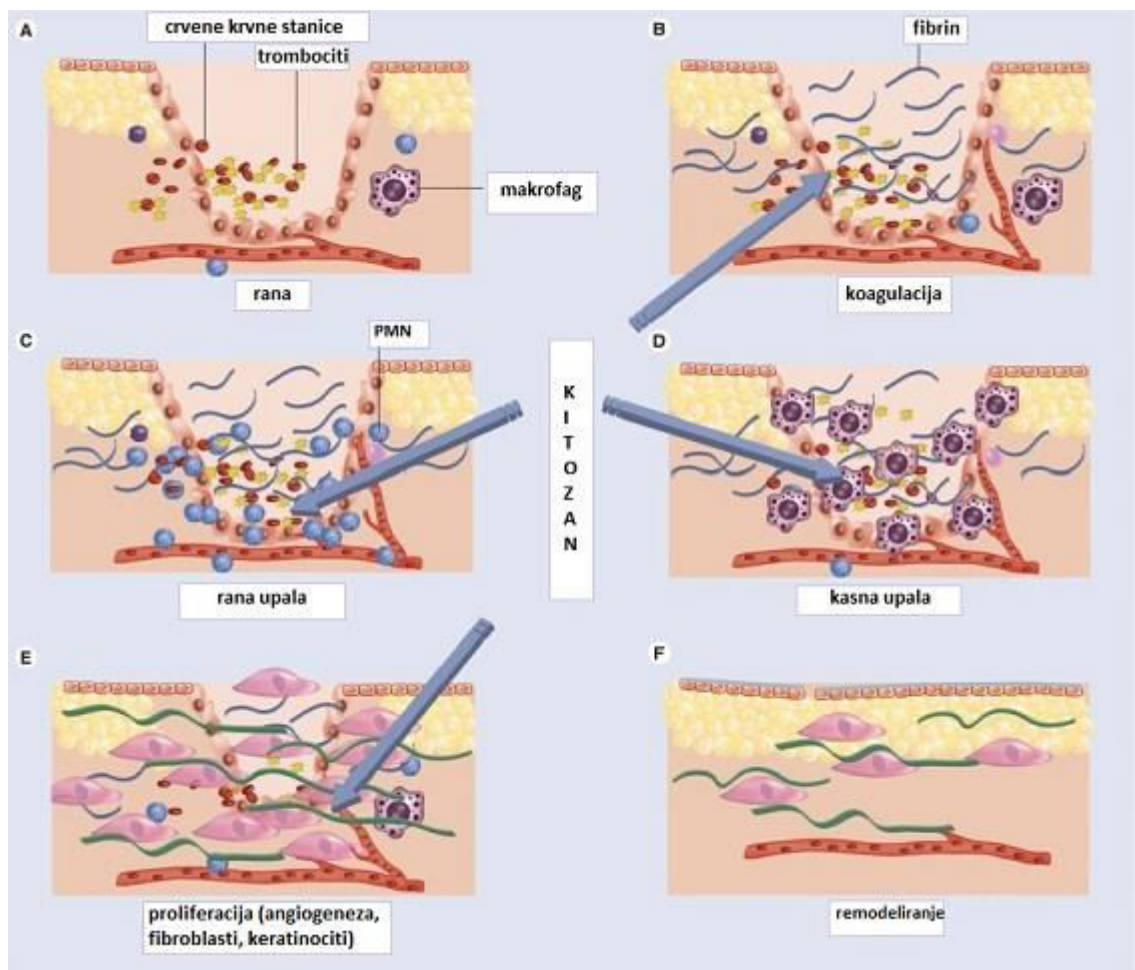
Kitozan ima antimikrobna, antioksidacijska, antidijabetička, protuupalna, antikancerogena i hipokolesterolemijska svojstva. Antimikrobna svojstva kitozana su dokazana *in vitro* te *in vivo* kliničkim studijama na ljudima. Prazne kitozanske nanočestice mogu inhibirati proliferaciju bakterija poput *E. coli*, *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. aureus* te *P. acnes*. Nanočestice kitozana i alginata ostvaruju protuupalni učinak u ljudskim monocitima i keratinocitima inhibicijom stvaranja upalnih citokina induciranih *P. acnes*.

Mogući mehanizam antimikrobnog djelovanja kitozana je inhibicija rasta bakterija keliranjem metala te destabilizacija vanjske membrane G- bakterija i povećanje permeabilnosti plazmatske membrane. Ovaj učinak je posljedica interakcije između pozitivno nabijenih molekula kitozana i negativno nabijenih mikrobnih membrana što uzrokuje oštećenje membrane i lizu stanica s istjecanjem citoplazmatskog sadržaja.

Pri nižim koncentracijama (< 0,2 mg/ml), polikationski kitozan se veže na negativno nabijenu bakterijsku površinu i uzrokuje aglutinaciju, a pri većim koncentracijama velik broj pozitivnih naboja ima prenesen *neto* pozitivni naboj na bakterijsku površinu te ih zadržava u suspenziji.

Svojstva kitozana poput molekulske mase, DDA i ionske jakosti te pH otopala mogu utjecati na antimikrobni učinak. Također, fizikalno stanje kitozana poput filma, hidrogela ili otopine mogu utjecati na antimikrobnu aktivnost. Antibakterijska aktivnost kitozana je veća pri nižem pH. Kitozan u koncentraciji od 0,1 % ima jači baktericidni učinak na G+ nego na G- bakterije.

Kitozan se široko primjenjuje kao topikalni zavoj u postupku cijeljenja rana zbog njegovih hemostatskih, antimikrobnih, netoksičnih, biokompatibilnih i biorazgradivih svojstava. Kitozan može ubrzati infiltraciju polimorfonuklearnih stanica (PMN) u ranom stupnju cijeljenja rana kao i stvaranje kolagena u fibroblastima. Klinički podaci pokazuju da kitozanska mreža promiče učinkovitu adherenciju, hemostazu, cijeljenje i reepitelizaciju rana te smanjuje svrbež i osjetljivost na bol.



Slika 60: Djelovanje kitozana na faze cijeljenja rane (prilagođeno prema [122])

Kitozan predstavlja učinkovit nanonosac u oralnoj i transdermalnoj primjeni. Lijek se može uklopiti u nanočestice kitozana aktivnim ili pasivnim putem. Aktivno uklapanje lijeka se provodi tijekom pripreme nanočestica, a pasivno uklapanje lijeka se provodi nakon pripreme nanočestica. Uklapanje lijeka ovisi o topljivosti lijeka u srži polimera, dodatku surfaktanta koji stabilizira disperziju, veličini i morfologiji, površinskom naboju i elektroforetskoj pokretljivosti, površinskoj hidrofobnosti te gustoći.

Prisutnost hidroksilnih skupina u molekuli resveratrola omogućava stvaranje jakih vodikovih veza i promoviranje kompleksacije s kitozonom ili alginatom. Veća učinkovitost uklapanja resveratrola u nanočestice obložene kitozonom u odnosu na nanočestice obložene alginatom je vjerojatno posljedica prisutnosti različitih funkcionalnih skupina u kitozanu koje stvaraju ionske interakcije s resveratrolom. Omjer polimera i lijeka je važni čimbenik tijekom formiranja mikročestica koji utječe na učinkovitost uklapanja. Udio uklopljenog resveratrola je veći pri nižim koncentracijama kitozana ili alginata radi povećanja početnog omjera resveratrola i polielektrolita. Primjerice, učinkovitost uklapanja resveratrola se povećava s 94 % na 99 % smanjenjem koncentracije kitozana visoke (310 – 375 kDa) i srednje molekulske mase (190 – 310 kDa) s 1 % na 0,5 % te smanjenjem kristaliničnosti mikrosfera. Povećanje koncentracije otopine kitozan tripolifosfata s 1 % na 3 % uzrokuje smanjenje početnog oslobađanja resveratrola.

Oslobađanje lijeka iz kitozanskih nanočestica ovisi o stupnju umrežavanja, morfologiji, veličini, gustoći, fizikalno-kemijskim svojstvima lijeka te prisutnosti adjuvansa. Udio oslobođenog lijeka također ovisi o topljivosti lijeka, desorpciji površinski adsorbiranog lijeka, difuziji lijeka kroz matriks nanočestica, eroziji ili razgradnji matriksa nanočestica te kombinaciji erozijskih i difuzijskih procesa. Oslobađanje resveratrola iz kitozanskih nanočestica uključuje tri različita mehanizma: oslobađanje s površine čestica, difuziju kroz nabubreni matriks i oslobađanje zbog erozije polimera.

Kitozanske nanočestice s uklopljenim resveratrolom pokazuju bifazični profil oslobađanja. Početno brzo oslobađanje je uzrokovano brzom difuzijom resveratrola iz nanočestica. Drugi stupanj oslobađanja predstavlja sporo kontrolirano oslobađanje ovisno o pH vrijednosti medija koje prati Higuchijev model. Slabije oslobađanje je zabilježeno pri višim pH vrijednostima zbog protonacije aminoskupina kitozana koje postaju pozitivno nabijene.

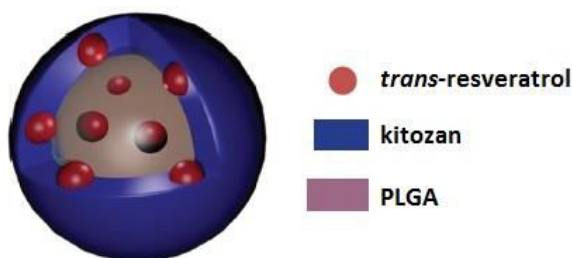
Brzo oslobađanje omogućuje brzo postizanje učinkovite koncentracije resveratrola u plazmi, a kontrolirano oslobađanje omogućava zadržavanje učinkovite koncentracije resveratrola u plazmi kroz dulje vrijeme. Nanosustavi CNP-a omogućuju oslobađanje resveratrola tijekom šest mjeseci [89, 123].

Stabilnost koloidnog polimernog nosača ovisi o uvjetima skladištenja (temperatura, pH), tipu i molekulskoj težini korištenog polimera te kemijskoj stabilnosti uklopljenog lijeka. Uklapanje resveratrola u CNP osigurava zaštitu od razgradnih reakcija te smanjenje stereoizomerizacijskih reakcija [123 – 124].

Vanilin se vrlo često koristi u kozmetičkim i ljekovitim pripravcima kao mrežni agens GRAS statusa za dobivanje kitozanskih mikrosfera koje osiguravaju kontrolirano oslobađanje lijeka. Ove mikrosfere nastaju Schiffovom reakcijom baza između aldehidne skupine vanilina i aminoskupine kitozana.

Kitozanske mikrosfere s vanilinom mogu smanjiti razgradnju resveratrola u velikoj mjeri te povećati njegovu termostabilnost. Mehanizmi povećanja termostabilnosti resveratrola uključuju stvaranje vodikovih veza između hidroksilnih skupina resveratrola i kitozana što povećava točku taljenja resveratrola te fizičko uklapanje u sferični matriks.

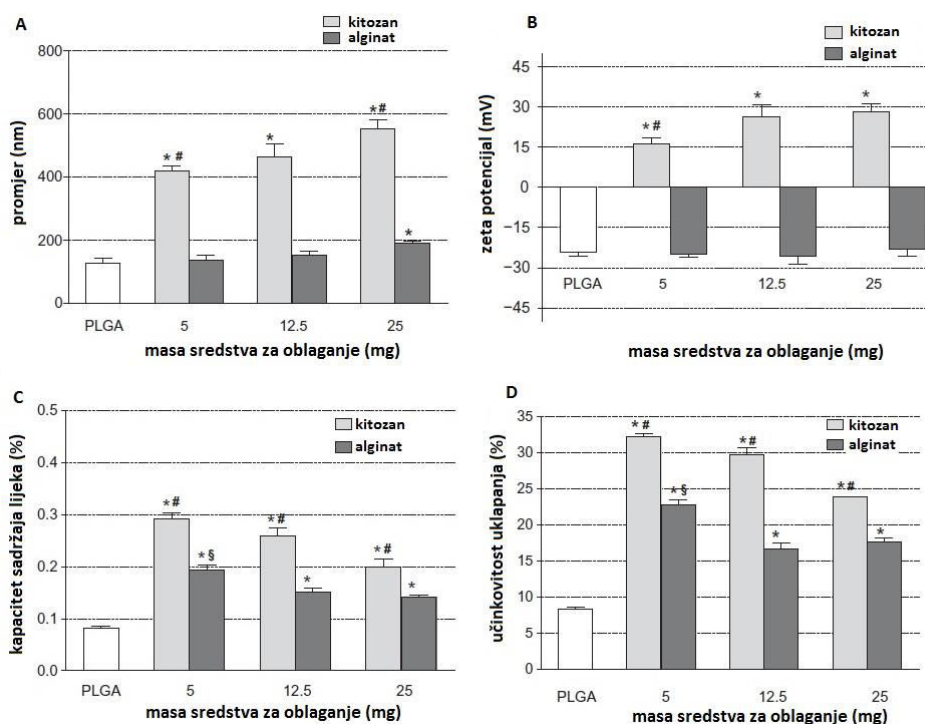
Kitozonom obložene PLGA nanočestice resveratrola se pripremaju nanoprecipitacijskom metodom koja se temelji na fizikalnoj adsorpciji i/ili elektrostatskim interakcijama između polimernih lanaca i oblagajućeg materijala. Protonirane aminoskupine kitozana osiguravaju stvaranje intermolekulskih vodikovih veza s krajnjim karboksilnim skupinama PLGA te adsorpciju kitozana na površinu PLGA vodikovim vezama ili Van der Waalsovima stvarajući pozitivni naboj na površini.



**Slika 61: Shematski prikaz PLGA nanočestice obložene kitozonom (prilagođeno prema [125])**

Zeta potencijal neobloženih PLGA nanočestica je negativan ( $-24 \pm 1,5$  mV) zbog krajnjih karboksilnih skupina PLGA. Nanočestice obložene kitozonom su elektropozitivne što potvrđuje prisutnost polimera na površini PLGA.

Učinkovitost uklapanja resveratrola u neobloženim PLGA nanočesticama je značajno niži ( $8,36 \pm 0,27$  %) u odnosu na obložene formulacije (23 % za alginat i 32 % za kitozan) što upućuje na zaključak da se tijekom nanoprecipitacije samo mali udio resveratrola uklapa u PLGA matriks.



**Slika 62: Učinak oblaganja kitozanom i alginatom na karakteristike PLGA nanočestica resveratrola (prilagodeno prema [125])**

Mikrokapsule pripravljene V/U/V dvostrukom emulzijskom metodom sastavljene od resveratrola, kitozana, PLGA te PLA kao stabilizatora imaju značajno slabije oslobađanje resveratrola od mikrokapsula koje sadrže samo PLGA. Ove mikrokapsule osiguravaju stabilnost resveratrola tijekom šest mjeseci [125].

Koncentracija kitozana utječe na veličinu i morfologiju mikrokapsula te učinkovitost uklapanja i profil oslobađanja. Koncentracija kitozana od 4 % je optimalna za učinkovito uklapanje i kontrolirano oslobađanje resveratrola. Lipidne mikročestice resveratrola obložene kitozanom su pripravljene sonikacijom s tristearinom kao lipidnom tvari i hidrogeniranim fosfatidilkolinom kao surfaktantom. Oblaganje se može vršiti aktivnim putem tijekom pripreme ili pasivnim putem nakon formiranja lipidnih mikročestica. Pasivni način oblaganja lipidnih mikročestica omogućuje bolje *in vitro* oslobađanje resveratrola. Oblaganjem lipidnih mikročestica kitozanom se postiže nešto slabije uklapanje resveratrola, povećanje veličine mikročestica, promjena negativnog površinskog naboja u pozitivni površinski naboj te značajno povećanje *in vivo* permeacije resveratrola u ljudskoj koži. Udio uklopljenog resveratrola u neobloženim lipidnim mikročesticama promjera 5,7  $\mu\text{m}$  iznosi  $4,1 \pm 0,3$  % i  $3,8 \pm 0,2$  % u obloženim lipidnim mikročesticama promjera 6,1  $\mu\text{m}$ . Oblaganje kitozanom mijenja površinski naboj negativne vrijednosti zeta potencijala ( $-17,8 \pm 4,8$  mV) neobloženih lipidnih mikročestica u visoko pozitivnu vrijednost zeta potencijala ( $+64,2 \pm 4,4$  mV) obloženih lipidnih mikročestica.



U *in vivo* studiji na ljudima je dokazano povećanje permeacije resveratrola primjenom kozmetičke formulacije koja sadrži lipidne mikročestice obložene kitozonom. Na podlacticama zdravih volontera su primijenjeni uzorci kozmetičkih formulacija koje sadrže slobodni resveratrol te resveratrol uklopljen u neobložene i kitozonom obložene lipidne mikročestice. Penetracija resveratrola je određena „*tape stripping*“ tehnikom. Rezultati ove *in vivo* studije pokazuju da neobložene lipidne mikročestice ne uzrokuju značajno povećanje penetracije uklopljenog resveratrola u *stratum corneum* ( $32,8 \pm 8,9$  %) u odnosu na kontrolnu formulaciju koja sadrži resveratrol u slobodnom obliku ( $26,2 \pm 5,6$  %). Primjena kozmetičke formulacije koja sadrži resveratrol uklopljen u lipidne mikročestice obložene kitozonom uzrokuje značajno povećanje *in vivo* penetracije resveratrola ( $49,3 \pm 5,9$  %) [126].

Primjena kitozonom obloženih liposoma i lipidnih mikročestica osigurava povećanje *in vitro* i *in vivo* penetracije i stabilnosti resveratrola uzrokovano interakcijom kitozana kao pozitivno nabijenog polimera i negativno nabijene kože.

#### 4.1.2.2.3. CIKLODEKSTRINI

Šećeri predstavljaju atraktivne i sigurne terapijske sustave zbog sposobnosti stvaranja inkluzijskih kompleksa s lijekovima. Ciklodekstrini (CD) su  $\alpha$ -1,4-vezani ciklički oligosaharidi građeni od šest, sedam ili osam glukopiranoznih jedinica ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) nastalih bakteriološkom razgradnjom škroba. To su prazne kapsule veličine 1 – 2 nm strukture krnjeg stošca s hidrofobnom centralnom šupljinom (C-C i C-O-C veze) što omogućuje uklapanje susjednih molekula unutar njihove unutarnje šupljine. Hidrofilna vanjska površina osigurava dobru topljivost u vodi, a lipofilna centralna šupljina predstavlja prikladnu mikrookolinu za lipofilne molekule [127].

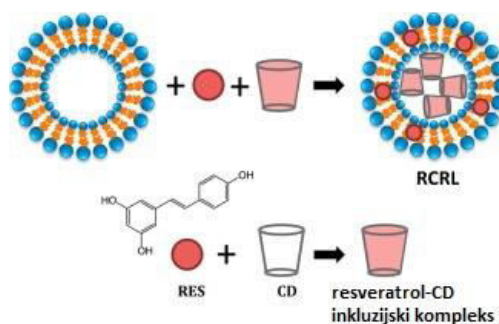
Kompleksiranje s ciklodekstrinima omogućuje brojne prednosti poput povećanja topljivosti u vodi, povećanja bioraspoloživosti lijekova, uklanjanja nepovoljnih svojstava poput iritabilnosti te izbjegavanje uporabe organskih otapala, poboljšanja tehnoloških svojstava primjerice postizanjem produljenog oslobađanja te stabilizacije uklopljene molekule zaštitom od razgradnje utjecajem topline i svjetla, zaštitom od hidrolize ili oksidacije, sprečavanjem inkompatibilnosti i sprečavanjem gubitka isparavanjem. Ciklodekstrini povećavaju kemijsku stabilnost uklopljenih molekula ukoliko su funkcionalne skupine odgovorne za razgradnju uklopljene u centralnu šupljinu. Usporavanjem razgradnih reakcija, ciklodekstrini štite molekulu od oksidacije, hidrolize, racemizacije, izomerizacije, polimerizacije i enzimске razgradnje. Primjena ciklodekstrina je smanjena zbog rizika od potencijalne nefrotoksičnosti i potencijala za promjenu farmakokinetike lijekova kada ne dolazi do brzog otapanja.

Stvaranje inkluzijskih kompleksa je termodinamički povoljni proces zbog zamjene energijom bogatih molekula vode s lipofilnijom molekulom ili dijelom molekule. Pritom ne dolazi do kidanja niti stvaranja kovalentnih veza. Interakcija između lijeka i ciklodekstrina je posredovana vodikovim vezama i Van der Waalsovima silama, elektrostatskim i dipol-dipol interakcijama što rezultira steričkom stabilizacijom. Inkluzijski kompleksi predstavljaju dinamičan sustav u otopini s poluvremenom života od 1  $\mu$ s.

CD ulaze u interakcije s lipidima u koži te tako mijenjaju njenu barijernu funkciju. Lijek se iz inkluzijskog kompleksa može osloboditi kompetitivnim kompleksiranjem s lipidima kože budući da lipidi i kolesterol pokazuju veliki afinitet vezanja za CD, stvaraju stabilne komplekse i doprinose oslobađanju lijeka iz kompleksa. To je brz proces jer slobodan lijek pokazuje veći afinitet za lipofilnu membranu nego za centralnu šupljinu CD. Topikalna primjena hidrofilnih derivata CD je sigurna za primjenu na kožu i sluznice, ne uzrokuje lokalne iritacije i kontaktne dermatitise u kozmetičkim pripravcima u koncentraciji do 0,1 %  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD i  $\gamma$ -CD.

CD slabo prolaze kroz kožu s time da apsorpcija opada u slijedećem nizu:  $\beta$ -CD > HP- $\beta$ -CD > DM- $\beta$ -CD. Transdermalna apsorpcija je zabilježena kod DM- $\beta$ -CD, ali s niskim koncentracijama u sistemskoj cirkulaciji. HP- $\beta$ -CD se nakuplja u rožnatom sloju. U okluzivnim uvjetima, dermalna apsorpcija je značajnija i to za  $\beta$ -CD 12 %, RM- $\beta$ -CD 43 % i HP- $\beta$ -CD 53 % nakon 24 h.

Resveratrol se uklapa u centralnu hidrofobnu šupljinu gdje zamjenjuje molekulu vode. Uklapanjem molekule resveratrola u ciklodekstrine povećava se topljivost i fotostabilnost resveratrola osobito u slučaju hidroksipropil- $\beta$ -CD te se smanjuje kristaliničnost. Koncentracija slobodnog resveratrola u vodi je 0,077 mmol/L, a kompleksiranjem s 8 mM CD, koncentracija lijeka je povećana 12,6 puta u slučaju  $\beta$ -CD i 50,5 puta u slučaju 2-hidroksipropil  $\beta$ -CD [50].



**Slika 63: Uklapanje resveratrola u inkluzijski kompleks s ciklodekstrinima (prilagođeno prema [127])**

Kompleksacijom resveratrola sa sulfobutileter- $\beta$ -CD u omjeru 1:1 značajno se povećava topljivost s 0,03 mg/ml na 1,1 mg/ml pri 25 °C te se povećava antikancerogeni učinak protiv MCF-7 stanica karcinoma dojke. Prazni kompleks nije pokazao učinak na vijabilnost stanica.

Primjena  $\beta$ -CD i 2-hidroksipropil- $\beta$ -CD s uklopljenim resveratrolom povećava citotoksičnost u kanceroznim staničnim linijama HeLa i Hep3B bez štetnog učinka na zdrave stanice HUVEC stanične linije.

Ciklodekstrini djeluju kao rezervoari za kontrolirano oslobađanje koji štite resveratrol od brze oksidacije slobodnim radikalima čime povećavaju njegovu antioksidacijsku aktivnost. Ovaj učinak se postiže stvaranjem inkluzijskog kompleksa između hidroksilne skupine *trans*-resveratrola i HP- $\beta$ -CD. Bioraspoloživost RSV- $\beta$ -CD u štakoru nakon oralne primjene iznosi 38 % [89].

Nanospužve su nedavno razvijene kao nanostrukturirani križno povezani ciklodekstrinski polimeri koji formiraju trodimenzionalnu mrežu s karbonilimidazolom. To su čvrste čestice sa sferičnom morfologijom koje imaju visoku solubilizacijsku snagu te mogu stvarati inkluzijske i neinkluzijske komplekse s lijekom. Koriste se za povećanje topljivosti i stabilnosti slabo topljivih tvari. Čestice s uklopljenim resveratrolom su veličine 400 – 500 nm, niskog polidisperznog indeksa i dovoljno visokog zeta potencijala za dobivanje stabilne koloidne nanosuspenzije. Citotoksične studije na HCPC-I stanicama su pokazale veću toksičnost takvih čestica s uklopljenim resveratrolom u odnosu na konvencionalnu formulaciju. Nanospužve s uklopljenim resveratrolom su pokazale potencijal za bukalnu i topikalnu primjenu.

Kompleks nanospužvi s uklopljenim resveratrolom pokazuje dobro uklapanje, topljivost, stabilnost i permeaciju. Viši solubilizacijski faktor označava bolje uklapanje resveratrola zbog višeg stupnja omjera križnog povezivanja. Topljivost resveratrola raste s povećanjem koncentracije nanospužve u sustavu do omjera 1:5. Iznad ove koncentracije, nema značajnog povećanja topljivosti resveratrola zbog saturacije. Uklapanjem se povećava fotostabilnost, a mehanizam bolje inhibicije stanične proliferacije u kompleksu je još uvijek nepoznat. Poboljšana je akumulacija resveratrola u mukozi zečeva te permeacija zbog povećane topljivosti resveratrola [128].

Primjena ciklodekstrina u liječenju karcinoma je ograničena zbog nedovoljno ciljanog djelovanja i visokih troškova proizvodnje.

**Tablica 5: Sažetak svojstava najčešćih nanočestica resveratrola u topikalnoj primjeni (prilagođeno prema [97])**

NANOČESTICE	KARAKTERISTIKE	PREDNOSTI
<b>Nano/mikroemulzije</b>	150 – 220 nm	↑topljivost ↑fizikalna stabilnost
<b>Liposomi</b>	100 – 120 nm P.I.= 0,1 – 0,2 Z.P.= -30/-39 mV E.E.= 50 – 95 %	↑topljivost ↑fotokemijska stabilnost ↑hidratacija kože produljeno, kontrolirano oslobađanje niski sadržaj tvari (< 3 %), kratki rok trajanja
<b>Niosomi (resveratrol+kurkumin)</b>	214 – 252 nm Z.P.= -40 mV	↑dostava resveratrola u kožu, ↑antioksidacijska aktivnost produljeno oslobađanje, lokalni depo
<b>Čvrste lipidne nanočestice</b>	110 – 280 nm Z.P. ≈ -38 mV P.I.= 0,1 – 0,3 E.E.= 73 – 98 %	↑topljivost i bioraspoloživost ↑fizička stabilnost tijekom 60 dana ↑fotokemijska stabilnost ↑penetracija i koncentracija resveratrola u dermisu ↓stvaranje ROS-a, ↓proliferacija keratinocita ↓citotoksičnost bifazično kontrolirano oslobađanje nedostaci SLN-a poput gubitka i niskog sadržaja uklopljenog resveratrola su prevladani NLC-om
<b>Polimerne nanočestice</b>	90 – 365 nm Z.P.= -5,5/-27,6 mV P.I.= 0,1 E.E. = 42 – 98 %	↑fotokemijska stabilnost ↑bioraspoloživost produljeno oslobađanje
<b>Kitozonom obložene polimerne nanočestice</b>	150 – 550 nm Z.P. ≈ +60 mV P.I. = 0,1 – 0,4 E.E.= 23 – 99 %	↑topljivost, bioraspoloživost i termostabilnost ↑ <i>in vivo</i> permeacija resveratrola za +16,5 % u odnosu na neobložene polimerne nanočestice bifazično kontrolirano oslobađanje
<b>Ciklodekstrini</b>	400 – 500 nm Z.P.= -16/-20 mV P.I. ≈ 0,1 – 0,2 E.E.= 30 – 40 %	↑topljivost i bioraspoloživost kontrolirano oslobađanje cijena

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju proučene literature i objavljenih radova, topikalno primijenjene dermokozmetičke formulacije resveratrola se mogu koristiti u liječenju blažih i težih kožnih oboljenja poput akne, dijabetičkih rana, psorijaze, vitiliga, hiperpigmentacija, opekline te karcinoma kože. Osim toga, njegova primjena kao anti-age sastojka u dermokozmetičkim pripravcima te pripravcima prije i nakon izlaganja kože sunčevom zračenju je opravdana zbog djelovanja na fotostarenje kože.

Budući da resveratrol djeluje na veliki broj meta u brojnim signalnim putevima, osigurava smanjenu rezistenciju stanica karcinoma djelujući na mehanizme efluksa kemoterapeutika. Također, resveratrol posjeduje sinergistički učinak s nekim kemoterapeuticima poput doksorubicina, 5-fluorouracila, temozolomida i dakarbazina te omogućuje jači citotoksični učinak na stanice karcinoma istodobno smanjujući nepoželjne nuspojave poput kardiotoksičnosti. Topikalno primijenjeni resveratrol posjeduje veliki potencijal kao adjuvantni kemoterapeutik u liječenju kožnih karcinoma. Topikalna primjena resveratrola omogućuje izbjegavanje prvog prolaska kroz jetru, kontinuiranu dostavu, smanjenje nuspojava i bolju suradljivost pacijenata.

Obećavajući farmakološki učinci resveratrola su ograničeni slabom topljivošću, niskom bioraspoloživošću i jakim hepatičkim metabolizmom. Nanotehnologija je odličan alat za uklanjanje ograničenja primjene resveratrola koja omogućuje povećanje topljivosti, fotokemijske stabilnosti i bioraspoloživosti resveratrola te bifazično kontrolirano oslobađanje resveratrola. Bifazično oslobađanje resveratrola iz nanočestica osigurava brzo postizanje i održavanje terapijske koncentracije resveratrola na mjestu djelovanja. Nanočestice s uklopljenim resveratrolom se mogu akumulirati u tumorskim stanicama zbog povećane permeabilnosti i učinka zadržavanja gdje inhibiraju efluksne mehanizme kancerogenih stanica. Jedna od najučinkovitijih vrsta nanočestica resveratrola su kitozanom obložene polimerne nanočestice koje osiguravaju penetraciju resveratrola čak i do dermisa zbog njihova pozitivnog zeta potencijala. Ovo svojstvo kitozanskih nanočestica omogućuje duboku penetraciju resveratrola interakcijom s negativno nabijenim kožnim strukturama.

Međutim, najuspješniju topikalnu nanoformulaciju resveratrola predstavljaju obložene lipidne nanokapsule koje sadrže resveratrol i kurkumin, inhibitor metabolizma resveratrola.

## 6. LITERATURA

1. Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li HB. Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010; 11(2): 622 – 646.
2. Texeira A, Eines-Dias J, Castellarin SD, Geros H. Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013; 14(9): 18711 – 18739.
3. Hussein S, Abdrabba S. Physico-chemical characteristics, fatty acid, composition of grape seed oil and phenolic compounds of whole seeds, seeds and leaves of red grape in Libya. *International Journal of Applied Science and Mathematics*, 2015; 2(5): 2394 – 2894.
4. Montenegro L. Nanocarriers for skin delivery of cosmetic antioxidants. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 2014; 2(4): 73 – 92.
5. Soto ML, Falqué E, Domínguez H. Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. *Cosmetics*, 2015; 2(3): 259 – 276.
6. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2005; 81(1): 230 – 242.
7. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, 2004; 24(5): 2783 – 840.
8. Guerrero RF, García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E. Wine, resveratrol and health: a review. *Natural Product Communications*, 2009; 4(5): 635 – 58.
9. Bobrowska-Hagerstrand M, Lillas H, Mrowczynska L i sur. Resveratrol oligomers are potent MRP1 transport inhibitors. *Anticancer Research*, 2006; 26(3): 2081 – 2084.
10. Zillich OV, Weisz US, Eisner P, Kerscher M. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science*, 2015; 37: 455 – 464.

11. Flamini R, Mattivi F, Rosso MD, Arapitsas P, Banaresco L. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013; 14(10): 19651 – 19669.
12. Kwon JY, Lee KW, Kim JE i sur. Delphinidin suppresses ultraviolet B-induced cyclooxygenases-2 expression through inhibition of MAPKK4 and PI-3 kinase. *Carcinogenesis*, 2009; 30(11): 1932 – 40.
13. Santosh K. Grape seed proanthocyanidines and skin cancer prevention: Inhibition of oxidative stress and protection of immune system. *Molecular Nutrition Food Research*, 2008; 52(1): 71–76.
14. Mittal A, Piyathilakey C, Haraz Y, Katiyar SK. Exceptionally high protection of photocarcinogenesis by topical application of (-)-epigallocatechin-3-gallate in hydrophilic cream in SKH-1 hairless mouse model: relationship to inhibition of UVB-induced global DNA hypomethylation. *Neoplasia*, 2003; 5(6): 555 – 565.
15. Kim JE, Shin MH, Chung JH. Epigallocatechin-3-gallate prevents heat shock-induced MMP-1 expression by inhibiting AP-1 activity in human dermal fibroblasts. *Archives of Dermatological Research*, 2013; 305(7): 595 – 602.
16. Georgiev V, Ananga A, Tsoleva V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*, 2014; 21(1): 391 – 415.
17. Soral I, Vrchotová N, Tříška J i sur. Various extraction methods for obtaining stilbenes from grape cane of *Vitis vinifera* L. *Molecules*, 2015; 20(4): 6093 –112.
18. Mukherjee S, Dudley IJ, Das KD. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose Response*, 2010; 8(4): 478–500.
19. Praharsh K, Shah JA, Patel D i sur. Resveratrol and its biological actions. *International Journal of Green Pharmacy*, 2010; 4(1): 15 – 21.
20. Neves AR, Lucio M, Lima JL, Reis S. Resveratrol in medicinal chemistry: a critical review of its pharmacokinetics, drug-delivery and membrane interactions. *Current Medicinal Chemistry*, 2012; 19(11): 1663 – 81.
21. Athar M, Back JH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2009; 486(2): 95 – 102.



22. Valida Y, Ramanauskiewe K, Briedis V. Design and formulation of optimized microemulsions for dermal delivery of resveratrol. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
23. Bonda C, Zhang J, Pavlovic A. The photostability and photostabilization of *trans*-resveratrol. *Cosmetics & Toiletries*, 2011; 126(9): 652
24. Baxter RA. Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2008; 7(1): 2-7.
25. Bastianetto S, Dumont Y, Duranton A, Vercauteren F, Breton L, Quirion R. Protective action of resveratrol in human skin: possible involvement of specific receptor binding sites. *PLoS One*, 2010; 5(9): 12935.
26. Kalita B. Resveratrol-phospholipid complexes (phytosomes) with improved physicochemical properties favorable for drug delivery via skin. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 2015; 4(5): 1497-1517.
27. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews: Drug Discovery*, 2006; 5(6): 493 – 506.
28. Neves AR, Martins S, Segundo MA, Reis S. Nanoscale delivery of resveratrol towards enhancement of supplements and nutraceuticals. *Nutrients*, 2016; 8: 131.
29. Wesołowska O, Kuzdzał M, Strancar J, Michalak K. Interaction of the chemopreventive agent resveratrol and its metabolite, piceatannol with model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009; 1788(9): 1851-60.
30. Kovacic P, Somanathan R. Multifaceted approach to resveratrol bioactivity: focus on antioxidant action, cell signaling and safety. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2010; 3(2): 86 – 100.
31. Ruivo, Joana i sur. The main potentialities of resveratrol for drug delivery systems. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015; 51(3): 499 – 513.
32. Bonnefont-Rousselot D. Resveratrol and cardiovascular diseases. *Nutrients*, 2016; 8(5): 250.
33. Mohar DS, Malik S. The sirtuin system: the holy grail of resveratrol. *Journal of Clinical and Experimental Cardiology*, 2012; 3(11): 216.

34. Smoliga JM, Baur JA, Hausenblas HA. Resveratrol and health—a comprehensive review of human clinical trials. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2011; 55(8): 1129 – 1141.
35. King RE, Bomser JA, Min DB. Bioactivity of resveratrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2006; 5(3): 65 – 70.
36. Zhu X, Liu Q, Wang M i sur. Activation of SIRT1 by resveratrol inhibits TNF- $\alpha$  induced inflammation in fibroblasts. *PLoS One*, 2011; 6(11).
37. Taylor EJ, Yu Y, Champer J, Kim J. Resveratrol demonstrates antimicrobial effects against *Propionibacterium acnes* in vitro. *Dermatology and therapy*, 2014; 4(2): 249 – 57.
38. Timmers S, Auwerx J, Schrauwen P. The journey of resveratrol from yeast to human. *Aging*, 2012; 4(3): 146 – 158.
39. Bashmakov YK, Assaad-Khalil SH, Seif MA i sur. Resveratrol promotes foot ulcer size reduction in type 2 diabetes patients. *ISRN Endocrinology*, 2014; 816307.
40. Hemmati AA, Houshmand G, Moosavi ZB, Bahadoram M, Maram NS. The topical effect of grape seed extract 2% cream on surgery wound healing. *Global Journal of Health Science*, 2015; 7(3): 52–58.
41. Athar M, Back JH, Tang X i sur. Resveratrol: a review of pre-clinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007; 224(3): 274–283.
42. Nichols JA, Katiyar SK. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research*, 2010; 302(2): 71 - 83.
43. Carter LG, D'Orazio JA, Pearson KJ. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocrine-related Cancer*, 2014; 21(3): 209 – 25.
44. Lin Y, Yin T, Feng Y i sur. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 2015; 5(5): 708 – 729.
45. Soto ML, Falqué E, Domínguez H. Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. *Cosmetics*, 2015; 2(3): 259 – 76.

46. Działo M, Mierziak J, Korzun U, Preisner M, Szopa J, Kulma A. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016; 17(2): 160.
47. Pando D, Caddeo C, Manconi M, Fadda AM, Pazos C. Nanodesign of olein vesicles for the topical delivery of the antioxidant resveratrol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2013; 65(8): 1158 – 67.
48. Zhang G, Flach CR, Mendelsohn R. Tracking the dephosphorylation of resveratrol triphosphate in skin by confocal Raman microscopy. *Journal of Controlled Release*, 2007; 123(2): 141 – 7.
49. Ascenso A, Raposo S, Batista C i sur. Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: transfersomes, ethosomes, and transethosomes. *International Journal of Nanomedicine*, 2015; 10: 5837.
50. Summerlin N, Soo E, Thakur S, Qu Z, Jambhrunkar S, Popat A. Resveratrol nanoformulations: challenges and opportunities. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015; 479(2): 282 – 90.
51. Mendes JB, Riekens MK, Oliveira VM i sur. PHBV/PCL microparticles for controlled release of resveratrol: physicochemical characterization, antioxidant potential and effect on hemolysis of human erythrocytes. *The Scientific World Journal*, 2012.
52. Kim JH, Park EY, Ha KH i sur. Resveratrol-loaded nanoparticles induce antioxidant activity against oxidative stress. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2016; 29(2): 288.
53. Sharif A, Akhtar N, Khan MS i sur. Formulation and evaluation on human skin of a water-in-oil emulsion containing Muscat hamburg black grape seed extract. *International Journal of Cosmetic Science*, 2015; 37(2): 253 – 8.
54. Potapovich AI, Kostyuk VA, Kostyuk TV, Luca C, Korkina LG. Effects of pre-and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV. *Inflammation Research*, 2013; 62(8): 773 – 80.
55. Suhail A, Syed M, Som S, Santosh K. Dietary grape seed proanthocyanidins suppresses UVB-induced oxidative stress and activation of MAPK proteins and nuclear factor- $\kappa$ B through restoration of MAP kinase phosphatases in SKH-1 hairless mice. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2007; 6(3): 995 – 1005.

56. Ndiaye M, Philippe C, Mukhtar H, Ahmad N. Grape seed proanthocyanidines and skin cancer prevention: inhibition of oxidative stress and protection of immune system disorders: promise, prospects, and challenges. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011; 508(2): 164 – 70.
57. Lin HY, Lansing L, Merillon JM i sur. Integrin  $\alpha V\beta 3$  contains a receptor site for resveratrol. *The FASEB Journal*, 2006; 20(10): 1742 – 4.
58. Lin HY, Sun M, Tang HY i sur. Resveratrol causes COX-2-and p53-dependent apoptosis in head and neck squamous cell cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2008; 104(6): 2131 – 42.
59. Shukla Y, Singh R. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2011; 1215(1): 1 – 8.
60. Boyer JZ, Jandova J, Janda J, Vleugels FR, Elliott DA, Sligh JE. Resveratrol-sensitized UVA induced apoptosis in human keratinocytes through mitochondrial oxidative stress and pore opening. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2012; 113:42 – 50.
61. Zeng G, Zhong F, Li J, Luo S, Zhang P. Resveratrol-mediated reduction of collagen by inhibiting proliferation and producing apoptosis in human hypertrophic scar fibroblasts. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2013; 77(12): 2389 – 96.
62. Baek SJ, Whitlock NC. Molecular targets of resveratrol in carcinogenesis. *In Evidence-based Anticancer Materia Medica*, 2011; 319 – 347.
63. Wu Z, Uchi H, Morino-Koga S, Shi W, Furue M. Resveratrol inhibition of human keratinocyte proliferation via SIRT1/ARNT/ERK dependent downregulation of aquaporin 3. *Journal of Dermatological Science*, 2014; 75(1): 16 – 23.
64. Kim KH, Back JH, Zhu Y i sur. Resveratrol targets transforming growth factor- $\beta 2$  signaling to block UV-induced tumor progression. *Journal of Investigative Dermatology*, 2011; 131(1): 195 – 202.
65. Wolfe B, Gandhi R, Rajah T. Effectiveness of resveratrol on metastasis: a review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2015; 5(5): 12 – 18.
66. Soeur J, Eilstein J, Jones C i sur. Skin resistance to oxidative stress induced by resveratrol: from Nrf2 activation to GSH biosynthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015; 78:213 – 223.
67. Ido Y, Durantou A, Lan F, Weikel KA, Breton L, Ruderman NB. Resveratrol prevents oxidative stress-induced senescence and proliferative dysfunction by activating the AMPK-FOXO3 cascade in cultured primary human keratinocytes. *PloS One*, 2015; 10.2: e0115341.

68. Costa A, Lindmark L, Arruda LHF i sur. Clinical, biometric and ultrasound assessment of the effects of daily use of a nutraceutical composed of lycopene, acerola extract, grape seed extract and Biomarine Complex in photoaged human skin. *Anais Brasileiros de Dermatologia*,. 2012; 87(1): 52 – 61.
69. Ndiaye M, Philippe C, Mukhtar H, Ahmad N. The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects and challenges. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011; 508(2): 164–170.
70. Manjeshwor SB, Santosh KK. Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2006; 5(2): 243 – 253.
71. Rundhang J, Fischer SM. Cyclo-oxygenase-2 plays a critical role in UV-induced skin carcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology*, 2008; 84: 322 – 329.
72. Yu-Jen C, Ying-Yin C, Yi-Feng L, Hsuan-Yun H, Hui-Fen L. Resveratrol inhibits alpha-melanocyte-stimulating hormone signaling, viability and invasiveness in melanoma cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
73. Paul R, Soesiawati R, Dhruv S i sur. Resveratrol inhibits uveal melanoma tumor growth via early mitochondrial dysfunction. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2008;49(4): 1299 – 1306.
74. Aziz MH, Reagan-Shaw S, Longley BY, Ahmad N. Chemoprevention of skin cancer by grape constituent resveratrol: relevance to human disease. *FASEB*, 2005; 19: 1193 – 1195.
75. Freitas JV, Lopes NP, Gaspar LR. Photostability evaluation of five UV-filters, trans-resveratrol and beta-carotene in sunscreens. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015; 78: 79 – 89.
76. Freitas JV, Praça FS, Bentley MV, Gaspar LR. Trans-resveratrol and beta-carotene from sunscreens penetrate viable skin layers and reduce cutaneous penetration of UV-filters. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015; 484(1 – 2): 131 – 7.
77. Caddeo C, Teskac K, Sinico C, Kristl J. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008; 363(1 – 2): 183 – 91.
78. Rigon RB, Fachinetti N, Severino P, Santana MHA, Chorilli M. Skin delivery and *in vitro* biological evaluation of trans-resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for skin disorder therapies. *Molecules*, 2016; 21(1): 116.

79. Lee TH, Seo JO, Baek SH, Kim SY. Inhibitory effects of resveratrol on melanin synthesis in ultraviolet B-induced pigmentation in Guinea pig skin. *Biomolecules & Therapeutics*, 2014; 22(1): 35.
80. Chang TS. Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. *Materials*, 2012; 5(9): 1661 – 1685.
81. Likhitwitayawuid K. Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity. *Current Science-Bangalore*, 2008; 94(1): 44.
82. Newton RA, Cook AL, Roberts DW, Leopnard JH, Sturm RA. Post-transcriptional regulation of melanin biosynthetic enzymes by cAMP and resveratrol in human melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007; 127(9): 2216 – 2227.
83. Ryu JH, Seok JK, An SM, Baek JH, Koh JS, Boo YC. A study of the human skin-whitening effects of resveratryl triacetate. *Archives of Dermatological Research*, 2015; 307(3): 239 – 247.
84. Soojin P, Jin KS, Jun YK i sur. Anti-melanogenic effects of resveratryl triglycolate, a novel hybrid compound derived by esterification of resveratrol with glycolic acid. *Archives of Dermatological Research*, 2016; 308(5): 325 – 334.
85. Farris P, Krutman J, Li JH, McDaniel D, Krolj J. Resveratrol: a unique antioxidant offering a multi-mechanistic approach for treating aging skin. *Journal of Drugs in Dermatology*, 2013; 12(12): 1389 – 1394.
86. Serravallo M, Jagdeo J, Glick SA, Segel DM, Brody NI. Sirtuins in dermatology: applications for future research and therapeutics. *Archives of Dermatological Research*, 2013; 305(4): 269 – 282.
87. Wei H, Zhang Z, Saha A i sur. Disruption of adaptive energy metabolism and elevated ribosomal p-S6K1 levels contribute to INCL pathogenesis: parcial rescue by resveratrol. *Human Molecular Genetics*, 2011; 20(6): 1111 – 1121.
88. Sergides C, Chirila M, Silvestro L, Pitta P, Pittas A. Bioavailability and safety study of resveratrol 500 mg tablets in healthy male and female volunteers. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2016; 11(1): 164 – 170.
89. Santos AC, Veiga F, Ribeiro AJ. New delivery systems to improve the bioavailability of resveratrol. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2011; 8(8): 973 – 990.
90. Park SJ, Ahmad F, Philp A i sur. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*, 2012; 148(3): 421 – 433.

91. Murakami I, Chaleckis R, Pluskal T i sur. Metabolism of skin-absorbed resveratrol into its glucuronized form in mouse skin. *PloS One*, 2014; 12(9): e115359.
92. Basheer L, Zohar K. Interactions between CYP3A4 and dietary polyphenols. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.
93. Fiume MM, Bergfeld WF, Belsito DW i sur. Safety assessment of vitis vinifera (Grape)-derived ingredients as used in cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 2014; 33(3): 48S – 83S.
94. Chow HS, Gerand LL, Hsu CH i sur. Resveratrol modulates drug and carcinogen-metabolizing enzymes in a health volunteer study. *Cancer Prevention Research*, 2010 ; 3(9): 1168 – 1175.
95. Grady G. The effect of resveratrol on ultraviolet light-induced skin cell death. *Doctoral Dissertation. Mariette College*, 2013.
96. Zillich OV, Schweigert -Weisz U, Hasenkopf K, Eisner P, Kersch M. Release and in vitro skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. *International Journal of Cosmetic Science*, 2013; 35(5): 491 – 501.
97. Siddiqui IA, Sanna V, Ahmad N, Sechi M, Mukhtar M. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2015; 1348(1): 20 – 31.
98. Costa A, Pereira ESP, Assumpcao EC i sur. Assessment of clinical effects and safety of an oral supplement based on marine protein, vitamin C, grape seed extract, zinc and tomato extract in the improvement of visible signs of skin aging in men. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2015; 8: 319.
99. Buonocore D, Lazzeretti A, Tocabens P i sur. Resveratrol-procyanidin blend: nutraceutical and anti-aging efficacy evaluated in a placebo-controlled, double-blind study. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2012; 5 :159.
100. Tomé-Carneiro J, Larrosa M, González-Sarrías A, Tomas-Barberan F, Teresa Garcia-Conesa M, Carlos Espin J. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from *in vitro* studies to human evidence. *Current pharmaceutical design*, 2013; 19(34): 6064 – 6093.
101. Polonini HC, Almeida Bastos C, Oliviera MA i sur. *In vitro* drug release and *ex vivo* percutaneous absorption of resveratrol cream using HPLC with zirconized silica stationary phase. *Journal of Chromatography*, 2014; 947: 23 – 31.
102. Bonechi C, Martini S, Ciani L, Lamponi S, Rebmann H, Rossi C, Ristori S. Using liposomes as carriers for polyphenolic compounds: the case of trans-resveratrol. *PloS One*, 2012; 7(8): e41438.

103. Caddeo C, Manconi M, Cardia MC, Díez-Sales O, Fadda AM, Sinico C. Investigating the interactions of resveratrol with phospholipid vesicle bilayer and the skin: NMR studies and confocal imaging. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015; 484(1): 138 – 145.
104. Scognamiglio I, Stefano D, Campani V i sur. Nanocarriers for topical administration of resveratrol: a comparative study. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013; 440(2): 179 – 187.
105. Pando D, Matos M, Gutiérrez G, Pazos C. Formulation of resveratrol entrapped niosomes for topical use. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015; 128: 398 – 404.
106. Surajit D, Ka-Yun N, Paul C. Formulation and optimization of zinc-pectinate beads for the controlled delivery of resveratrol. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 2010; 11(2): 729 – 742.
107. Surajit D, Ka-Yun N, Paul C. Resveratrol-loaded calcium-pectinate beads: effects of formulation parameters on drug release and bead characteristics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010; 99(2): 840 – 860.
108. Yutani R, Kikuchi T, Teraoka R, Kitagawa S. Efficient delivery and distribution in skin of chlorogenic acid and resveratrol induced by microemulsion using sucrose oleate. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2014; 62(3): 274 – 280.
109. Yutani R, Komori Y, Takeuchi A, Teraoka R, Kitagawa S. Prominent efficiency in skin delivery of resveratrol by novel sucrose oleate microemulsion. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2016; 68(1): 46 – 55.
110. Sasivimolphan P, Lipipun V, Ritthidej G i sur. Microemulsion-based oxyresveratrol for topical treatment of herpes simplex virus (HSV) infection: physicochemical properties and efficacy in cutaneous HSV-1 infection in mice. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 2012; 13(4): 1266 – 1275.
111. Yutani R, Morita SY, Teraoka R, Kitagawa S. Distribution of polyphenols and a surfactant component in skin during Aerosol OT microemulsion-enhanced intradermal delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2012; 60(8): 989 – 994.
112. Mohan A, Narayanan S, Sethuramam S, Krishnan KM. Novel resveratrol and 5-fluorouracil coencapsulated in PEGylated nanoliposomes improve chemotherapeutic efficacy of combination against head and neck squamous cell carcinoma. *BioMed Research International*, 2014.



113. Meng J, Guo F, Xu H, Liang N, Wang C, Yang XD. Combination therapy using co-encapsulated resveratrol and paclitaxel in liposomes for drug resistance reversal in breast cancer cells *in vivo*. *Scientific Reports*, 2016.
114. Mazzalupo R, Tavano L. Niosomal drug delivery for transdermal targeting: recent advances. *Research and Reports in Transdermal Drug Delivery*, 2015; 4: 23 – 33.
115. Neves AR, Lucio M, Martins S, Lima JL, Reis S. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. *International Journal of Nanomedicine*, 2013; 8(1): 177 – 187.
116. Friedrich RB, Kann B, Coradini K, Offerhaus HL, Beck RC, Windbergs M. Skin penetration behavior of lipid-core nanocapsules for simultaneous delivery of resveratrol and curcumin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015; 78: 204 – 213.
117. Gokce EH, Korkmaz E, Delleria E, Sandri G, Bonferoni MC, Ozer O. Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for dermal applications. *International Journal of Nanomedicine*, 2012; 7: 1841 – 1850.
118. Yutani R, Teraoka R, Kitagawa S. Microemulsion using polyoxyethylene sorbitan trioleate and its usage for skin delivery of resveratrol to protect skin against UV-induced damage. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2015; 63(9): 741 – 745.
119. Coradini K, Lima FO, Oliveira CM, Chaves PS, Athayde ML, Carvalho LM, Beck RCR. Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their *in vitro* antioxidant effects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2014; 88(1): 178 – 185.
120. Kobierski S, Ofori-Kwakye K, Müller RH, Keck CM. Resveratrol nanosuspensions for dermal application – production, characterization and physical stability. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009; 64(11): 741 – 747.
121. Zu Y, Zhang Y, Wang W, Zhao X, Han X, Wang K, Ge Y. Preparation and *in vitro/in vivo* evaluation of resveratrol-loaded carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Drug delivery*, 2016; 23(3): 971 – 981.
122. Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wound and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2011; 9(7): 857 – 879.

123. Peng H, Xiong H, Li J i sur. Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. *Food Chemistry*, 2010; 121(1): 23 – 28.
124. Sanna V, Roggio AM, Siliani S i sur. Development of novel cationic chitosan-and anionic alginate-coated poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled release and light protection of resveratrol. *International Journal of Nanomedicine*, 2012; 7: 5501 – 5516.
125. Sanna V, Roggio AM, Pala N i sur. Effect of chitosan concentration on PLGA microcapsules for controlled release and stability of resveratrol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015; 72: 531 – 536.
126. Scalia S, Trotta V, Iannuccelli V, Bianchi A. Enhancement of *in vivo* human skin penetration of resveratrol by chitosan-coated lipid microparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015; 135: 42 – 49.
127. Kumpugdee-Vollrath M, Ibold Y, Sriamornsak P. Solid state characterization of trans resveratrol complexes with different cyclodextrins. *Journal of Asian Association of Schools of Pharmacy*, 2012; 1(2): 125 – 136.
128. Ansari KA, Vavia PR, Trotta F, Cavalli R. Cyclodextrin-based nanosponges for delivery of resveratrol: *in vitro* characterisation, stability, cytotoxicity and permeation study. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 2011; 12(1): 279 – 286.
129. Dermaviduals. dostupno na <http://www.dermaviduals.de>, pristupljeno 23.07.2016.

## **KRATICE**

**AD** Alzheimerova bolest, engl. *Alzheimer's Disease*

**AGE** napredni krajnji glikozilacijski produkti, engl. *Advanced Glycosylation End product*

**Akt** Serin/Treonin kinaza

**AP-1** engl. *Activator Protein-1*

**ARE** engl. *Antioxidant Response Element*

**ARNT** nuklearni translokator aril hidrokarbonskog receptora, engl. *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*

**BCRP** protein rezistencije karcinoma dojke, engl. *Breast Cancer Resistance Protein*

**CD** ciklodekstrini

**cGMP** ciklički gvanozin monofosfat, engl. *Cyclic Guanosine Monophosphate*

**CHS** kalkon sintaza, engl. *Chalcone Synthase*

**COX-2** ciklooksigenaza-2, engl. *Cyclooxygenase-2*

**CREB** engl. *cAMP Response Element Binding Protein*

**EGFR** epidermalni receptor faktora rasta, engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*

**EGR-1** engl. *Early Growth Response-1 Gene Product*

**ELAM-1** adhezijska molekula endotelnih leukocita, engl. *Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule*

**ERK** kinaza regulirana izvanstaničnim signalom, engl. *Extracellular Signal-Regulated Kinase*

**FoXO** engl. *Forkhead Transcription Factors*

**GLUT-4** prijenosnik glukoze tip 4, engl. *GLUcose Transporter type 4*

**GSE** ekstrakt grožđanh sjemenki, engl. *Grapefruit Seed Extract*

**GSK-3 $\beta$**  kinaza glikogen sintaze 3 $\beta$ , engl. *Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$*

**HIF-1 $\alpha$**  inducibilni faktor hipoksije 1- $\alpha$ , engl. *Hypoxia-Inducible Factor 1- $\alpha$*

**HO-1** hem oksigenaza 1, engl. *Heme Oxygenase-1*

**IAP** inhibitor proteina apoptoze, engl. *Inhibitor Apoptosis Proteins*

**ICAM-1** unutarstanična adhezijska molekula, engl. *Intracellular Adhesion Molecule*

**IL-1 $\beta$**  interleukin 1 $\beta$

**IL-6** interleukin 6

**iNOS** inducibilna sintaza dušikova oksida, engl. *Inducible Nitric Oxide Synthase*

**JNK** engl. *c-Jun N-terminal protein Kinase*

**Keap -1** engl. *Kelch like Erythroid cell-derived Protein 1*

**LCN** nanokapsula s lipidnom jezgrom, engl. *Lipid-Core Nanocapsule*

**MAPK** protein kinaza aktivirana mitogenom, engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*

**MAPKK** kinaza protein kinaze aktivirane mitogenom, engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*

**MITF** transkripcijski faktor udružen s mikroftalmijom, engl. *Micropthalmia-associated Transcription Factor*

**MMP** matriksna metaloproteinaza, engl. *Matrix Metalloproteinase*

**mPEG-PCL** engl. *metoxy Poly (EthyleneGlycol)-Poly(CaproLactone)*

**MRP3** engl. *Multidrug Resistance-associated Protein 3*

**mTOR** meta djelovanja rapamicina u sisavaca, engl. *mammalian Target Of Rapamycin*

**NAG-1** gen aktiviran nesteroidnim protuupalnim lijekom, engl. *Nonsteroidal Anti-inflammatory drug-activated Gene-1*

**NF- $\kappa$ B** engl. *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

**NHEK** normalni ljudski epidermalni keratinociti, engl. *Normal Human Epidermal Keratinocytes*

**NQO1** kinon reduktaza, engl. *NAD(P)H Quinone dehydrogenase 1*

**Nrf-2** engl. *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*

**OATP** prijenosnik organskih aniona, engl. *Organic Anion-Transporting Polypeptides*

**ODC** ornitin dekarboksilaza

**p38** p38 mitogenom aktivirana protein kinaza engl. *P38 Mitogen-Activated Protein Kinase*

**PGC-1 $\alpha$**  engl. *Peroxisome proliferator activator Gamma Co-activator 1  $\alpha$*

**PHBV** engl. *Poly(3-HydroxyButyrate-co-3-hydroxyValerate)*

**PI3K** fosfatidilinozid-3-kinaza, engl. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase*

**PKC** protein kinaza C

**PUMA** modulator apoptoze reguliran p53, engl. *P53 Upregulated Modulator of Apoptosis*

**ROS** reaktivni kisikovi spojevi, engl. *Reactive Oxygen Species*

**RR** ribonukleotid reduktaza

**SIR** engl. *Silent Information Regulator*

**SKH** engl. *Skin Hairless Mouse*

**SLN** čvrste lipidne nanočestice, engl. *Solid Lipid Nanoparticles*

**NLC** nanostrukturirani lipidni nosači, engl. *Nanostructured Lipid Carriers*

**SMAC/Diablo** sekundarni mitohondrijski aktivator kaspaze/direktni inhibitor proteina apoptoze, engl. *Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with LOw pI*

**STS** stilben sintaza, engl. *STilbene Synthase*

**TGF- $\alpha$**  transformirajući faktor rasta  $\alpha$ , engl. *Transforming Growth Factor  $\alpha$*

**TGF- $\beta$**  transformirajući faktor rasta  $\beta$ , engl. *Transforming Growth Factor  $\beta$*

**TNF- $\alpha$**  faktor nekroze tumora  $\alpha$ , engl. *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*

**TRAIL** ligand koji inducira apoptozu preko TNF-a, engl. *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*

**UVB** ultraljubičasto zračenje B

**VCAM-1** adhezijska molekula vaskularnih stanica, engl. *Vascular Cell Adhesion Molecule*

**VDAC** anionski kanali ovisni o naponu, engl. *Voltage-Dependent Anion Channel*

**VEGF** faktor rasta vaskularnog endotela, engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*

**$\alpha$ -MSH** stimulirajući hormon melanocita, engl.  *$\alpha$ -Melanocyte-Stimulating Hormone*