

Rezveratrol analógok antiinflammatorikus és antiproliferációs hatásának vizsgálata

Ph.D. értekezés

Antus Csenge

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Molekuláris és Celluláris Biokémia Program

Doktori Iskola és Programvezető: Prof. Dr. Sümegei Balázs

Témavezető: Dr. Veres Balázs



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

2015

Tartalomjegyzék

Rövidítések listája	4
1. Bevezetés	6
1.1. A gyulladási folyamatok áttekintése	6
1.2. A makrofágok szerepe a gyulladás folyamatában	9
1.3. A lipopoliszacharid	10
1.4. A makrofágok LPS általi stimulációjának mechanizmusai	12
1.4.1. Az LPS biológiai hatásait közvetítő extracelluláris elemek	12
1.4.2. A TLR4 jelátvitel intracelluláris eseményei	13
1.5. Miért szükséges a gyulladás csillapítása?	18
1.6. Polifenolok, mint gyulladáscsökkentő hatóanyagok	20
1.7. A rezveratrol	23
1.8. Rezveratrol származékok	29
2. A kutatás célkitűzései	32
3. Anyagok és módszerek	33
3.1. Anyagok	33
3.2. Sejtkultúra	34
3.3. Peroxid gyökfogó kapacitás vizsgálata sejtmentes rendszerben	34
3.4. LPS-sel stimulált RAW makrofágok ROS termelésének mérése	34
3.5. MTT assay	34
3.6. Szulforodamin B assay	35
3.7. NFκB aktiváció mérése RAW Blue sejteken	35
3.8. Citokin termelés meghatározása ELISA-val	35
3.9. Western blot	36
3.10. Mitokondriális membránpotenciál meghatározása flow citométerrel	37
3.11. Apoptózis/nekrózis arány és sejtciklus meghatározás flow citométerrel	37
3.12. Nítrit produkció meghatározása	37
3.13. Kolónia formáció vizsgálata	38
4. Eredmények	39
4.1. Paramágneses rezveratrol analógok antiinflammatorikus hatása	39
4.2. A rezveratrol és a TDPA hatása endotoxinnal aktivált makrofágokra	42
4.3. A rezveratrol és a TDPA citotoxikus és szaporodásgátló hatása	49
5. Az eredmények megvitatása	57

5.1. A paramágneses rezveratol analógok antiinflammatorikus hatásának tanulmányozása	57
5.2. A TDPA és a rezveratrol biológiai hatásainak összehasonlítása.....	59
5.2.1. A TDPA és a rezveratrol gyulladásgátló hatásának vizsgálata	59
5.2.2. A TDPA és a rezveratrol citotoxikus és szaporodásgátló hatásának vizsgálata	63
6. Összefoglalás	67
7. Hivatkozások listája	68
8. Publikációk listája	80
9. Köszönetnyilvánítás	83

Rövidítések listája

AP-1:	activator protein 1
CD14:	cluster of differentiation 14
COX:	cyclooxygenase
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO:	dimethyl sulfoxide
ECSIT:	evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK:	extracellular signal regulated kinase
GAPDH:	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HRPO:	horseradish peroxidase
IFN:	interferon
IKK:	I κ B kinase
I κ B:	inhibitor of kappa B
IL:	interleukin
iNOS:	inducible nitric oxide synthase
IRAK:	interleukin-1 receptor-associated kinase
IRF:	interferon regulatory factor
JNK:	c-Jun N-terminal kinase
LBP:	LPS binding protein
LPS:	lipopolysaccharide
MAPK:	mitogen-activated protein kinase
MD2:	myeloid differentiation factor-2
MEK:	MAPK/ERK kinase
MEM	minimum essential medium
MKK:	MAPK kinase
MKP:	MAPK phosphatase
MTT:	3(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MyD88:	myeloid differentiation primary response protein 88
NEMO:	NF-kappaB essential modulator
NF κ B:	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLR:	NOD-like receptor

NLRC:	NLR family, CARD (caspase activating and recruiting <i>domain</i>)-containing inflammasome
NOD:	nucleotide-binding and oligomerization domain
NOX:	NADPH oxidase
PAMP:	pathogen associated molecular pattern
PBS:	phosphate buffered saline
PG:	prostaglandin
PRR:	pattern recognition receptor
Rac:	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RIP:	receptor interacting protein
ROS:	reactive oxygen species
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS:	sodium dodecyl sulfate
SOD:	superoxide dismutase
SRB:	sulforhodamine B
TAB:	TAK binding protein
TAK:	TGF-beta-activated kinase 1
TBK:	TANK-binding kinase
TDPA:	3,4',5-trihydroxy-diphenylacetylene
TIR:	Toll/interleukin-1 receptor
TIRAP:	TIR domain-containing adapter protein
TLR:	Toll like receptor
TNF α :	tumor necrosis factor alpha
Tpl2:	tumor progression locus 2
TRAF6:	tumor necrosis factor-receptor associated factor 6
TRAM:	TRIF-related adaptor molecule
TRIF:	TIR-related adaptor protein inducing interferon
Ubc:	ubiquitin conjugating enzyme
Uev1A:	ubiquitin conjugating enzyme variant

1. Bevezetés

1.1. A gyulladáshoz vezető folyamatok áttekintése

A gyulladás a magasabbrendű szervezetek fertőzésre, sérülésre, vagy károsodott szöveti működésre adott válasza, melynek célja a fertőző ágens elpusztítása, a károsodás lokalizálása, az eredeti funkciók helyreállítása. Kialakításában elsősorban a veleszületett immunrendszer folyamatai vesznek részt, amelyek azonban később aktiválhatják az adaptív védekező reakciókat is. Általában gyorsan alakul ki, kis helyre koncentrálódik, és a kórokozó eliminálása után rövid idővel, maradandó következmények nélkül meg is szűnik. Bizonyos esetekben (súlyos fertőzés vagy trauma, hibás regulációs mechanizmusok) viszont káros, olykor halálos következményekkel járhat.

A gyulladás fogalmának értelmezése sok változáson ment keresztül az idők során. Legelső említéseit már ókori orvosi szövegekben is megtalálhatjuk. Az 1. században Cornelius Celsus definiálta a gyulladással járó négy alapvető tünetet: rubor et tumor cum calore et dolore, azaz: meleggel és fájdalommal járó pír és duzzanat. A jellegzetes tünetegyüttes kialakulásáért felelős fiziológiai folyamatokat Augustus Waller és Julius Cohnheim kezdték feltárni a 19. században; ők írták le a gyulladt szövetben megfigyelhető vazodilatációt, plazmakiáramlást, és a fehérvérsejtek kivándorlását az erekből a sejtek közötti térbe. A négy klasszikus tünetet Rudolph Virchow egészítette ki egy ötödikkel, a *functio laesa*-val, vagyis a károsodott működéssel. Valójában ez az egyetlen olyan tünet, amely a gyulladás mai értelmezése szerint minden esetben jelentkezik, a többi négy elsősorban a fertőzést vagy sérülést követő akut gyulladásra jellemző. Mecsnyikov felfedezése a fagocitózisról, valamint Koch és Pasteur áttörő eredményei a mikrobiális fertőzések terén mind hozzájárultak az immunológiai folyamatok mai megértéséhez¹.

Az elmúlt évtized tudományos kutatásainak köszönhetően a gyulladás szerepéről alkotott elképzelésünk nagymértékben kibővült. Egyre több bizonyíték lát napvilágot, amely szerint az inflammatorikus folyamatok részt vesznek a fejlett világ egyre nagyobb figyelmet kapó betegségeinek patogenezisében, mint például a rák, a metabolikus szindróma, a 2-es típusú diabétesz, az atheroszklerózis és a neurodegeneratív elváltozások. Ez tovább fokozza az igényt a gyulladáshoz vezető mechanizmusok pontos megértése és a gyulladást csillapítani képes terápia kifejlesztése iránt.

A gyulladás folyamatában nagyon sok plazma enzim, sejtípus, és szerv vesz részt, melyek egymást gyakran kölcsönösen befolyásolva egy bonyolult hálózatot hoznak létre, amelyben pro- és antiinflammatorikus folyamatok egyaránt találhatóak. A hálózat kutatás legújabb eredményei sikerrel hasznosíthatók az immunológia különböző területein, így az inflammatorikus folyamatok tanulmányozásában is². Egyértelmű, hogy a gyulladás folyamata rendkívül összetett, és nagyban függ a kiváltó stimulustól, ezért nehezen adható róla egy általános, és az eseményeket lineáris sorrendben leíró séma. Medzhitov 2008-as és 2010-es review cikkei mégis egy jó, átfogó leírást nyújtanak a gyulladás legfőbb jellegzetességeiről^{1,3}. Eszerint a tipikus gyulladásos immunválasz négy összetevőre épül: a kiváltó stimulusra, az azt érzékelő szenzorra, a szenzor által indukált inflammatorikus mediátorra és az effektor funkciókat ellátó, a mediátorok által befolyásolt célszövetre. Mindegyik összetevőnek számos típusa van, és ezek különböző kombinációi igen eltérő gyulladásos folyamatokat eredményezhetnek.

A kiváltó stimulus lehet exogén (mikroorganizmusok, allergének, idegen testek) vagy endogén (károsodott vagy stressznek kitett szövetekből felszabaduló anyagok, nátrium-urát kristályok, oxidált lipoproteinek, az extracelluláris mátrix degradációs termékei). A behatoló mikroorganizmusokat a gazda szervezete az úgynevezett patogén-asszociált molekuláris mintázatok (PAMP) alapján ismeri fel. Ezek olyan, a mikrobák bizonyos csoportjaira jellemző, konzervált struktúrák, amelyekre adaptálódva a magasabbrendű szervezetek veleszületett immunrendszere egy nagyon gyors és hatékony, de mérsékelt specifikus választ tud indítani. Néhány példa patogén-asszociált molekuláris mintázatokra: a Gram-negatív baktériumok lipopoliszacharidja (LPS), a bakteriális peptidoglikán és flagellin, a vírusok hemagglutininje, valamint a mikroorganizmusokra specifikus, az eukariótákra nem jellemző örökítőanyag motívumok (metilálatlan CpG DNS, duplaszálú RNS). Ezeket a mintázatokot a gazdaszervezet sejtjei mintázatfelismerő receptorokkal (PRR) képesek érzékelni: Toll-like receptorokkal (TLR), NOD-like receptorokkal (NLR), mannóz receptorral és a scavenger receptorokkal. Az endogén stimulusokra az a jellemző, hogy normális, egészséges állapotban vagy nem képződnek, vagy olyan helyen vannak elkülönítve (intracelluláris kompartmentumokban, vagy az ereken kívüli extracelluláris térben), ahol az őket felismerő szenzorok számára hozzáférhetetlenek. Az endogén stimulusok szenzorai lehetnek sejt felszíni receptorok (pl. a nekrotikus sejtekből felszabaduló ATP-t érzékelő P2X purin receptor makrofágokon), vagy oldott enzimek/aktivátorok (pl. a Hageman-faktor az érfal károsodását követően kollagénnel találkozáskor aktiválódik)³.

A gyulladásszerű stimulusok a megfelelő szenzorokon keresztül sejtek által szekretált, vagy plazmaproteinekből kialakuló inflammatorikus mediátorok megjelenését eredményezik. A celluláris mediátorokat főként speciális leukociták (elsősorban a szöveti makrofágok és hízósejtek), kisebb részben a gyulladás által érintett szövet saját sejtjei termelik. Egyes mediátorok, mint a szerotonin és a hisztamin a hízósejtek, bazofilek és vérlemezkék granulumaiban preformáltan állnak rendelkezésre, és a gyulladást kiváltó stimulus megjelenése után nagyon gyorsan felszabadulhatnak. Az oldott mediátorok a plazmában inaktív prekursorokként általánosan megtalálhatók, de a gyulladásszerű akut fázis reakció során nagymértékben emelkedik a koncentrációjuk. Biokémiai tulajdonságaik alapján az inflammatorikus mediátorok hét csoportba sorolhatók: vazóaktív aminok, vazóaktív peptidok, komplement rendszer komponensek, lipid mediátorok, citokinek, kemokinek és proteolitikus enzimek¹. A vazóaktív aminok és peptidok a vaszkuláris rendszer befolyásolásával fokozzák az érfal permeabilitását, a megfelelő helyeken történő vazodilatáció és vazokonstriktio kombinációjával módosítják a szövetek vérellátását. Ezek eredményeként fokozódik a szérumkomponensek kijutása az érintett szövetekbe. A komplement rendszer aktiválódása során keletkező C3a, C4a és C5a fragmentek a gyulladás helyére vonzzák a granulocitákat és a monocitákat, valamint segítik a hízósejtek granulumaik kiürülését, ezáltal közvetve szabályozzák az érfal állapotát. A lipid mediátorok (eikozanoidok és platelet aktiváló faktor) a sejtmembrán foszfolipidjeiből keletkeznek a foszfolipáz A2 enzim működése által. A Ca²⁺ ionok hatására aktiválódó enzim a foszfatidilkolint arachidonsavra és lizofoszfatidsavra hasítja. Az előbbiből a ciklooxygenáz izoformák (COX1, COX2) prosztaglandinokat (PG) és tromboxánokat, a lipoxigenáz enzimek leukotriéneket és lipoxineket szintetizálnak. A PGE2 vazodilatációt, fájdalmat és lázat okoz. A leukotriének simaizom-összehúzó hatásuk mellett kemotaktikus hatással is bírnak. Ezzel szemben a lipoxinek antiinflammatorikus hatásúak, a gyulladás terminálásában és a szöveti regenerációban fontosak. A lizofoszfatidsav acetilációjával keletkező platelet aktiváló faktor számos gyulladásszerű folyamatot indukál: fehérvérsejtek kemotaxisát, vazodilatációt vagy vazokonstriktiót, az érfal átteresztőképességének fokozását, és a vérlemezkék aktivációját^{1,3}.

A kemokinek funkciója elsősorban a leukociták extravazációjának stimulálása és irányításuk a károsodás/fertőzés helyére. A proteolitikus enzimek (pl. elasztin, katepszinek, mátrix metalloproteinázok) a kórokozó direkt emésztése mellett az extracelluláris mátrix és a bazális membrán fehérjeinek degradációjával segítik a leukociták migrációját és a szövetek regenerációját, újrastrukturálását.

A citokinek meghatározó szereppel bírnak a gyulladás kialakításában, lefolyása során a különböző szervek működésének összehangolásában, valamint a normális állapot helyreállításában is. Szintézisükre számos sejttípus képes, a legfontosabbak a makrofágok és a hízósejtek. A pro-inflammatorikus citokinek, pl. a tumor-nekrózis faktor α (TNF α), az interleukin (IL)-1 és az IL-6 aktiválják az edotélt, a csontvelőből mobilizálják a granulocitákat, és az akut-fázis reakció beindításával a gyulladást szisztémás szintre emelik. Az akut-fázis reakció során a máj által nagy mennyiségben szintetizált akut-fázis fehérjék (C-reaktív protein, mannózkötő lektin, fibrinogén) fertőzés esetén segítik a kórokozó opszonizációját, és aktiválják a komplement rendszert. Ezzel párhuzamosan a citokinek (elsősorban az IL-6) az agy ereinek endotéliumában fokozzák a PGE2 szintézist, ami a központi idegrendszerre hatva kiváltja a betegséggel járó viselkedési tüneteket: a láz, étvágytalanság, fáradtság, aluszékonyság együttesét³.

Mint az már az eddigiekből is kiderült, a gyulladás effektorai a mediátorok által módosított működéssel válaszoló sejtek, vagy szövetek. Bizonyos mediátorokra - mint a TNF α vagy az IL-6 - szinte minden szövet képes reagálni, de az egyes szövettípusok reakciója nagyon eltérő lehet. A gyulladásos mediátorok legnyilvánvalóbb hatása a lokális folyadékgyülem kialakulása, amelyben a kiáramló, aktivált fehérvérsejtek és enzimek megkezdik a kórokozók elpusztítását és a károsodott szövet funkcióinak helyreállítását.

A kezdeti stimulus függvényében a reagáló szenzorok, mediátorok és effektorok különböző kombinációja biztosítja, hogy a veleszületett immunitás keretein belül a kialakuló immunválasz a lehető leghatékonyabb és minél inkább specifikus legyen. Például bakteriális fertőzés esetén a TLR receptorokról induló jelátvitel elsősorban TNF α , IL-6 és PGE2 mediálásával egy jellegzetes antibakteriális immunválaszt alakít ki, ugyanakkor virális infekciót követően az interferonok produkciójával valósul meg a vírusellenes válasz. Parazita férgek ellen a szervezet a hízósejtek és bazofilek által felszabadított hisztamin, IL-4, IL-5 és IL-13 segítségével védekezik. Érdekes módon ugyanez a reakció váltható ki allergének által, allergiás gyulladást eredményezve, ami elsősorban nyálkahártyák epitéliumát, simaizomzatát és erezetét érinti¹.

1.2. A makrofágok szerepe a gyulladás folyamatában

A szervezetbe behatoló mikroorganizmusok ellen elsőként a veleszületett immunrendszer fagocitáló sejtjei (makrofágok, polimorfonukleáris leukociták) veszik fel a harcot. Ezek a sejtek a csírvonalban kódolt receptoraikkal képesek felismerni a patogén

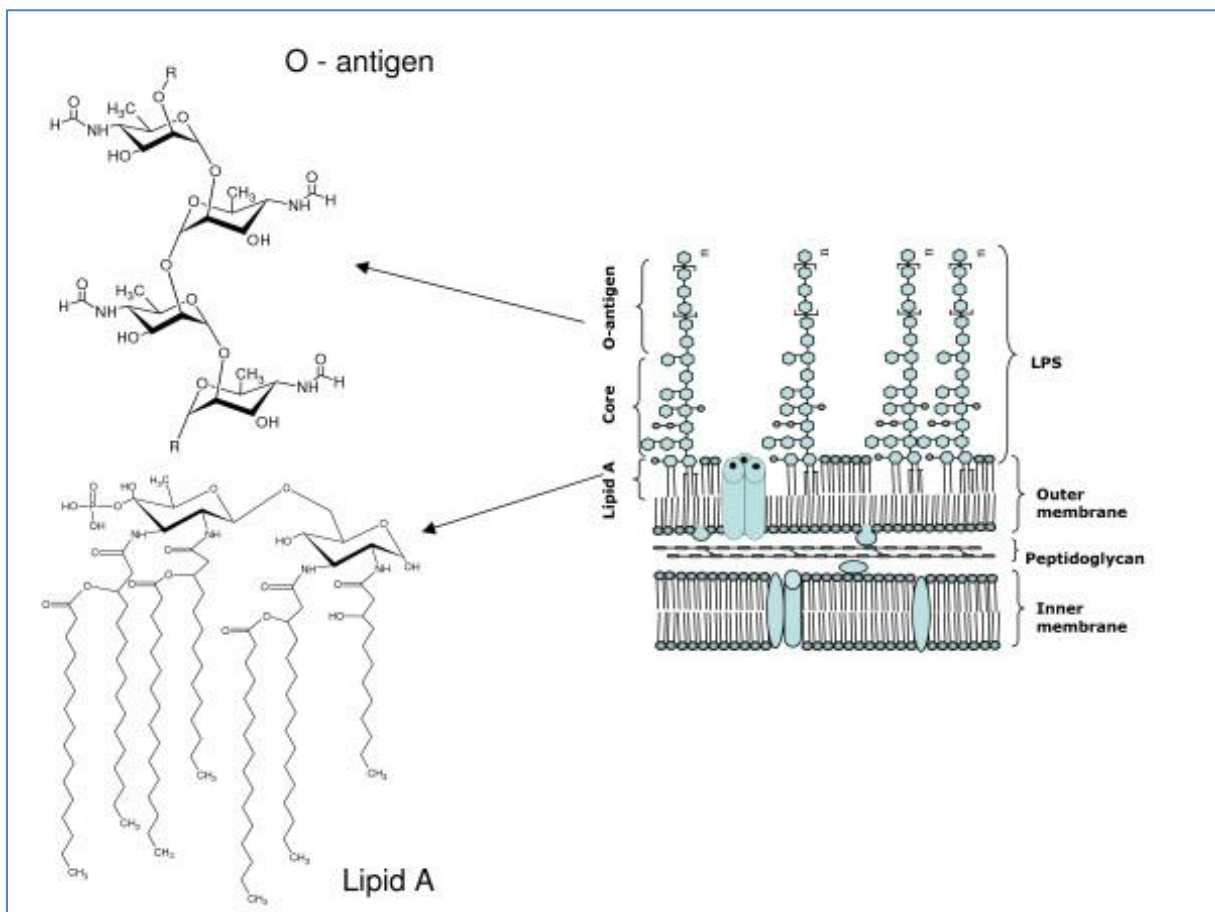
mikroorganizmusokra jellemző mintázatokat. A mononukleáris fagocitarendszert a monociták és a makrofágok alkotják. A monociták a mieloid progenitor sejtekből differenciálódott, vérben keringő, 10-15 µm átmérőjű sejtek. Az érpályából kilépve a monociták makrofágokká érnek, melyeknek különböző típusai ismertek: a kötőszövetekben a hisztiociták, a májban a Kupffer-sejtek, a tüdőben az alveoláris makrofágok, az agyban pedig a mikroglia a jellemző makrofág csoportok. A differenciálódott makrofágok a monocitákhoz képest akár egy nagyságrenddel is nagyobb méretűek lehetnek, és megnő rajtuk az immunrendszeri funkciók betöltéséhez szükséges receptorok expressziója. A természetes és az adaptív immunitás mellett az egészséges szöveti működés fenntartásában is fontos szereppel bírnak: bekebelezik az elhalt sejteket és a behatoló mikrobákat, enzimeket és gyulladáshoz szükséges mediátorokat termelnek. Egyik legfontosabb tulajdonságuk, hogy hivatásos antigénprezentáló sejtnek bemutatják a T-sejteknek az idegen antigént, valamint aktiválni is képesek a limfocitákat. Az utóbbi évtized kutatásai alapján azonban az is egyértelmű, hogy a makrofágok nem csak a védekező folyamatok aktiválásában és fenntartásában, hanem azok megfelelő időben történő leállításában is kritikus szereppel rendelkeznek⁴.

Bár a gyulladás fogalma csak a teljes szervezet vagy a szövetek szintjén értelmezhető, mivel a kialakulása az egyes sejttípusok inflammatorikus folyamatainak következménye, az olyan beavatkozásokkal, amelyek a sejtek gyulladáshoz szükséges jelátvitelét gátolják, hatékonyan csökkenthető a gyulladás mértéke. A makrofágok kulcsfontosságú sejtek mind az akut, mind a krónikus gyulladás kialakulásában, ezért a bennük lezajló inflammatorikus aktiváció gátlása megfelelő terápiás stratégia.

1.3. A lipopoliszacharid

A lipopoliszacharid (LPS) a Gram-negatív baktériumok külső membránjában található, komplex szerkezetű endotoxin. A baktérium számára a védelemben fontos: részt vesz a külső membrán impermeabilitásának kialakításában, patogén baktériumok esetén pedig segíti a gazdaszervezet immunfolyamataival szembeni rezisztenciát. Utóbbi hatását főként a komplement aktiváció és a membrán attack komplex felépülésének gátlásával éri el⁵. Bár kis mennyiségben az osztódó baktériumokból is felszabadul, nagyobb mennyiségben akkor válik hozzáférhetővé, ha a szervezetbe került baktériumok lízis, fagocitózis vagy antibiotikumok hatására szétesnek. Az ilyenkor felszabaduló, nagy dózisu LPS a gazda immunfolyamatainak túlzott aktiválása miatt szisztémás gyulladáson és szepszison keresztül akár halált is okozhat.

Az LPS három jellegzetes szerkezeti egységből áll: a lipid A, az O-antigén és a core-poliszacharid régiókból (**1. ábra**). A hidrofób lipid A régió horgonyozza az LPS molekulát a baktérium külső membránjába. Két glükózaminból álló diszacharid, foszfátcsoportokkal és 12-14 szénatomszámú, telített zsírsavlánccal szubsztituálva. Ez a molekularész meglehetősen konzervált szerkezetet mutat a különböző Gram-negatív baktériumok között, ennek megfelelően a magasabbrendű szervezetek immunrendszere a lipid A felismerésére adaptálódott: az LPS szerkezeti elemei közül egyedül a lipid A komponens felelős az immunostimuláns hatásért^{5,6}. Ezt kihasználva bizonyos baktérium fajok képesek „megszökni” a gazdaszervezet védekező mechanizmusai elől. Például a bubópestist okozó *Yersinia pestis* egyes változatai a lipid A régióban általánosan megtalálható hat vagy hét zsírsavlánc helyett csak négyet-ötöt tartalmaznak, ami kevésbé stimulálja a fagociták mintázatfelismerő receptorait, így ezek a változatok fokozott patogenitást mutatnak⁵.



1. ábra: Az LPS szerkezete (forrás: <http://pixgood.com/lipopolysaccharide-structure.html>)

A core régió különböző hexózokból és heptózokból felépülő, ismétlődő egységeket nem tartalmazó, mérsékelten változékony szerkezetű oligoszacharid. A legnagyobb strukturális

változatossággal rendelkező komponens az O-antigén, ami akár egy adott fajon belüli diverzitást is mutathat, ezáltal lehetőséget teremt az egyedi baktériumtörzsek szerológiai azonosítására⁵. A hosszú poliszacharid láncban általában 2-8 monoszacharidból felépülő oligoszacharid egységek ismétlődnek maximum ötször. Az olyan mutáns baktériumok, melyeknek LPS-éből hiányzik az O-lánc, életképesek és szaporodni is tudnak táptalajon, tehát ez a komponens nem létfontosságú. Ugyanakkor megfigyelték, hogy egyes patogének (*Heliobacter pylori*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*) O-antigénje nagyon hasonló a humán glikoszfingolipidekhez, és azt egyfajta molekuláris mimikriként használva próbálnak a gazda immunsejtjei előtt rejtve maradni⁷.

1.4. A makrofágok LPS általi stimulációjának mechanizmusai

A Gram-negatív bakteriális infekciók leginkább jellemző patogén asszociált molekuláris mintázataként az LPS önmagában is aktiválja a szervezet védekező mechanizmusait, ezért in vitro és in vivo rendszerekben is gyakran használják az inflammatorikus folyamatok modellezésére.

1.4.1. Az LPS biológiai hatásait közvetítő extracelluláris elemek

Az 1990-es évekig úgy tartották, hogy az LPS aspecifikus módon, a lipid A részével a sejtmembránba épülve aktiválja az immunsejteket. Azóta számos információval gazdagodva tudjuk, hogy az LPS-re adott immunválasz számos specializált, extracelluláris fehérje bonyolult interakciójával kezdődik.

A véráramba jutott baktériumokból felszabaduló LPS elsőként az LPS-kötő proteinnel (LBP) találkozik. Az LBP egy 60 kDa méretű, máj által termelt szérumfehérje, a lipid transzferáz proteinek családjába tartozik⁸. A megkötött LPS-t a CD14-hez szállítja. A CD14 kétféle formában fordul elő: szolubilisen (sCD14) illetve egy glikofoszfatidil-inozitol csoporttal a sejtmembránba horgonyzottan (mCD14)^{6,8,9}. Ez a koreceptor továbbítja az LPS-t a gyulladásos jelátvitelt ténylegesen elindító TLR4/MD2 komplexhez. Az LBP és a CD14 sem elengedhetetlen az LPS-re adott immunválasz kialakításához, de hiányukban ez a válasz erősen csökkent intenzitású. Az LBP szerepe egyfajta amplifikáció: míg a baktérium membránba ágyazott LPS szinte egyáltalán nem indukál immunválaszt, az LBP által processzált, jól hozzáférhetővé vált lipid A-val rendelkező endotoxin már kevés kórokozó jelenléte esetén is hatékony védekezést indít meg. Súlyos fertőzés során azonban ez a jelerősítés hozzájárulhat a szeptikus sokk kialakulásához⁶.

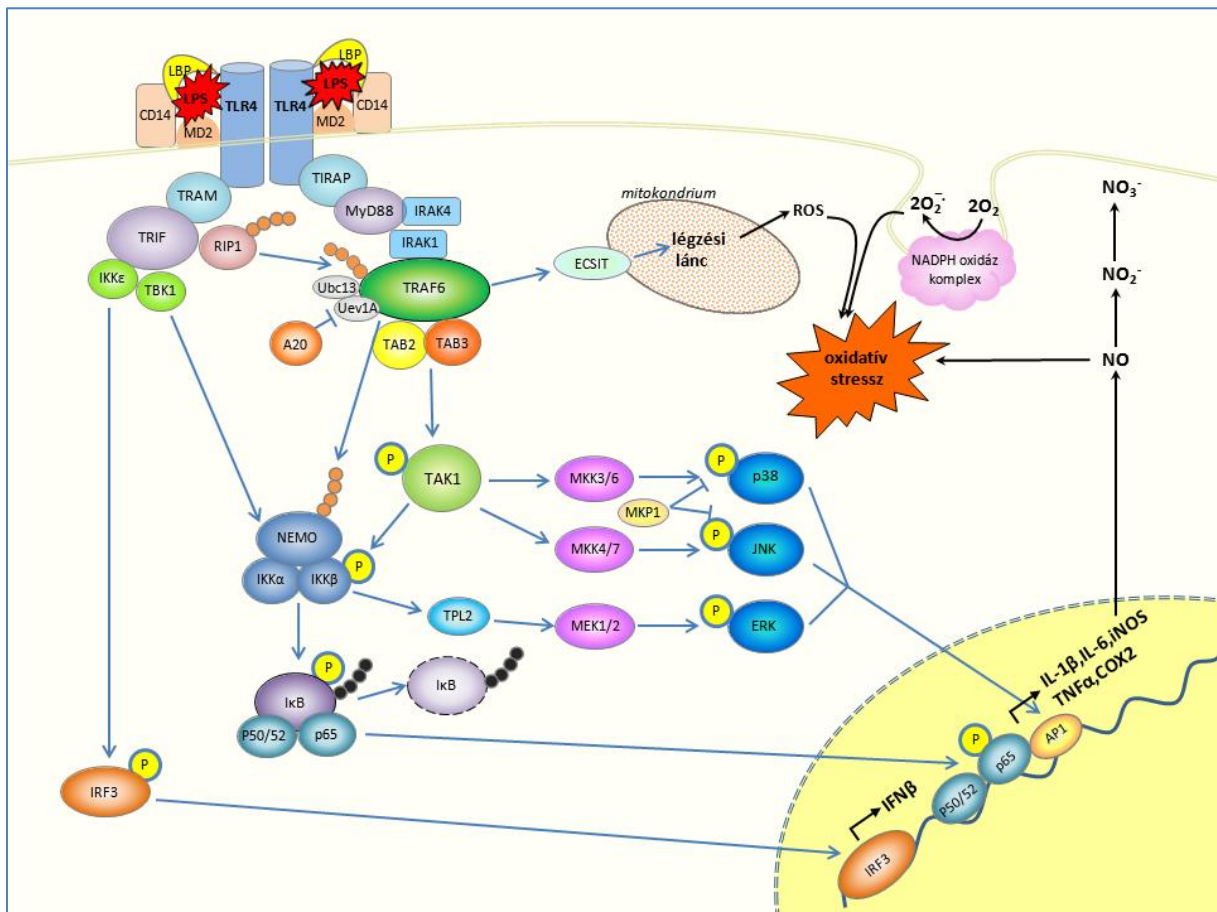
Az LPS felismerésében és a veleszületett immunfolyamatok aktiválásában a TLR4 receptornak van a legnagyobb szerepe. Az 1990-es évek közepétől felfedezett Toll-like receptorok biztosítják a veleszületett immunrendszeri elemek általi patogénfelismerést. Jelenleg 10 féle humán és 12 féle egér TLR ismert, melyeknek különböző kombinációjú homo- vagy heterodimerei olyan patogén-asszociált molekuláris mintázatokat ismernek fel, mint a baktériumokból, gombákból vagy vírusokból származó lipidek, lipoproteinek, fehérjék, és nukleinsavak^{10,11}. Ezen mintázatok TLR-ek általi felismerése a plazmamembránon kívül az endoplazmatikus retikulumban, endoszómákban, endolizoszómákban is történhet. A TLR-ek az interleukin-1 receptor szupercsaládba tartozó, I. típusú transzmembrán fehérjék. Extracelluláris részük a felismerendő PAMP-oknak megfelelően meglehetősen eltérő, de mindegyikre jellemző egy leucinben gazdag ismétlődő mintázat. Intracelluláris részük közös sajátossága a Toll/IL-1R (TIR) domain jelenléte, amely lehetőséget teremt szintén TIR domain tartalmazó citoplazmatikus fehérjékkel történő interakcióra¹¹.

A TLR4 az MD2 koreceptorával együttműködve indítja el a makrofágok inflammatorikus jelátvitelét. A TLR4-MD2-LPS komplex szerkezete mára pontosan ismert⁹. Az LPS lipid A részének hat zsírsavlánca közül öt az MD2 hidrofób zsebében található, egy pedig a TLR4-hez kötődik. Az LPS kötődés receptor dimerizációt okoz, amelynek következtében a TLR4 citoplazmatikus TIR domainjén megindulnak az intracelluláris jelátviteli folyamatok.

1.4.2. A TLR4 jelátvitel intracelluláris eseményei

Az MD2-LPS-TLR4 komplex összeállását követően a TLR4 intracelluláris részéről indulnak el a makrofágok jellegzetes, inflammatorikus jelátviteli folyamatai (**2. ábra**). Természetesen, mint minden esetben, a valóságban itt is inkább egy összetett szignáltranszdukciós hálózatról beszélhetünk, mint elkülönült útvonalakról. Knock-out egértörzseken végzett vizsgálatok alapján ugyanakkor a gyakorlatban a TLR4-ről induló jelátvitelt két ágra, az MyD88-függőre és a TRIF-függőre szokták felosztani. Mindkettő útvonalra jellemző az adapter proteinek meghatározó szerepe és a nem-konvencionális, K63-típusú ubikvitináció mechanizmusa. Az adapter proteinek olyan fehérjék, melyek gyakran nem rendelkeznek felismert enzimaktivitással, viszont számos mintázatkötő doménjük által más enzimek, jelátviteli komplexek összeszerelődését segítik elő, így rendkívül fontosak a sejten belüli folyamatok tér- és időbeli viszonyainak meghatározásában, és a jelátviteli útvonalak közötti cross-talk-ok megteremtésében. Az ubikvitináció elsőként felismert biológiai szerepe a fehérjék proteasomális degradációra történő megjelölése volt, újabban azonban bizonyították az

ubikvitin láncoknak egy egészen másfajta, jelátviteli aktivációt eredményező szerepét, amire több példát is szolgáltat a TLR4 jelátvitel. Az ubikvitin egy általánosan előforduló, igen konzervált szekvenciát mutató, 8,5 kDa méretű fehérje, ami a sejtekben fontos regulációs szereppel bír. A „klasszikus”, fehérjelebontást eredményező folyamatban a degradációra szánt fehérjéhez olyan poliubikvitin lánc kapcsolódik, amelynek monomerei egymással a 48. aminosav (lizin) oldalláncán keresztül kapcsolódnak. A következőkben taglalt jelátvitel több lépésénél ellenben a kapcsolódó láncban az egyes ubikvitin egységek a 63. (lizin) oldalláncokon kapcsolódnak¹². A K48- és K63-típusú poliubikvitin láncok eltérő konformációja következtében azokat különböző ubikvitin-kötő doménnel rendelkező fehérjék ismerik fel. Mindkét típusú mechanizmus több lépésben történik, egy ubikvitin aktiváló (E1), egy ubikvitin konjugáló (E2) és egy ubikvitin ligáz (E3) enzim részvételével. A TLR4 jelátvitel központi ubikvitin ligáza a TRAF6.



2. ábra: Az LPS hatására a makrofágokban aktiválódó jelátvitel

1.4.2.1. A MyD88-függő útvonal

Az LPS-t kötött receptor-komplex működésének következtében elsőként a MyD88-függő útvonal aktiválódik, ami a MAP kinázok és az NF κ B transzkripciós faktor korai aktivációján keresztül proinflammatorikus citokinek termelését irányítja. A TIRAP adapter kapcsolja a MyD88 (szintén adapter) fehérjét a TLR4 intracelluláris doménjéhez. A MyD88 ezután magához vonzza az IRAK4-et és az IRAK1-et, az utóbbi aktivációja a TRAF6-tal történő interakcióját eredményezi. A TRAF6 az Ubc13 és Uev1A ubikvitin konjugáló enzimek segítségével számos fehérje, így önmaga, az IRAK1, és az IKK komplex regulátoros alegysége (NEMO) K63-típusú ubikvitinációját katalizálja. A TRAF6-on található poliubikvitint felismerve tud kötődni a TAB2 és a TAB3, ez vezet a TAK1 aktiválásához, ami foszforilálja az IKK β -t. A következő lépésben az I κ B foszforilációja megindítja annak K48-poliubikvitin-mediált proteasomális degradációját. Az I κ B gátlása alól felszabaduló NF κ B alegységek a nukleuszba transzlokálódva számos gén fokozott expresszióját idézik elő: az inflammatorikus interleukinek és a TNF α a makrofágokból felszabadulva a gyulladást a szervezet távolabbi részeire is kiterjesztik, a COX-2 enzim által szintetizált arachidonsavszármazékok a gyulladással járó fájdalom és láz kialakulását eredményezik, az iNOS enzim által arginin \rightarrow citrullin átalakulás során termelt nitrogén-monoxid a patogén elpusztítását célozza, azonban eközben citotoxikus hatása is lehet. Az útvonal igen fontos leágazásaként a TAK1 és a TPL2 által aktivált MAPK kinázok foszforilálják a p38, JNK és ERK MAP kinázokat, melyek több transzkripciós faktor (NF κ B, AP-1 dimerek) aktiválásával szintén fokozzák az inflammatorikus gének expresszióját. Fontos regulációs mechanizmusként megemlítendő a MAP kinázok MKP-1 általi inaktivációja.^{6,9,10,11,12}

1.4.2.2. A TRIF-függő útvonal

Időben a MyD88-dependens útvonalénál később, az újabb kutatások szerint az LPS-t kötő receptor-komplex endocitózisa és endoszómába épülése után indul meg a TRIF-függő útvonal aktivációja^{10,11}. A TRIF-et a TRAM adapter vonzza a receptor intracelluláris részéhez, majd a TRIF-en felépülő jelátviteli komplex részeként a TBK1 és az IKK ϵ az IRF3 transzkripciós faktor foszforilációját és sejtmagi transzlokációját idézi elő. Az IRF3 fokozza az IFN β transzkripcióját. Az így keletkező I típusú interferon válasz a bakteriális fertőzések egyes eseteiben segíti a fertőzéssel szembeni védekezést, más esetekben viszont kifejezetten káros hatása is lehet, például a makrofágok apoptózisának stimulálása által¹³.

A TRIF- és a MyD88-függő útvonalak között több érintkezési pont is található. Ezek egyike a TRIF és a TRAF6 között kialakuló interakció, a RIP1 K63-típusú ubikvitinációja által megvalósuló cross-talk és az IKK komplex TBK1 általi aktivációja¹¹. Ezek eredményeként a már leírt módon valósul meg az NFκB késői aktivációs hulláma, és az általa szabályozott gének termékeinek további fokozott expressziója.

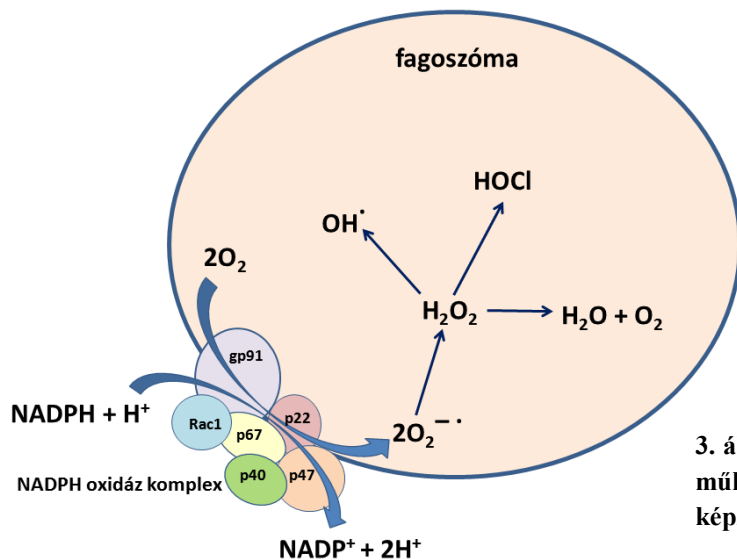
A makrofágok LPS hatására történő maximális válaszához a két útvonal együttes működése szükséges.

1.4.2.3. Reaktív oxigén és nitrogén intermedierek szerepe a makrofágok patogén elleni védekezésében

1933-ban figyelték meg először a polimorfonukleáris leukociták fagocitózis közben mutatott megnövekedett oxigénfogyasztását¹⁴. A korai feltételezések szerint ez a többlet a fagocitózis fokozott energiaigényének kielégítése érdekében felgyorsult oxidatív foszforilációt végző mitokondriumok oxigénfogyasztásából származna. Később azonban felismerték, hogy elsősorban nem a mitokondriumok a felelősek a jelenségért. Rossi és Zatti írták le 1964-es cikkükben¹⁵ elsőként a NADPH oxidáció szignifikáns változását fagocitózist végző fehérvérsejtekben, és mára meglehetősen jól jellemzett folyamat a fagocitáló immunsejtek antimikrobiális védekezésének egyik legfontosabb mechanizmusa, az oxidatív „burst”.

A jelenség hátterében a baktériumok bekebelezése közben a fagoszómában képződő nagy mennyiségű reaktív oxigén származék (ROS; szabadgyökök és peroxidok) áll. Ezek a reaktív molekulák egyrészt direkt módon károsítják a fagocitált patogént, másrészt az inflammatorikus jelátviteli fehérjékkel reagálva felerősítik a gyulladási folyamatokat. Az oxidatív burst során történő előállításukat a NADPH oxidáz enzimkomplex végzi. A komplex több alegységből áll, melyek egy része nyugvó sejtekben a sejtmembránban (p22 és gp91), másik része a citoszólban található¹⁶. Stimuláció hatására az alegységek a membránban összeszerelődnek, és a NADPH oxidáz a kialakuló fagoszóma belsejében, NADPH-ról származó elektronokat felhasználva a molekuláris oxigént szuperoxid anion gyökké redukálja **(3. ábra)**. Ez a szabadgyök önmagában nem kifejezetten reaktív, további reakciók során azonban igen agresszív molekulákká alakulhat. Spontán dizmutációval vagy a szuperoxid dizmutáz (SOD) enzimek által katalizálva a szuperoxid gyök hidrogén peroxiddá alakul, ami már könnyen reakcióba léphet a bakteriális/celluláris makromolekulákkal, a kataláz enzim segítségével elbomolhat vízzé, vagy tovább fejlődhet a leginkább reaktív hidroxil gyökké

(Fe^{2+} általi katalízisben) illetve hipoklorittá (mieloperoxidáz által). Nitrogén monoxid és szuperoxid gyök reakciójából keletkezhet a szintén nagyon reaktív peroxinitrit¹⁶.



3. ábra: A NADPH oxidáz enzimkomplex működése nyomán a fagoszómában képződő reaktív oxigén intermedierek

A felsorolt szabadgyökök a fagoszómában hozzájárulnak a baktériumok vagy gombák elpusztításához. Ezen folyamat részletei még nem teljesen ismertek, de valószínű, hogy a baktériumok makromolekuláinak közvetlen, szabadgyökök általi károsítása mellett a reaktív intermedierek a fagoszóma pH-jának és ionkoncentrációjának megváltoztatásával is segítik a patogének elleni védekezést¹⁷. Mindeközben intracelluláris jelátviteli szereppel is bírnak: számos jelátviteli mechanizmusban megfigyelték, hogy a sejt oxidatív státuszának eltolódása a pro-oxidatív irányba képes felerősíteni a ROS termelést elindító folyamatot. Ez a pozitív feedback a makrofágok inflammatorikus jelátvitelében is megfigyelhető, ahol számos protein kinázról (p38, JNK) és transzkripciós faktorról (AP-1, NFκB) kimutatták, hogy reaktív oxigén gyökök hatására fokozódik az aktivitásuk^{16,18}. A legelfogadottabb magyarázat szerint ez a foszfoprotein-foszfatazok csökkent működésének köszönhető. Ezen enzimek mindegyikének az aktív centrumában található egy cisztein, amely –SH csoportjának redukált állapotban tartása a katalitikus aktivitás feltétele. A szabadgyökök ezt a cisztein oldalláncot oxidálva inaktíválják a protein tirozin foszfatazokat, aminek következtében azok targetjei foszforilált állapotban maradnak.

Az LPS önmagában, a baktérium többi részének jelenléte nélkül is kiváltja a makrofágokban megfigyelhető oxidatív burst-öt, de a TLR4 és a NADPH oxidáz komplex aktivációja közötti konkrét jelátviteli lépések még nem ismertek pontosan. Maitra és munkatársai 2009-es

közleményükben¹⁹ leírták, hogy makrofágokban az IRAK-1 jelenléte szükséges az LPS kezelés hatására létrejövő ROS termeléshez és a NOX-1 gén fokozott expressziójához, valamint hogy az IRAK-1 és a NADPH oxidáz aktivátoraként ismert kis GTP-áz fehérje, a Rac1 között közvetlen, fizikai interakció létezik.

A mitokondriális eredetű ROS szerepéről a makrofágok patogén elleni válaszában megoszlanak a vélemények. West és munkatársai²⁰ érdekes eredményei szerint a makrofágok TLR4 receptorának LPS-kötését követően megfigyelhető, hogy a mitokondriumok ROS termelésük fokozásával szimultán a fagoszómák köré gyűlnek, ezáltal feltehetően segítenék a bekebelezett kórokozók elpusztítását. A jelenség során a TRAF6 a mitokondriumhoz transzlokálódik, és az ECSIT (a légzési lánc komplex I összeszerelésében résztvevő fehérje) ubikvitinációján keresztül növeli a mitokondriumok ROS termelését.

A felsorolt mechanizmusok alapján kijelenthető, hogy a makrofágok fagoszómáiban termelődő reaktív oxigén intermedierek a mikrobákkal szembeni védekezés fontos résztvevői. Ugyanakkor a keletkező szabadgyökök és peroxidok képesek átdiffundálni a membránokon, és így a fagoszómából a citoszólba vagy az extracelluláris térbe kijutva komoly károkat okozhatnak a szövetekben. Gyakorlatilag bármilyen makromolekulával képesek reakcióba lépni, a DNS károsításával mutációkat okozhatnak, a lipidperoxidáció során tönkreteszik a membránokat, a fehérjék aminosav oldalláncainak oxidálása következtében módosítják azok harmadlagos szerkezetét. Ezen folyamatok eredőjeként az elhúzódó, erőteljes oxidatív stressz a makrofágok és a környező szöveti sejtek apoptózisát vagy nekrozisát okozva súlyos szövetkárosodáshoz vezethet. Ennek megfelelően bizonyított a szabadgyökök szerepe számos, krónikus gyulladással járó kórkép (rheumatoid arthritis, sclerosis multiplex, Alzheimer) patomechanizmusában.

1.5. Miért szükséges a gyulladás csillapítása?

A gyulladással járó folyamatok káros hatásait a publikációk jelentős része az aktiválódó immunrendszeri folyamatok hibás regulációjának vagy kontroll alól való kiszabadulásának tudja be. A gyulladást magát igen gyakran, mint betegséget említik. Károsodott regulációs mechanizmusok egyes ritka kórképekben valóban okozhatnak túlzott inflammatorikus reakciót, ilyen például az NLRC4 mutációja következtében kialakuló steril gyulladás²¹, a p53 egy bizonyos mutációja miatt létrejövő krónikus gyulladás²², vagy az egyes típusú interferon gén fokozott aktivációjából származó lupusz-szerű gyulladással szindróma²³. Mindazonáltal evolúciós szempontból nézve nehezen magyarázható, hogy a nagyon sok embert érintő

gyulladásos állapotok (pl. rheumatoid arthritis, Alzheimer, szepszis) mögött hogyan állhat olyan hibás reguláció, ami a populációban ilyen nagy gyakoriságban fennmaradt. Egy egyértelműen káros, vagy ennyire rosszul működő mechanizmusnak a törzsfajlás során ki kellett volna szelektálnia. Ha célzottan járunk utána a gyulladásos immunválasz evolúciós eredetének, már több olyan tanulmányt találunk, amely tisztázza, hogy a gyulladás egy adaptív folyamat eredménye, ami nélkül nem lennének képesek felvenni a harcot a környezetünkben érkező ártalmakkal szemben. Ezt jól illusztrálják azok a genetikai mutációk, amelyek az inflammáció valamely lépésének károsodása miatt a fertőzésekre való fokozott fogékonyságot eredményeznek^{24,25}. Akkor hogyan lehetséges mégis, hogy napjainkban a gyulladásra egy olyan problémaként tekintünk, amit minden esetben kezelni, csillapítani kell?

Okin és Medzhitov egy nagyon elegáns, és evolúciós megközelítésből is helytálló magyarázatot adnak erre a kérdésre²⁶. Röviden összefoglalva az elméletük alapja az élőlények jellegeinek egy adott környezet mellett érvényes befektetés/megtérülés (cost/benefit) optimuma, melynek célja mindig a maximális haszon elérése minimális befektetéssel. A befektetések tovább bonthatók két típusra: az ún. direkt költségekre és a sebezhetőségekre (vulnerability). Az előbbiek a jelleg fenntartásához kapcsolódó vagy működésének következtében elkerülhetetlenül kialakuló jelenségek, amelyeket a jelleget hordozó egyedek mindegyike „megfizet” a jellegből eredő haszonért cserébe. A sebezhetőségek ezzel szemben a jelleghez köthető, csak a populáció kis részét sújtó, de gyakran katasztrofális események. Nagy haszonnal járó jellegek fenntartásába megéri nagy energiákat fektetni, ezek az ún. „high cost/high benefit” jellegek. A gyulladásos válasz tipikusan egy ilyen „high cost/high benefit” jelleg: szükség esetén életmentő, ugyanakkor nagy energiákat kíván az elemeinek fenntartása (direkt költségek), és sebezhetőségként magában hordozza egy potenciálisan halálos, elhatalmasodó immunválasz lehetőségét.

Mivel a befektetések és megtérülések optimális egyensúlya mindig csak egy adott környezet mellett érvényes, a környezeti tényezők változásai kedvezőtlenül befolyásolhatják egy jelleg ráfordítás/megtérülés kompromisszumát. A „high cost/high benefit” jellegek fokozottan érzékenyek a környezeti változásokra, hiszen ha a ráfordítás/megtérülés optimumuk egy kicsit is eltolódik, a nagy befektetés miatt már kockázatos a jelleg fenntartása. Az emberi környezet a civilizáció során korábban elképzelhetetlen ütemben változott meg. Valószínű, hogy a fejlett társadalmakra fokozottan jellemző, az immunrendszeri működéseket közvetlenül érintő változások (lakóhely, ruházkodás, higiénés szokások miatt a mikrobáknak való csökkent kitettség, modern étrend, antibiotikum- és vakcina használat, mozgásszegény életmód) olyan

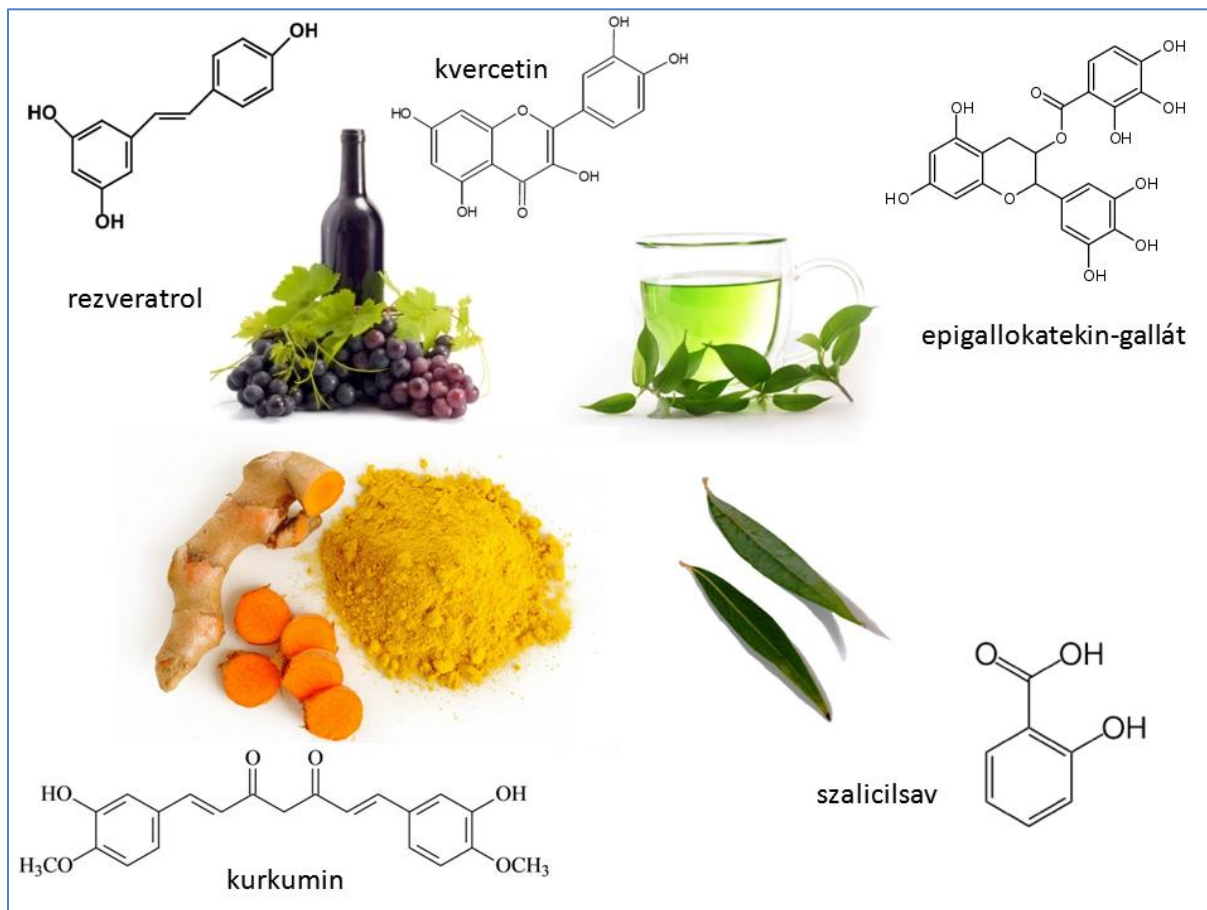
környezetet hoztak létre, amely mellett az inflammatorikus folyamatok ráfordítás/megtérülés egyensúlya szuboptimálissá vált, azaz egyre növekvő gyakorisággal találkozhatunk a gyulladásos válasz „árnyoldalaival”. További érdekes elgondolás az, hogy míg a gyulladás által nyújtott protektív hatások főként a korai életszakaszban kritikus jelentőségűek, addig a szaporodóképes életkor elérése után jelentkező, káros inflammatorikus folyamatok során megfizetjük az addigi védelem árát. Ez az ún. antagonisztikus pleiotrópia leginkább a krónikus gyulladások, és az időskori neurodegeneratív gyulladások terén szembetűnő. A várható élettartam növekedésével ezért mindinkább növekszik az inflammatorikus folyamatok negatív következményeinek gyakorisága.

A felvázoltakból jól látható, hogy bár a gyulladásos immunválasz az emberi szervezet nélkülözhetetlen mechanizmusa, ami védelmet nyújt a kórokozókval és számos szöveti ártalommal szemben, mégis sok esetben káros, akár halálos folyamatokat eredményez, és ilyenkor szükségessé válik a gyulladás csökkentése.

1.6. Polifenolok, mint gyulladáscsökkentő hatóanyagok

A polifenolok a növények olyan másodlagos anyagcseretermékei, melyek közös szerkezeti jellemzője egy vagy több, fenolos gyűrű és a rajta található hidroxilcsoportok megléte. Bioszintézisük fenilalaninból vagy sikiminsavból történik. A növényekben elsősorban az UV sugárzás és a patogének elleni védelmet szolgálják, szerepet játszhatnak ezenkívül a termékek ízének, színének, illatának kialakításában²⁷. Főbb csoportjaik a fenolsavak, a flavonoidok, a lignánok és a sztilbénok²⁸. Több mint 8000 természetesen előforduló polifenolt ismerünk, ezek jelentős része zöldségekben, gyümölcsökben, gabonában, és az ezekből készült élelmiszerekben, italokban található meg²⁷. A kémiai szerkezetből következő, és legkorábban felismert tulajdonságuk az antioxidáns hatás. Valójában az étrendünkben megtalálható antioxidánsok legnagyobb része a polifenolok csoportjába tartozik²⁹. 100 gramm friss gyümölcs akár 200-300 mg, egy pohár vörösbor vagy egy csésze tea körülbelül 100 mg polifenolt tartalmaz²⁷, továbbá jelentős polifenoltartalommal bír a kávé, bizonyos fűszerek és a csokoládé. Kutatások szerint a polifenolok teljes napi bevitele akár az 1 grammot is elérheti²⁹. Összehasonlításképpen, ez az érték például a napi C-vitamin bevitel tízszeresét, az E-vitamin és a karotinoidok bevitelének pedig kb. százszorosát jelenti. Az elmúlt két évtizedben rendkívüli mértékben megnőtt az étrendi polifenolok élettani hatásaira irányuló figyelem. Ennek eredményeként számos molekuláról bizonyították in vitro és in vivo tesztekben, hogy gyulladásgátló, kemopreventív vagy a szív- és érrendszeri folyamatokat kedvező irányba

befolyásoló hatással rendelkeznek. A legnagyobb „karriert” befutott polifenol vegyületek a curry egyik összetevőjében található kurkumin, a zöldteában lévő epigallokatekin-3-gallát, a vörösborban előforduló rezveratrol és kvercetin, valamint a szalicilsav (4. ábra).



4. ábra: Az étrendben nagy mennyiségben előforduló, intenzíven kutatott polifenolok

A jelenlegi terápiákat tekintve az inflammatorikus folyamatok farmakológiai gátlása három fő stratégiát alkalmaz: a glükokortikoid receptor agonisták használatát, az eikozanoid bioszintézis nem-szteroid gyulladásgátló szerek (NSAID) általi gátlását, valamint a proinflammatorikus citokinek jelátvitelére való beavatkozást, például TNF α vagy IL-6 elleni antitestekkel³⁰. A polifenolok ezen mechanizmusok közül alapvetően az eikozanoid szintézis módosításával fejtik ki antiinflammatorikus hatásukat. Az elmúlt évszázad gyógyszerkutatásai során igen nagy energiákat fektettek olyan gyulladásgátló hatóanyagok kifejlesztésébe, amelyek csökkentik a gyulladással járó kellemetlen és veszélyes tünetek kialakításáért felelős eikozanoid vegyületek szintézisét. A COX enzimek kulcsfontosságú szerepének felismerését követően fejlesztették ki az olyan elterjedt gyógyszereket, mint a paracetamol, a diklofenák és az ibuprofen. A legelterjedtebb COX-inhibitor, az aszpirin már 1903 óta van forgalomban. A

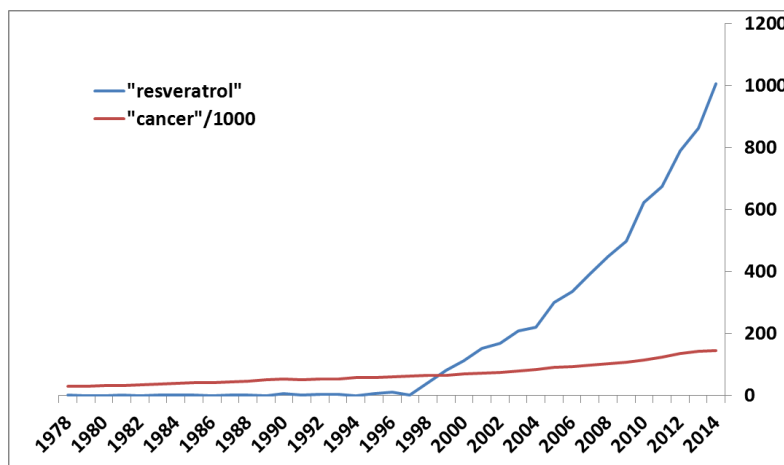
COX enzim ideális terápiás célpontnak tűnik, ugyanis gátlása sokszor önmagában elegendő a gyulladásos folyamatok enyhítéséhez. Ugyanakkor a COX-gátlószeresek használatának egyre több, előre nem látott mellékhatása kerül napvilágra. A COX enzimnek két, részben átfedő, részben viszont eltérő funkciót ellátó izoenzime létezik, a COX-1 és a COX-2. Az elsőként felfedezett COX-gátlószeresek nem szelektív módon mindkét izoformát gátolják, aminek eredményeként a hosszú távú alkalmazásuk súlyos vese- és gyomor-bél rendszeri károsodást okozhat. Ezt a problémát volt hivatott megoldani a szelektív COX-2 inhibitorok kifejlesztése, amelyek használatával ugyan elkerülhető a gyomor nyálkahártya károsodása, viszont feltehetőleg a pro- és az antitrombotikus hatású eikozanoidok egyensúlyának felborítása miatt fokozzák a szívroham és a stroke kockázatát. A COX-gátlószeresek mellékhatásai jól példázzák a klasszikus, „egy célpont-egy betegség” felfogású gyógyszerfejlesztési szemlélet hátrányait. Ugyanakkor a rendszerbiológia és a hálózat kutatás legújabb eredményei alapján úgy tűnik, hogy a sok tarthatóhoz kis affinitással kötődő, és azokat gyengébben befolyásoló ligandok sokszor hatékonyabbak lehetnek, mint egyetlen, akár kulcsfontosságú target erőteljes gátlása^{30,31}. Az előbbi stratégiával csökkenthetők a kulcsenzim fiziológiai szerepeinek kiesése miatt kialakuló mellékhatások, a kulcsenzim túlzott gátlása miatt aktiválódó, esetlegesen káros kompenzatorikus mechanizmusok, valamint jobban megőrizhető a homeosztatis hálózat stabilitása³¹. Az ilyen, multi-target terápiák különösen eredményesek lehetnek az olyan komplex folyamatok kezelésében, mint a gyulladás³⁰.

A természetes eredetű hatóanyagok, így az étrendi polifenolok a multi-target szemléletű gyógyszerfejlesztés ideális alanyai. Rendkívül sok molekuláris támadáspontjuk ismert, melyekre ugyan külön-külön mind létezik hatékonyabb gátlószer, a sokféle célpont polifenolonként eltérő spektruma azonban hatalmas lehetőségeket rejt magában. A polifenolokra ezért érdemes olyan, a természet által pre-optimalizált, potenciális hatóanyagként tekintenünk, amelyek segítségével leegyszerűsíthető a multi-target gyógyszerek amúgy igen bonyolult és költséges előállításának folyamata³⁰. A polifenolok ezenfelül további előnyös tulajdonsággal rendelkeznek: évszázadok, évezredek során bizonyították be a biztonságosságukat. Példaként említhető a kurkumin, amelyből az indiaiak fűszeres étrendjük mellett akár átlagosan napi 100 mg-ot is elfogyaszthatnak, egy klinikai tanulmány során pedig hatalmas mennyiségben, négy hónapon keresztül napi 12 grammal szedve sem okozott súlyosabb mellékhatásokat³². Habár a táplálkozástudományi-epidemiológiai kutatások és a népi gyógyászat tapasztalatai sokszor meggyőzően bizonyítják egy adott növényi kivonat/komponens jótékony egészségügyi hatását, egy potenciális terápiás

szerré válás szempontjából elengedhetetlen a pontos molekuláris hatásmechanizmusok megértése, és a vegyület biológiai hatásaiért felelős szerkezeti elemek azonosítása.

1.7. A rezveratrol

A rezveratrol a polifenolok, azon belül a sztilbenoidok csoportjába tartozó növényi fitoalexin. Elsőként Michio Takaoka izolálta 1940-ben *Veratrum albumból* (fehér zászpa), majd 1963-ban a *Polygonum cuspidatum* (japán keserűfű) gyökeréből való kivonás után hozták összefüggésbe a növényből készült tradicionális, japán kivonat gyógyhatásával^{33,34}. A zárwatermők számos nemzetségében előfordul, különösen gyakori a piros, bogyós gyümölcsökben és a földimogyoróban. A szőlőben a rezveratrol elsősorban a *Botrytis cinerea* fertőzés hatására keletkezik a levelek epidermiszében és a gyümölcs héjában, a gyümölcshúsban viszont nem jellemző. Ennek következtében a vörösborok rezveratrol tartalma sokkal magasabb (1365–3326 mg/l), mint a fehérboroké (96–146 mg/l)³⁵. A vegyület szőlőben való előfordulását 1976-ban ismerték fel, nagyobb figyelmet pedig 1992 után kapott, amikor a vörösborban megfigyelt viszonylag magas koncentrációja miatt először hozták összefüggésbe az ún. „francia paradoxon” jelenségével. A kutatók francia paradoxonnak nevezték el azt a meglepő észrevételt, hogy Franciaországban Európa többi országával és az Amerikai Egyesült Államokkal összehasonlítva körülbelül 40%-kal alacsonyabb a szívinfarktus gyakorisága, annak ellenére, hogy a franciák étrendje telített zsírsavakban meglehetősen gazdag³⁶. Azóta számos publikáció tekinti bizonyítottnak, hogy a jelenségért legalább részben a rendszeres, mértékletes vörösborfogyasztás, és az alkohol mellett a borban található polifenolok (rezveratrol, kvercetin, malvidin) a felelősek^{33,37}. Ugyanakkor más tanulmányok kétségbe vonják magának a francia paradoxonnak a létezését is³⁸. Minden bizonnyal részben a francia paradoxonnak köszönhető a rezveratrolra irányuló fokozott tudományos érdeklődés, amelynek eredményeként máig egyre növekvő ütemben jelennek meg a vegyület élettani hatásait taglaló publikációk (**5. ábra**).



5. ábra: A rezveratrolt övező tudományos érdeklődés alakulása

A kék vonal a PubMeden a „resveratrol” kulcsszóra kiadott publikációk számát mutatja az adott évben. A piros vonal a „cancer” keresésre kiadott találatok ezredrészét mutatva jelzi a tudományos publikációk növekedésének általános ütemét.

A rezveratrol mostanra szinte áttekinthetetlen tudományos irodalmában nagyon sokféle hatás és molekuláris hatásmechanizmus leírása megtalálható. Az eredmények sokszor egymásnak ellentmondanak, és nehezíti a megítélésüket az eltérő modellek és akár több nagyságrendben eltérő koncentrációk alkalmazása. A rezveratrol eddig felismert, legfontosabb hatásai³³:

- i. a molekuláris szerkezetből következő, direkt gyökfogyó és antioxidáns hatás,
- ii. a rákos sejtek (és egyes források szerint a normál sejtek) szaporodásának gátlása,
- iii. a rákos sejtek apoptózisának kiváltása,
- iv. gyulladásgátló hatás,
- v. kardioprotektív hatás,
- vi. élesztőgombák és alacsonyrendű szervezetek élethosszának növelése,
- vii. a hibás fehérjefeltekeredésből eredő neurodegeneratív betegségekre való kedvező befolyás.

A felsorolt hatások mögött azonosított fontosabb molekuláris mechanizmusokat a jobb áttekinthetőség kedvéért az **1. számú táblázat** szemlélteti. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy ezeknek a hatásoknak illetve mechanizmusoknak egy része még csak in vitro modellekben bizonyított, az emberi szervezet szintjén megnyilvánuló hatékonyságuk sok esetben kérdéses. Ezért elsősorban a rezveratrol relatíve alacsony biológiai hasznosulása, az orális bevitelt követő mérsékelt felszívódás, és az intestinalis epitéliumban és a májban történő intenzív metabolizmus lehet a felelős⁸⁶. Ha a PubMeden a rezveratrollal foglalkozó cikkek keresését leszűkítjük a klinikai vizsgálatokra, mindössze 81 találatot kapunk (2015 február). Ezek közül kettő, sikeres, kettős vak, placebo-kontrollált vizsgálatra az egyetemünkön, a 400 ágyas klinika pácienseinek bevonásával került sor. 2-es típusú diabéteszes betegeknek négy héten keresztül, napi 2x5 mg rezveratrolt adva a kezelési idő

végére kimutatható volt az inzulin rezisztencia csökkenése, valamint a trombocitákban az Akt fokozott foszforilációja⁸⁷. Az eredményekből írt publikáció a világon elsőként bizonyította a rezveratrol pozitív hatását diabéteszes betegekben, ezt újabban máshol végzett kutatások is megerősítették^{88,89}. A második kutatás a rezveratrol feltételezett kardioprotektív hatásait vizsgálta 40, infarktuson átesett páciens közreműködésével, akiknek egy csoportja három hónapon át napi 10 mg rezveratrolt kapott kapszula formában. A rezveratrol szignifikánsan javította a bal kamrai diasztolés funkciót és az endotél funkciót, csökkentette a vér LDL szintjét, valamint megelőzte bizonyos kedvezőtlen haemorheológiai változások kialakulását⁹⁰.

1. táblázat A rezveratrol ismert in vitro hatásai

A táblázat Saiko et al. (2008)³³ hasonló táblázta alapján készült, kiegészítve a 2004 utáni adatokkal.

leírt hatás	modell rendszer	koncentráció (μM)	hivatkozás
TNF által indukált MMP9, IL-6 és iNOS mennyiségének csökkentése SIRT1 aktiváción keresztül	3T3 fibroblasztok	0,05	[39]
ösztrogén-szerű és antiösztrogén hatások	MCF-7, MVLN mellrák sejtek	0,1-25	[40]
aril-hidrokarbon-indukált citokróm P450 1A1 expressziójának és enzimaktivitásának gátlása	HepG2 hepatoma és MCF-7 mellrák sejtek	0,5-5	[41]
mutáns poliglutaminok által okozott citotoxicitással szembeni védelem	transzgenikus C. elegans, HdhQ111 knock-in egerekből származó neuronok	0,5-10	[42]
humán citokróm P450 1B1 expressziójának és aktivitásának módosítása	MCF-7 humán mell karcinóma sejtek	1-20	[43]
humán CYP1 enzimek differenciális gátlása, CYP1A2 mechanizmus- alapú inaktíválása	humán máj lizoszómák, rovarsejt eredetű mikroszómák	1-25	[44]
p21 indukció általi ciklin D1, -D2, -E, valamint cdk2, -4 és -6 gátláson keresztül sejtciklus blokkolás és apoptózis indítása	humán A431 epidermoid karcinóma sejtek	1-25	[45]
forbol észter által indukált COX-2 transzkripció és –aktivitás gátlása	humán 184B5/HER emlő eredetű epiteliális sejtek	2,5-40	[46]
p53-on keresztül apoptózis indukció és a tumoros transzformáció gátlása	JB6 P1 egér epidermális sejtek, Epstein-Barr vírus- transzformált normál humán limfoblaszt sejtek	2,5-40	[47]
ösztrogén-függő preneoplasztikus duktális léziók 7,12-dimetilbenz- antracén általi keletkezésének gátlása	BALB/c nőstény egerek emlőmirigyei	3	[48]
számos tumoros sejtvonal szenitizációja TRAIL-indukálta apoptózissra, amely normál sejteknél nem volt megfigyelhető	GIMEN, LAN5 neuroblasztóma, PSFK medulloblasztóma, U373 és A 172 glioblasztóma, SK-Mel és Colo38 melanóma, MiaPaCa2 pankreász karcinóma, LNCaP prosztaták, MCF7 emlő karcinóma sejtek és humán fibroblasztok	3-100	[49]
TNF általi NF-κB és AP-1 aktiváció gátlása	U937 leukémia, Jurkat limfoid, HeLa és H4 epiteliális sejtvonalak	5	[50]
TCDD-indukált CYP1A1 és CYP1B1 expresszió, valamint katekol- ösztrogén-mediált oxidatív DNS károsodás gátlása	MCF-10A emlő epiteliális sejtek	5-50	[51]

embriónális mezenkefalikus sejtek terc-butil-hidroperoxid általi károsodásának kivédése	dopaminerg neuronokban gazdag mezenkefalikus szövet, patkány embrióból	5-500	[52]
CD95-mediált apoptózis kiváltása	HL-60 leukémia sejtek	8-32	[53]
ösztrogén receptorához való kötődésének gátlása	MCF-7 mellrák sejtek	10	[54]
ösztrogén-függő mellrák sejtek szaporodásának stimulálása	T47D mellrák sejtek	10	[54]
Bcl-2 down-regulációja és bax up-regulációja által apoptózis kiváltása, szaporodásgátlás	EC-9706 nyelőcsőrak sejtek	10	[55]
SOCS (suppressor of cytokine signaling) expresszió fokozás általi védelem az LPS-indukálta gyulladástól	N13 egér mikroglia sejtek	10	[56]
ösztrogén-indukálható protein expresszió befolyásolása	MCF-7, T47D, LY2, és S30 mellrák sejtek	10-15	[57]
JNK-on keresztüli p53 aktiváció és apoptózis indukció	JB6 egér epidermális sejtek	10-40	[58]
Rákos sejtek glükózfelvételeinek HIF-1 gátlás általi csökkentése	LLC, HT-29, and T47D sejtek	10-50	[59]
tumorsejtek klonális növekedésének gátlása	32Dp210, HL-60, U937, L1210 leukémia sejtek	10-80	[60]
protein kináz C inhibitor	patkány agyból tisztított PKC izozim elegy	10-90	[61]
ribonukleotid reduktáz inhibitor	L1210-R2 egér, K-562 humán leukémia, P-815 egér hízósejtes tumor sejtek	10-100	[62]
ribonukleotid reduktáz gátlás következtében a növekedés gátlása, a celluláris dezoxiribonukleotid-trifoszfát poolok csökkentése, ¹⁴ C-citidin DNS-be épülésének akadályozása	HL-60 leukémia sejtek	12,5	[63]
citokróm P450 3A4 mechanizmus-alapú inaktiválása	baculovírusal bejuttatott humán CYP3A4-et és NADPH-citokróm P450 reduktázt tartalmazó Sf9 rovar mikroszómák	20	[64]
ERK és p38 reguláción keresztüli p53 aktiváció és apoptózis	JB6 egér epidermális sejtek	20	[65]
növekedésgátlás, az S/G2 fázis-átmenet gátlása, ornitin dekarboxiláz enzimaktivitásának csökkentése	CaCo-2 vastagbélrák sejtek	25	[66]
IFN γ által indukált gyulladáshoz markerek mennyiségének STAT1 gátláson keresztül történő csökkentése	RAW 264.7 egér makrofágok	25-50	[67]
A sejtciklus S/G2 fázis-átmenet gátlása	HL-60 leukémia sejtek	30	[68]
TNF-indukált IKK aktiváció, NF- κ B DNS kötődés és NF- κ B-függő génátírás csökkentése	THP-1 és U937 monocita/makrofág sejtek	30	[69]
Ras-mediált NF- κ B aktiváció gátlása miatti fokozott apoptózis	H-Ras-t expresszáló Rat-1 sejtek	30	[69]
ciklin A és -B1, Cdk1 és Cdk2 szint növelése, Cdk1 foszforiláció	SW480 colon karcinóma sejtek	30	[70]

fokozása			
reaktív oxigén intermedierek és prosztaglandin szintézis gátlása	egér peritoneális makrofágok	30	[71]
számos, pro-inflammatorikus és pro-angiogén molekula, valamint mátrix metalloproteázok 7-oxo-koleszterol által indukált mennyiségi növekedésének megelőzése	M1 és M2 humán makrofágok	30	[72]
amiloid-béta peptidek szekréciójának és intracelluláris mennyiségének csökkentése	APP695 transzfektált HEK293 sejtek	40	[73]
sejtciklus megállítása az S fázisban, apoptózis indukció	MCF-7 mellrák sejtek	<50	[74]
protein kináz C ERK-től független gátlása	KATO-III gyomor adenokarcinoma sejtek	50	[75]
hipoxia által generált IL-8, IL-6, GLUT-1, VEGF expresszió csökkentése	izolált humán zsírszövet	50	[76]
androgén receptor expressziójának és funkciójának gátlása	LNCaP prosztatarák sejtek	50-100	[77]
protein kináz D autofoszforilációjának gátlása	tisztított rekombináns humán PKD	52	[78]
LPS-indukált, mikroglia-mediált neuroinflammáció csökkentése	primér, patkány kortikális neuron-glia kultúra	60	[79]
humán eozinofil aktiváció és degranuláció ERK és p38 gátlás általi megelőzése	humán, vérből izolált eozinofilek	<100	[80]
epiteliális differenciáció, mitokondriális proliferáció és membránpotenciál összeomlás, p53-tól független apoptózis	vad típusú és p53 -/- HCT116 colon karcinóma sejtek	100	[81]
Bcl-2 által kontrollált, mitokondrium részvételével lefolyó apoptózis	CEM-C7H2 T-ALL és C7H2 sejtek	100	[82]
Pseudomonas aeruginosa által okozott oxidatív stressz és apoptózis kivédése, ICAM-1 és humán béta defenzin-2 expresszió csökkentése	A549 tüdő epitheliális sejtek	100	[83]
G1/S és G2/M átmenetet pozitívan szabályozó kinázok mennyiségének és aktivitásának, és a ribonukleotid reduktáz működésének gátlása	MDA-MB-231 mellrák sejtek	<200	[74]
emlős DNS polimerázok gátlása	emlős B pol α , X pol β , pol λ	200	[84]
protein kináz D működésének és autofoszforilációjának gátlása	COS-7 majom vese fibroblasztok	200	[85]

1.8. Rezveratrol származékok

A természetes eredetű vegyületek multi-target jellegét kiaknázó gyógyszerfejlesztések célja az eredeti molekula hatásának optimalizálása, bizonyos szerkezeti módosítások által. Az optimalizálás alatt értendő a hatékonyabb felszívódás és biológiai hasznosulás, egy vagy több target erősebb gátlása, a különböző targetek gátlása közötti egyensúly megváltoztatása, vagy a nem kívánt célpontokra gyakorolt hatás megszüntetése³⁰. A célzott gyógyszerfejlesztések szükséges feltétele az eredeti molekula hatásmechanizmusának minél pontosabb ismerete, valamint az adott hatások létrehozásáért felelős molekuláris szerkezeti elemek feltérképezése. A kémiai szerkezet és biológiai hatások összefüggéseinek kutatásában nélkülözhetetlen eszközt jelentenek a természetes, vagy szintetikusan előállított, ismert szerkezetű molekula analógok.

Az elmúlt két évtizedben nagyszámú ilyen rezveratrol analógot állítottak elő, és írták le az in vitro illetve in vivo rendszerekben kifejtett hatásaikat. A legtöbb vizsgált analóg szerkezete a hidroxilcsoportok számában és/vagy pozíciójában különbözik a rezveratrolétól. Gyakori emellett a hidroxilcsoportok megváltoztatása valamilyen más (pl nitroxi-, metil-, metoxi-) funkciós csoporttá, valamint a változatos struktúrájú rezveratrol dimerek és oligomerek létrehozása. Ezen származékok felhasználásával sok értékes adat látott napvilágot a rezveratrol funkció-szerkezet összefüggésének témakörében.

A rezveratrol biológiai hatásában meghatározó antioxidáns jelleg több publikáció eredményei alapján elsősorban a molekula hidroxilcsoportjaihoz köthető. Stivala és munkatársai tanulmánya⁹¹ szerint a hidroxilcsoportok metoxicsoportokkal történő szubsztitúciója csökkenti a molekula antioxidáns hatékonyságát in vitro, sejtmentes rendszerben. Mindhárom hidroxilcsoport hiánya (transz-sztilbén), illetve metoxicsoporttá történő cseréje (3,4',5-trimetoxisztilbén) az antioxidáns tulajdonság teljes elvesztésével járt. A három hidroxilcsoport nem egyenlő mértékben járul hozzá az antioxidáns aktivitás kialakításához; a 4' hidroxilcsoport szerepe a meghatározó, de szinergikus hatást mutat a 3 és 5 pozícióban lévő hidroxilcsoportokkal⁹¹. Szekeres és munkatársai a sztilbén vázon található hidroxilcsoportok számának növelésével azt találták, hogy egyes tetra- illetve hexahidroxi-transz-sztilbének a rezveratrolénál több mint 6600-szor nagyobb gyökfogó kapacitással bírnak³⁷. Ezzel szemben az orto-hidroxisztilbének orto-szemikinonokká alakulva, redox-ciklusba lépve toxikus oxigén gyököket képeztek.

A funkciós csoportok száma, helyzete és minősége természetesen más tulajdonságokra, így az antiproliferációs hatásra és egyes jelátviteli útvonalak aktivitásának módosítására is alapvetően kihat. A Paulitschke és munkatársai által szintetizált hidroxilált rezveratrol analógok jelentős része gátolta humán rákos sejtek szaporodását⁹². A legkisebb IC50 koncentrációval a hexahidroxi-sztilbén rendelkezett, a többi analóghoz képest erősebben gátolta a ribonukleotid reduktazt, a COX-2-t, valamint a rákos sejtek in vitro és in vivo migrációját⁹².

A piceatannol (3,5,3',4'-tetrahydroxi-transz-rezveratrol) kis mennyiségben a vörösborsban is megtalálható, és a rezveratrolból in vivo is keletkezik. A rezveratrolnál erősebb antitumor aktivitással rendelkezik, gátolja a COX-2-t, több protein tirozin kinázt, és az NFκB-t³⁷. Egy számos analóggal végzett tanulmány eredményei alapján a hidroxilált rezveratrol analógok általában a rezveratrolnál jobb COX-gátlók voltak, ellentétben a metoxi-szubsztituált analógokkal, amelyek egyáltalán nem gátolják ezt az enzimet⁹³. Emellett a hidroxilált analógokról azt a fontos felismerést írták le, hogy a COX gátlást már a szaporodásgátláshoz szükséges koncentráció tizedével elérik⁹³. Ashikawa szerint a sztilbén váz hidroxilcsoportjai nélkülözhetetlenek az NFκB transzkripciós faktor gátlásához⁹⁴, ugyanakkor Heynekamp 75 rezveratrol analóg tesztelése után arra jutott, hogy az NF-κB-t a leghatékonyabban gátló származékok általában gyenge antioxidánsok⁹⁵. Kang és munkatársai 78 újonnan szintetizált rezveratrol származék vizsgálatával további COX-1, COX-2 és NFκB enzimgátlókat azonosítottak⁹⁶. In vitro mérések alapján valószínűsíthető, hogy a DNS polimeráz enzimek gátlásában kritikus a 4' hidroxilcsoportok megléte⁹¹.

A fent említett rezveratrol analógokkal végzett kísérletek segítenek tisztázni a sztilbén vázon található funkciós csoportok biológiai szerepét. Jóval kevesebb, és némileg ellentmondásos információ áll rendelkezésre magának a sztilbén váznak a molekuláris hatásmechanizmusban betöltött funkciójáról. Erre a jelenleg rendelkezésre álló irodalom alapján csak a rezveratrol cisz izomerével (3,4',5-trihidroxi-cisz-sztilbén) és a dihidro-rezveratrollal foglalkozó kutatások eredményeiből következtethetünk.

A cisz-rezveratrol nem található meg a szőlőben, a vörösborsban azonban már többen is kimutatták⁹⁷, feltehetően vagy az erjedés közben keletkezik az élesztők izomeráz enzimei által, vagy a viniferinek (rezveratrol polimerek) felbomlásával. Képződhet továbbá transz-rezveratrolból UV hatására⁹⁷. A cisz-rezveratrollal foglalkozó tanulmányok nagyobb része a két rezveratrol izomer hatásaiban inkább csak kvantitatív, mint kvalitatív különbségeket talált:

a cisz forma kevésbé hatékony antioxidáns, gyengébben gátolja a humán platelet aggregációt, a lipidperoxidációt, valamint számos tumoros sejtvonal növekedését⁹⁷. Ezzel szemben Stivala és munkatársai szerint a két izomer gyökfogó kapacitása megegyezik⁹¹, Basly szerint pedig a cisz forma a hatékonyabb⁴⁰. Stivala munkája alapján a transz konfiguráció elengedhetetlen a DNS polimeráz gátlás útján történő proliferáció gátláshoz⁹¹.

A dihidro-rezveratrol a rezveratrol intestinalis metabolizmus során keletkező redukált formája⁹⁸. Biológiai hatásairól egyelőre keveset tudunk. Míg egy vizsgálatban 25-100 μM rezveratrol gátolta primér humán fibroblasztok szaporodását, a dihidro-rezveratrol ugyanebben a koncentrációban nem volt hatással a sejtekre⁹⁹. A redukált forma az eredeti molekulánál gyengébb antioxidáns, és nem befolyásolja a kezelt sejtek sejtciklusát. Egy másik tanulmány ugyanakkor a dihidro-rezveratrol bifázisos proliferatív hatásáról számol be emlő- és prosztatata tumor sejtekben, valószínűtlenül alacsony (piko-nanomoláris) koncentrációterületben¹⁰⁰.

2. A kutatás célkitűzései

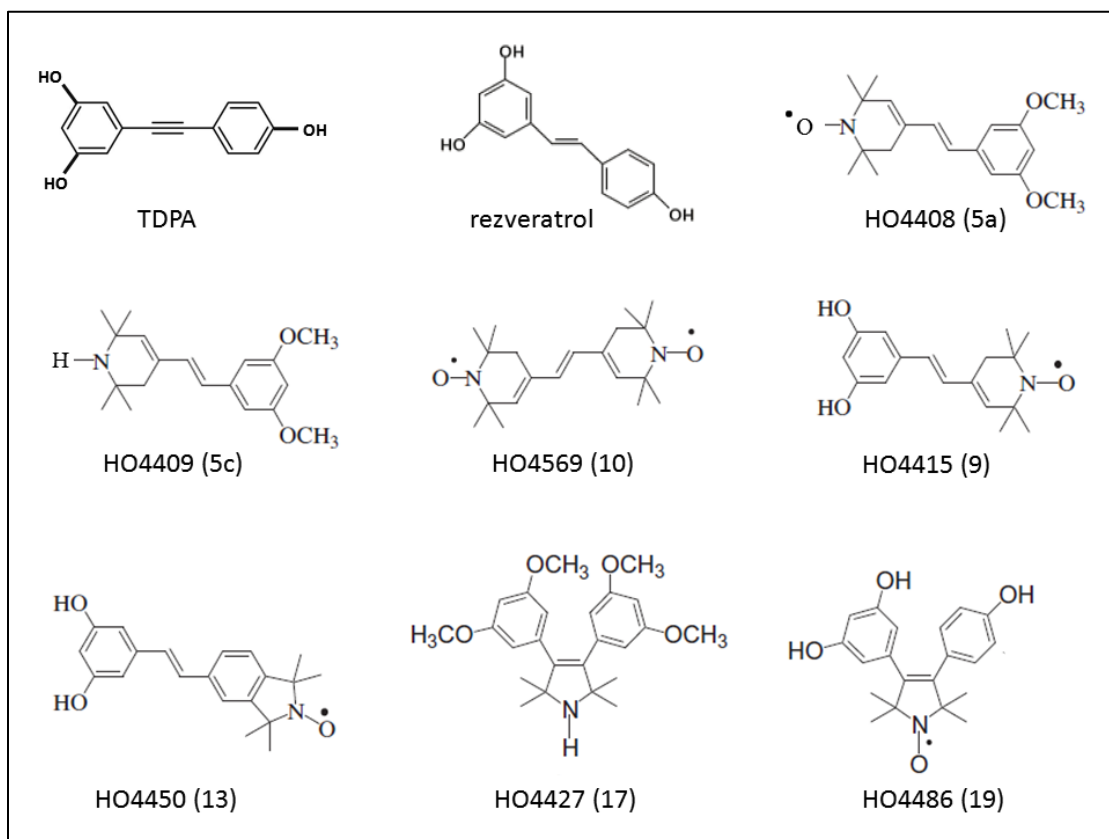
A rezveratrol egy több mint húsz éve felismert gyulladásgátló és tumorellenes hatásokkal rendelkező növényi polifenol. A kedvező élettani hatásainak molekuláris hátterére vonatkozó információk azonban több ponton is hiányosak, vagy ellentmondásosak. Úgyszintén kevésbé ismert a molekula szerkezeti jellemzőinek a szerepe a biológiai hatások kialakításában. Kutatásunk céljai voltak ennek megfelelően:

- A rezveratrol anti-inflammatorikus hatásmechanizmusának további feltárása in vitro, lipopoliszachariddal stimulált egér makrofág modellben.
- Olyan rezveratrol analógok azonosítása, amelyek az eredeti molekulánál hatékonyabban gátolják a makrofágok inflammatorikus folyamatait, vagy különböző típusú tumoros sejtek szaporodását.
- Az ismert szerkezetű analógok és a rezveratrol hatásának összehasonlításával a sztilbén típusú polifenolok biológiai hatásait meghatározó szerkezeti jellemzők jobb megismerése.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Anyagok

A sejt kultúrák kezeléséhez használt rezveratrolt a Sigma-Aldrich-től rendeltük, a TDPA-t Dr. Mátyus Péter, a paramágneses rezveratrol analógokat Dr. Kálai Tamás bocsátotta rendelkezésünkre (6. ábra). A polifenolokból 200 mM-os törzsoldatokat készítettünk DMSO-ban, a kezelésekhez ezt a törzsoldatot hígítottuk tovább a sejtek médiumával. A végső DMSO koncentráció minden esetben 0,1 % alatt maradt. A makrofágok aktivációjára használt LPS-t (*Escherichia coli* 0127:B8), a proteáz- és foszfatáz inhibitor koktélt, a HRPO-konjugált anti-egér antitestet a Sigma-Aldrich-től rendeltük. A HRPO-konjugált anti-nyúl antitestet Bio-Rad Laboratories-től, a COX-2, p-I κ B, p-p65, p-IKK, IKK, p-p38, p-ERK, ERK elleni antitesteket a Cell Signaling Technology-től, a p-JNK és MKP-1 elleni antitesteket a Santa Cruz Biotechnology-től, az anti-GAPDH-t a Millipore-től, az anti-JNK-ot pedig az R&D Systems-től szereztük be.



6. ábra: A vizsgált rezveratrol analógok A TDPA-t SZV1361 néven Dr. Mátyus Péter szintetizálta, a paramágneses analógokat (HO sorozat) pedig Dr. Kálai Tamás és munkatársai. A zárójelben jelzett számokkal jelöltük a vegyületeket az eredményeket ismertető publikációban (Kálai et al. Synthesis and study of new paramagnetic resveratrol analogues. *Bioorg Med Chem.* 2011 Dec 15)

3.2. Sejtkultúra

A RAW 264.7 egér makrofágokat (ATCC) és a RAW Blue makrofágokat (Invitrogen), a HepG2 sejteket (ATCC), valamint a B16-F10 melanoma sejteket 10 % FCS-sel kiegészített, 4,5 g/l glükóz tartalmú, endotoxinmentes DMEM-ben (Sigma) tartottuk fenn, 37 °C-os, magas páratartalmú, 5 % CO₂-ot tartalmazó termosztátban. Az A549 sejtek 1 g/l glükózt tartalmazó DMEM-ben (Sigma), a PC12 sejtvonalat RPMI-ben, a HeLa sejteket MEM médiumban tenyésztettük. Antibiotikumként a RAW Blue sejtek médiumához normocint és zeocint, a többi sejtvonaléhoz penicillin/streptomycin keveréket adtunk. A sejtek mycoplasma mentességét Hoechst festéssel ellenőriztük.

3.3. Peroxid gyökfogyó kapacitás vizsgálata sejtmentes rendszerben

A dihidrorodamin 123 redox-szenzitív fluoreszcens festék oxidációját 10 µM H₂O₂ és 60 µM Fe²⁺-EDTA eleggyel váltottuk ki, és vizsgáltuk annak alakulását 0,25-50 µM rezveratrol vagy TDPA jelenlétében. Az eloxidált festék fluoreszcens intenzitását 494 nm excitációs és 517 nm emissziós hullámhossz mellett LS50B spektrofluoriméterrel (PerkinElmer) detektáltuk.

3.4. LPS-sel stimulált RAW makrofágok ROS termelésének mérése

Az előző nap megfelelő sűrűségben (RAW makrofágok esetén 5*10⁴/well, HepG2 és U251 sejteknél 5*10³/well) 96 lyukú plate-re kirakott sejteket az ábrákon jelzett módon kezeltük, majd 24 óra elteltével a sejtek ROS termelését dihidrorodamin 123 fluoreszcens festék alkalmazásával (a TDPA-s kísérletekben) vagy C400 festékkel (a paramágneses analógokkal folytatott kísérletben), 490/510-570 nm excitációs/emissziós hullámhossz mellett, Promega Glomax plate reader-rel mértük meg.

3.5. MTT assay

Az előző nap megfelelő sűrűségben (RAW makrofágok esetén 5*10⁴/well, a többi sejttypusnál 5*10³/well) 96 lyukú plate-re kirakott sejteket az ábrákon jelzett módon kezeltük, majd 5 vagy 24 óra elteltével a kezelő médium leszívása után a sejteket 3 órán át inkubáltuk 0,5 mg/ml MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oldattal (Alfa Aesar). A keletkezett formazán kristályokat sósavas SDS-sel feloldottuk, és az abszorbanciákat 550 nm-en plate reader-rel detektáltuk.

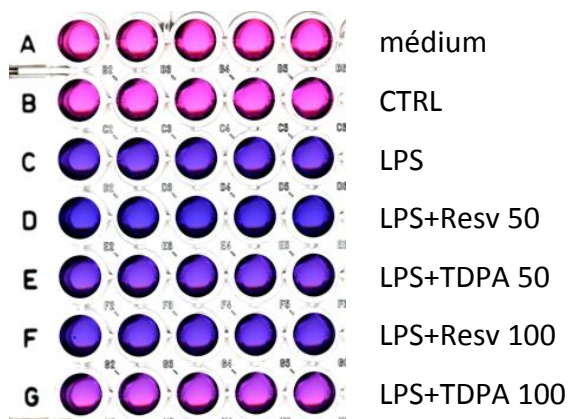
3.6. Szulforodamin B assay

Az MTT assay-nél leírtakkal megegyező kísérleti felállás mellett a 24 órás kezelést követően a sejteket 10 %-os, hideg triklórecetsavval fixáltuk, 1 %-os ecetsavban oldott, 0,04 %-os szulforodamin B oldattal megfestettük. 1 %-os ecetsavval történő mosogatás után a megfestődött fehérjékből a festéket 10 mM TRIS-szel oldottuk ki, majd 550 nm-en mértük a fényelnyelést.

3.7. NFκB aktiváció mérése RAW Blue sejteken

A RAW Blue az NFκB transzkripciós faktor aktivitásának nyomon követésére RAW264.7 sejtvonalból létrehozott, genetikailag módosított makrofág sejtvonal. A sejtekben egy kromoszomálisan integrált riporter gén található, amelyről transzkripcionálisan aktív NFκB hatására egy szekretált alkalikus foszfatáz enzim expresszálódik. A sejtek médiumában felhalmozódó foszfatáz mennyisége megfelelő szubsztrát (QuantiBlue; Invitrogen) hozzáadásával fotometriásan meghatározható.

A 96 lyukú plate-eken $5 \cdot 10^4$ /well számban kirakott sejtekről a megfelelő kezelések 5. vagy 24. órájában lyukanként 30 μ l médiumot egy új plate-en inkubáltunk 100 μ l QuantiBlue szubsztráttal. A keletkezett színreakciót (7. ábra) plate reader-rel detektáltuk 620 nm-en.



7. ábra: NFκB aktiváció meghatározása szolgáló Quanti Blue assay-ben kapott színreakció

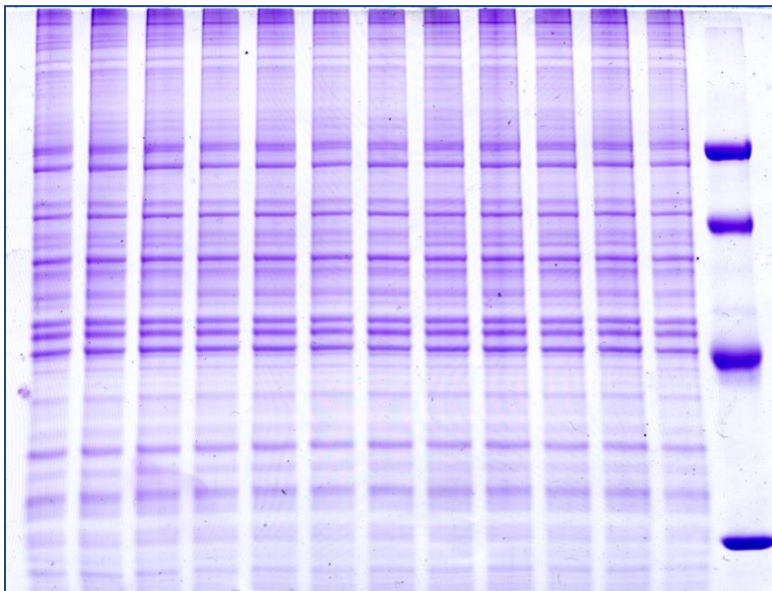
3.8. Citokin termelés meghatározása ELISA-val

A 6 lyukú plate-ekre kirakott RAW Blue sejteket 30 perces, 50 vagy 100 μ M polifenollal történő előkezelést követően további 1,5 vagy 6 órán át kezeltük 100 ng/ml LPS-sel. Az aktivált makrofágok által a médiumba szekretált citokinek (IL-1, IL-6, TNF α) mennyiségét

Ready-Set-Go ELISA kitékkel (eBiosciences) határoztuk meg, a gyártó utasításainak megfelelően.

3.9. Western blot

A 6 lyukú plate-ekre kirakott sejteket az ábrákon jelzett módon kezeltük, majd 30 perc vagy 3 óra után a kezelést leállítottuk, és a sejtekből fehérjemintát készítettünk. Röviden: a sejteket a médium eltávolítása után jégen tartva, hideg NP40 lízispufferben (50 mM pH 8.0 TRIS-ben oldott 150 mM NaCl, 1 % NP40 substitute, 0,1 % SDS, 1:200 proteáz és foszfatáz inhibitor koktél) felkapartuk, és 4 Celsius fokon rázattuk 40 percig. Centrifugálás és protein koncentrációmérés után a lizátumokhoz egyenlő térfogatú 2x Laemmli puffert adtunk, és a mintákat 5 percig forraltuk. A poliakrilamid géltre mintánként 20 µg fehérjét vittünk fel (**8. ábra**).



8. ábra: Poliakrilamid gélen történő elválasztást követően Coomassie blue-val megfestett fehérjék

A primer antitesteket 1:1000 hígításban használtuk, kivéve az anti-MKP-1-et és anti-pJNK-ot (1:200), és az anti-GAPDH-t (1:15000). A szekunder antitesteket 1:3000 hígításban alkalmaztuk. A bandek előhívása Thermo Scientific ECL-lel, szkennelés utáni kiértékelése NIH ImageJ szoftverrel történt. Loading kontrollként vagy GAPDH-t, vagy a foszforilált formához tartozó totál proteint használtunk. Szükség esetén a nitrocellulóz membránok újrajelölése előtt azokat Thermo Scientific Restore stripping pufferrel mostuk le.

3.10. Mitokondriális membránpotenciál meghatározása flow citométerrel

A mitokondriumok membránjának potenciálváltozásait JC-1 fluoreszcens festék (Molecular Probes) alkalmazásával követtük nyomon. Az ép mitokondriumokban a festék aggregátumokat képezve vörös színt mutat, a membrán depolarizáció hatására ez eltolódik a zöld tartományba. A fedőlemezekre ültetett, majd az ábrán feltüntetett módon kezelt sejteket 30 percig inkubáltuk 2 μ M JC-1 oldattal, majd FACSCalibur (BD Biosciences) flow citométerrel 488 nm excitációs és 590 nm (vörös), valamint 529 nm (zöld) emissziós hullámhosszokon analizáltuk. A kiértékelés CellQuest szoftverrel (BD Biosciences) történt.

3.11. Apoptózis/nekrózis arány és sejtciklus meghatározása flow citométerrel

Az élő, korai apoptotikus, és apoptózis vagy nekrozis útján elhalt sejtek mennyiségi meghatározása flow citométerrel történt (Muse cell analyzer, Merck-Millipore). A 6 lyukú plate-eken megfelelően kezelt sejteket a kezelési idő lejártával feltripszineztek, majd a tripszinezést a sejtek saját, korábbi kezelőmédiúmával állítottuk le, és a sejteket lecentrifugáltuk (ily módon a kezelés során elpusztult, felúszott sejteket sem veszítettük el). A megfelelő sűrűségűre hígított sejtszuszpenziót ezután a gyártó utasításainak megfelelő módon inkubáltuk Muse Annexin V & Dead Cell Assay Kit reagenssel, majd az egyes sejtpopulációkban a különböző csoportokba eső sejtek számát a Muse készülékkel detektáltuk. A kitben található reagens egyrészt az apoptózis során a membrán külső oldalára forduló foszfátidil-szerin csoportokat jelöli, másrészt a 7-AAD festékkel csak az elhalt/károsodott citomembránnal rendelkező sejteket.

A sejtciklus különböző fázisaiban lévő sejtek mennyiségét hasonló módon, a gyártó utasításainak megfelelően etanolos fixálás után a Muse Cell Cycle Assay Kit segítségével határoztuk meg. Az egyes sejtciklus-fázisok elkülönítése a kitben található propidium jodid által festődött DNS mennyisége alapján történik.

3.12. Nitrit produkció meghatározása

Az $5 \cdot 10^4$ sejt/well denzitásban 96 lyukú plate-ekre kirakott RAW 264.7 makrofágokat a következő napon kezeltük 100 ng/ml LPS-sel önmagában vagy a polifenolok valamelyikével együtt adva (12,5-100 μ M), vagy hagytuk kezeletlenül. 24 óra elteltével a sejtek felülúszóiból 100 μ l-t új mikroplate-re pipettáztunk, és egyenlő térfogatú Griess-reagenssel (1 %

szulfanilamid, 0,1 % naftil-etilén-diamid 5 % foszforsavban) inkubáltuk. A keletkezett színreakcióból eredő fényelnyelést 550 nm-en, plate reader-rel detektáltuk.

3.13. Kolónia formáció vizsgálata

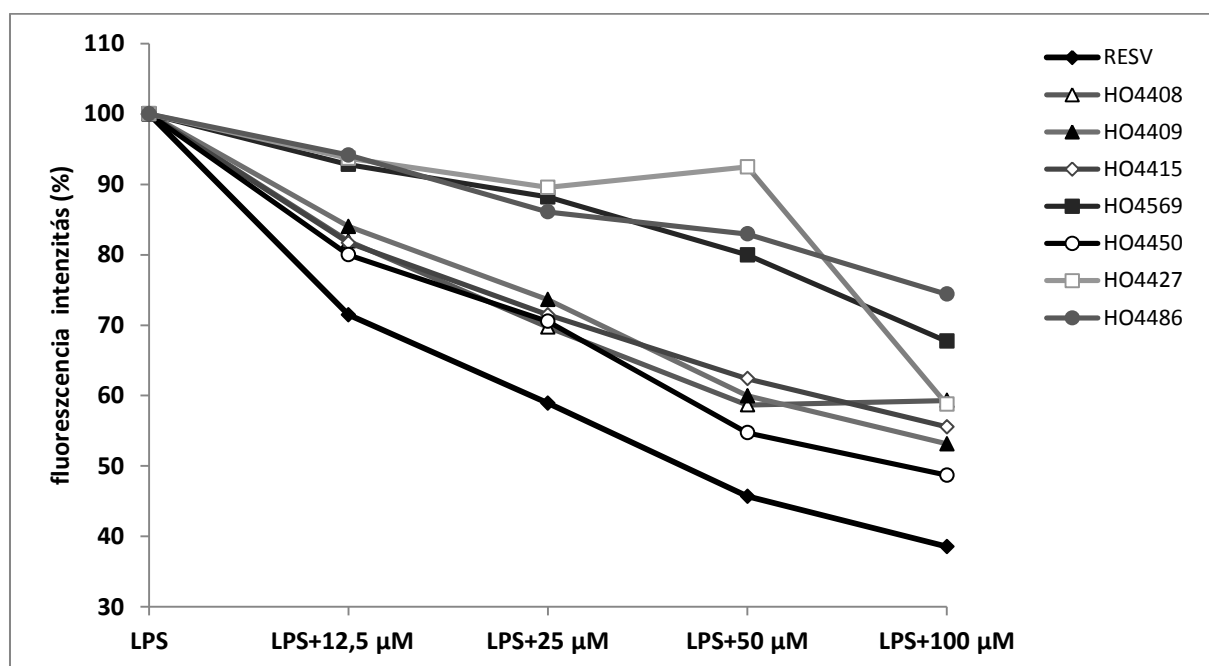
A kolónia formáció teszthez a sejteket egy nappal a kezelés előtt nagyon alacsony sűrűségben (500/well) tettük ki 6 lyukú plate-re. A kezelést hét napon át folytattuk. A hetedik napon a médium leszívása és PBS-sel való mosás után a keletkezett kolóniákat Coomassie-blue oldattal megfestettük. A kolóniák számából és méretéből következtetni lehet a kezelő anyag antiproliferatív hatására.

4. Eredmények

4.1. Paramágneses rezveratrol analógok antiinflammatorikus hatása

4.1.1. Mindegyik vizsgált paramágneses analóg a rezveratrolnál gyengébb antioxidáns.

Az analógok antioxidáns tulajdonságának felmérése céljából vizsgáltuk azok hatását LPS-sel stimulált RAW264.7 makrofágok ROS termelésére. 24 órás kezelést követően azt találtuk, hogy - habár mind a 7 alkalmazott analóg képes valamilyen mértékben visszafogni a LPS által indukált szabadgyök generálást - egyikkel sem érhető el olyan nagyfokú hatás, mint a rezveratrollal (9. ábra). Meglehetősen hatékony antioxidáns jelleget mutatott a HO4450 és a HO4409, amelyek 50 μM koncentrációban adva 45, ill. 40 %-kal csökkentették a megemelkedett ROS termelést.

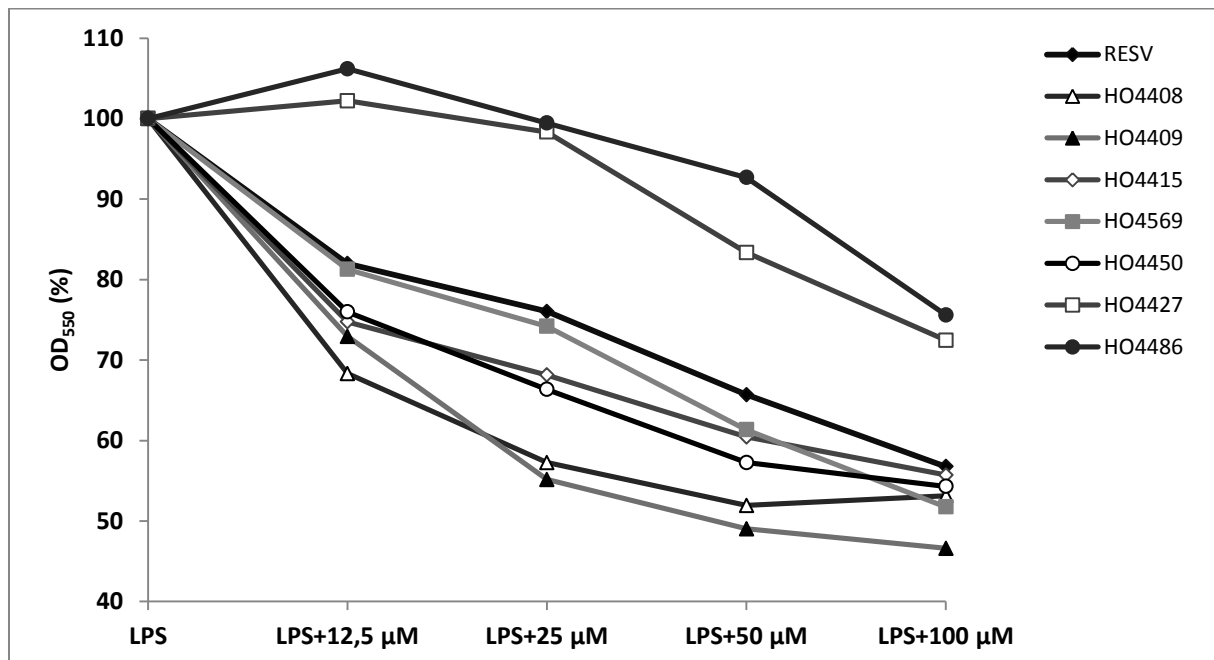


9. ábra: Paramágneses rezveratrol analógok hatása a makrofágok LPS által indukált ROS termelésére

A 96 lyukú plate-ekre kirakott makrofágok ROS termelését 24 órás kezelés (100 ng/ml LPS, 12,5-100 μM polifenol) után C40 fluoreszcens festékkel mértük meg. A kezeletlen csoport ROS termelése az LPS kezeltének kb. 50 %-a volt. A SEM maximális értéke mindig 3 % alatti volt. n=6

4.1.2. Számos analóg a rezveratrolnál hatékonyabban gátolja az aktivált makrofágok nitrit termelését.

A makrofágok aktivációjának a ROS termelés mellett egy másik nagyon fontos történése a nitrogén monoxid szintézise. Az igen reaktív NO gyorsan átalakul nitritté, ami felhalmozódik a sejtek médiumában, és Griess reagenssel kimutatható. 24 órás LPS kezelést követően azt találtuk, hogy az LPS által kiváltott nitrit produkciót mind a 8 polifenol koncentráció-függő módon gátolta (**10. ábra**). Kettő analóg kivételével (HO4427 és HO4486) mindegyik a rezveratrolnál erősebb gátló hatást mutatott. Különösen nagy hatékonyságot láthatunk a HO4408 és a HO4409 molekuláknál, amelyek a megnövekedett nitrit szintet körülbelül 50 %-kal csökkentették.



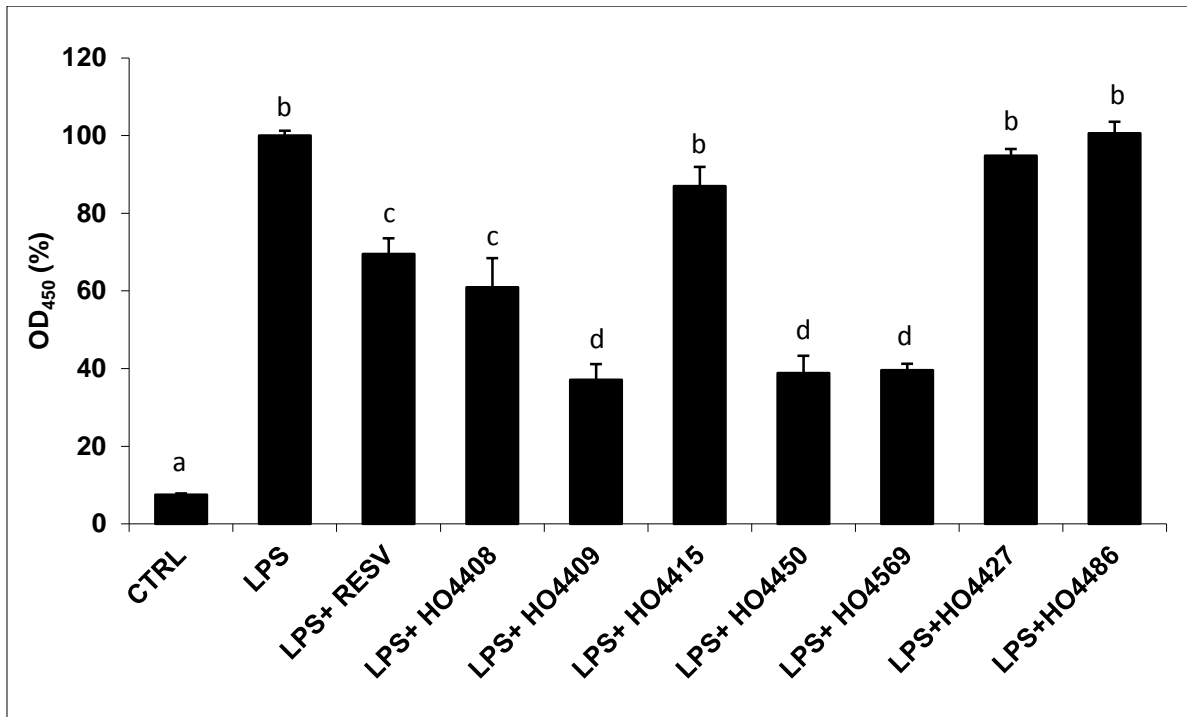
10. ábra: Paramágneses rezveratrol analógok hatása makrofágok LPS által indukált nitrit termelésére

A RAW264.7 sejteket LPS-sel (100 ng/ml) és rezveratrollal illetve analógjaival (12,5-100 μM) kezeltük, majd 24 órán át inkubáltuk. A termelődött nitrit mennyiségét Griess-Ilosvay reagens hozzáadásával 550 nm-en spektrofotometriásan mértük. A SEM maximális értéke mindig 2 % alatti volt. n=6

4.1.3. Három analóg a rezveratrolnál erősebben gátolja az aktivált makrofágok TNFα termelését.

A TNFα a makrofágok által termelt egyik legfontosabb pro-inflammatorikus citokin, amely az immunrendszer többi sejtjére hatva felelős a gyulladásos folyamatok felerősítéséért. A rezveratrolról régóta ismert, hogy képes gátolni a TNFα szintézisét eredményező folyamatokat. LPS-sel aktivált makrofág modellünkben három olyan analógot sikerült

azonosítanunk (HO4409; HO4450; HO4569), amelyek a rezveratrolnál is eredményesebben csökkentik az endotoxin hatására termelődő TNF α mennyiségét (**11. ábra**).

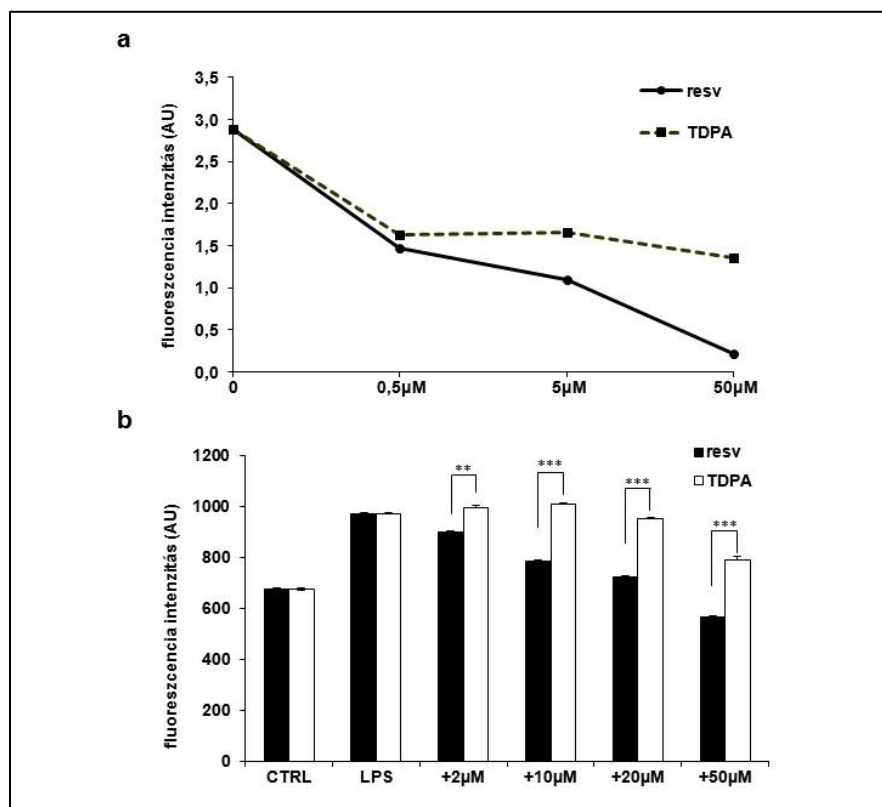


11. ábra: Paramágneses rezveratrol analógok hatása a makrofágok LPS által indukált TNF α termelésére
A RAW 264.7 sejteket LPS-sel (100 ng/ml) és rezveratrollal illetve analógjaival (50 μ M) kezeltük, majd 90 percen keresztül inkubáltuk. A termelődött TNF α mennyiségét ELISA kittel 450nm-en spektrofotometriásan mértük. Az eltérő betűkkel jelzett értékek szignifikánsan különböznek. $p < 0,05$ $n=3$.

4.2. A rezveratrol és a TDPA hatása endotoxinnal aktivált makrofágokra

4.2.1. A TDPA a rezveratrolnál gyengébb antioxidáns.

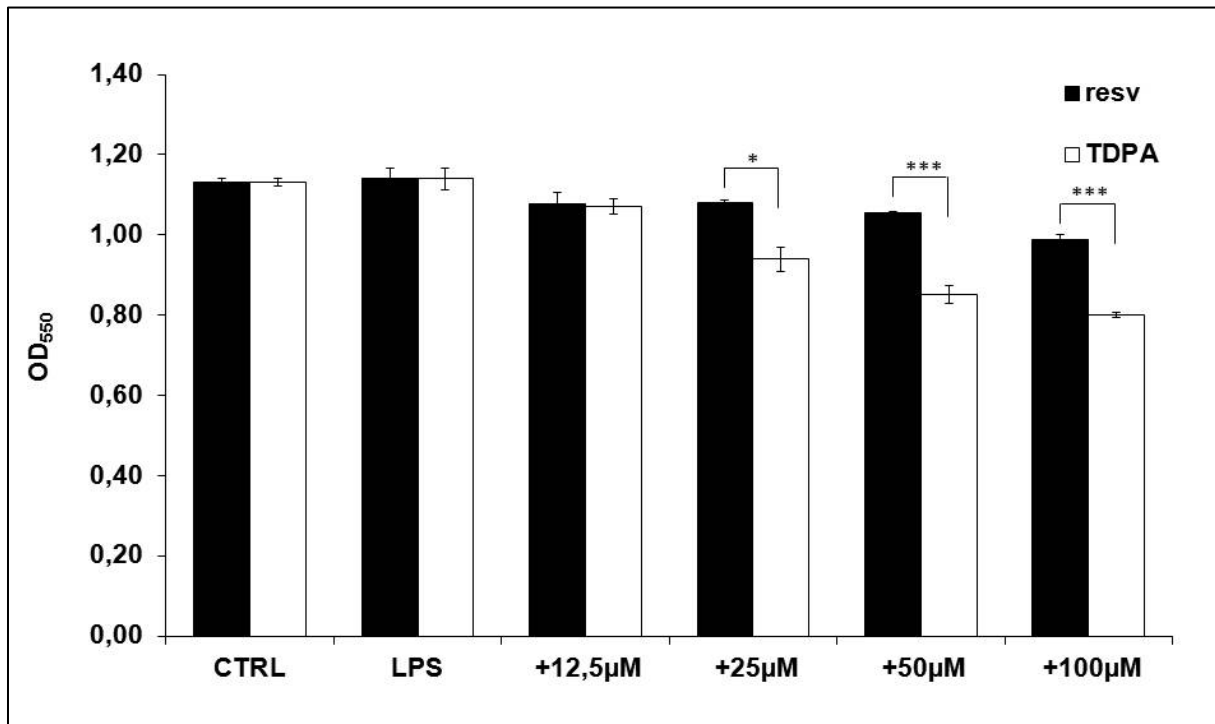
Mivel ismert, hogy a rezveratrol kedvező biológiai hatásainak jelentős része a molekula antioxidáns hatására vezethető vissza, elsőként megvizsgáltuk az analóg gyökfogó kapacitását egy sejtmentes modellben, illetve LPS-sel aktivált RAW 264.7 makrofágokban. Mindkét esetben azt találtuk, hogy a rezveratrol a hármaskötéses analógnál hatékonyabb antioxidánsként működik. Míg 50 μM rezveratrol a 10 μM hidrogén-peroxid és 60 μM Fe^{2+} -EDTA által képzett peroxid gyökök 93 %-át tudta semlegesíteni, a TDPA mindössze 53 %-ot (12/a ábra). A makrofágok LPS hatására megnövekedő ROS termelését mindkét polifenol koncentráció-függő módon csökkentette, de a TDPA hatása itt is jelentősen elmaradt a rezveratrolétól (12/b ábra).



12. ábra: A TDPA rezveratrolhoz viszonyított gyökfogó és antioxidáns kapacitása sejtmentes rendszerben (a), és LPS-sel aktivált RAW 264.7 makrofágokban (b) (a) A 10 μM H_2O_2 és 60 μM EDTA- Fe^{2+} által generált peroxid gyök mennyiségét mértük 0-50 μM rezveratrol vagy TDPA jelenlétében. A feltüntetett értékek három mérés átlagát mutatják, a SEM maximális értéke minden esetben 2 % alatti volt. (b) A polifenolok különböző koncentrációjával (2-50 μM) 1 órán át előkezelt makrofágokat további 24 óráig kezeltük 100 ng/ml LPS-sel. A reaktív oxigén származékok mennyiségét dihidrorodamin 123 fluoreszcens festékkel határoztuk meg. Három, alapvetően megegyező eredményt mutató kísérlet közül egynek az eredményei láthatók, ahol az értékek 6 párhuzamos well-ből származó fluoreszcencia intenzitás átlagát és standard devianciáját jelzik. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2.2. A TDPA a rezveratrolnál jobban csökkenti a sejtek MTT assayben mutatott életképességét.

A rezveratról tudjuk, hogy számos tumoros sejtvonalra fejt ki citotoxikus és szaporodásgátló hatást. Mivel a RAW makrofágok is leukémia eredetű sejtek, a két polifenol esetleges citotoxikus hatását MTT assayvel mértük fel. A 100 ng/ml LPS-sel és a polifenolok emelkedő koncentrációival (12,5-100 μ M) 24 órán át kezelt sejtek MTT-redukáló kapacitása alapján elmondható, hogy az LPS kezelés önmagában nem érinti a sejtek életképességét, a polifenolok közül pedig a TDPA a rezveratrolnál jobban csökkenti a jelenlevő, életképes sejtek számát. Míg 50 μ M rezveratrol 7 %-kal csökkentette az életképességet, ugyanakkora koncentrációjú TDPA 25 %-kal (**13. ábra**).

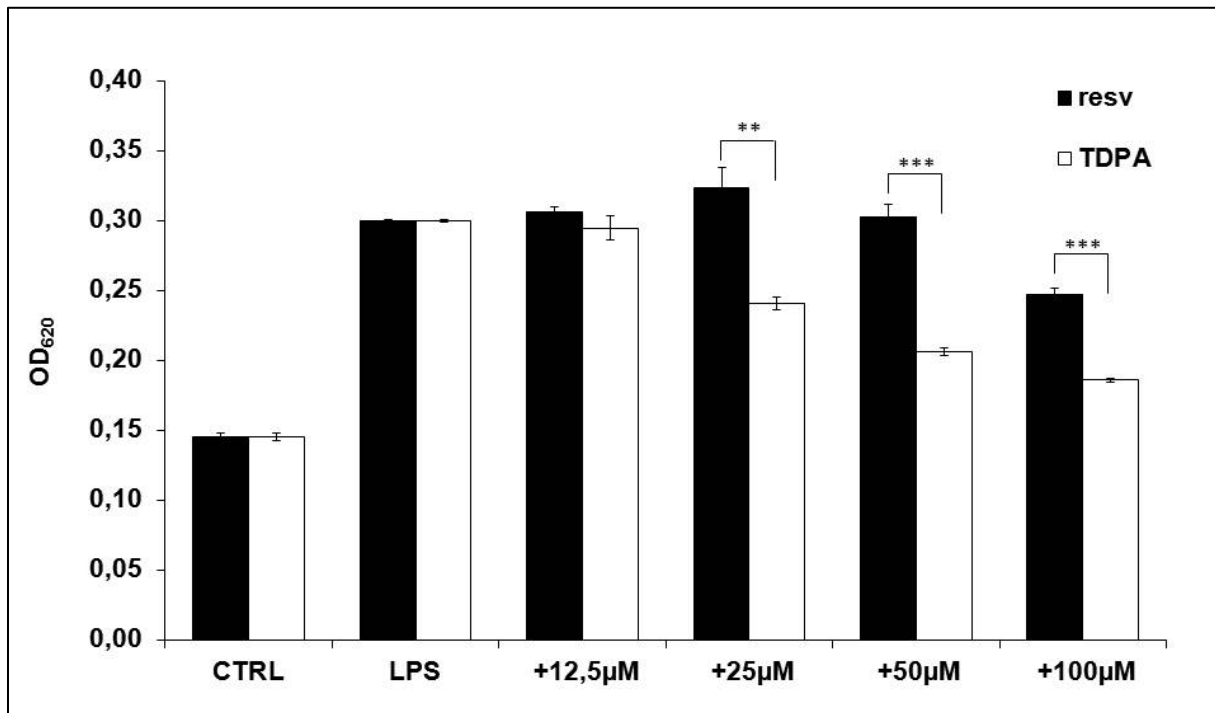


13. ábra: A rezveratrol és a TDPA hatása az életképes sejtek számára A 100 ng/ml LPS mellett 0-100 μ M rezveratrollal vagy TDPA-val kezelt RAW Blue makrofágok életképességét 24 órás kezelés után MTT assayvel határoztuk meg. Négy, alapvetően megegyező eredményt mutató kísérlet közül egynek az eredményei láthatók, ahol az értékek 5 párhuzamos well-ből származó abszorbancia értékek átlagát és standard devianciáját jelzik. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

4.2.3. A TDPA a rezveratrolnál sokkal hatékonyabban gátolja az egyik legfontosabb inflammatorikus transzkripciós faktor, az NF κ B aktiválódását LPS hatására.

A RAW Blue egy olyan, RAW 264.7 makrofágokból genetikai módosítással kifejlesztett sejtvonal, amely az NF κ B transzkripciós aktivitásának pontos és elegáns megbecsülését teszi lehetővé. A kromoszómába épített riporter génről az aktivált NF κ B által reguláltan egy

médiumba szekretált alkalikus foszfatáz enzim íródik át, amelynek mennyisége a megfelelő szubsztrát hozzáadása után fotometriásan mérhető. Ezzel a modellel sok más, NFκB-aktivitást vizsgáló módszerrel szemben (pl. p65 foszforiláció vizsgálata, nukleáris transzlokáció nyomon követése) ténylegesen a jelátviteli folyamat végeredményeként létrejövő, NFκB-regulált fehérje termelődést tesszük láthatóvá.

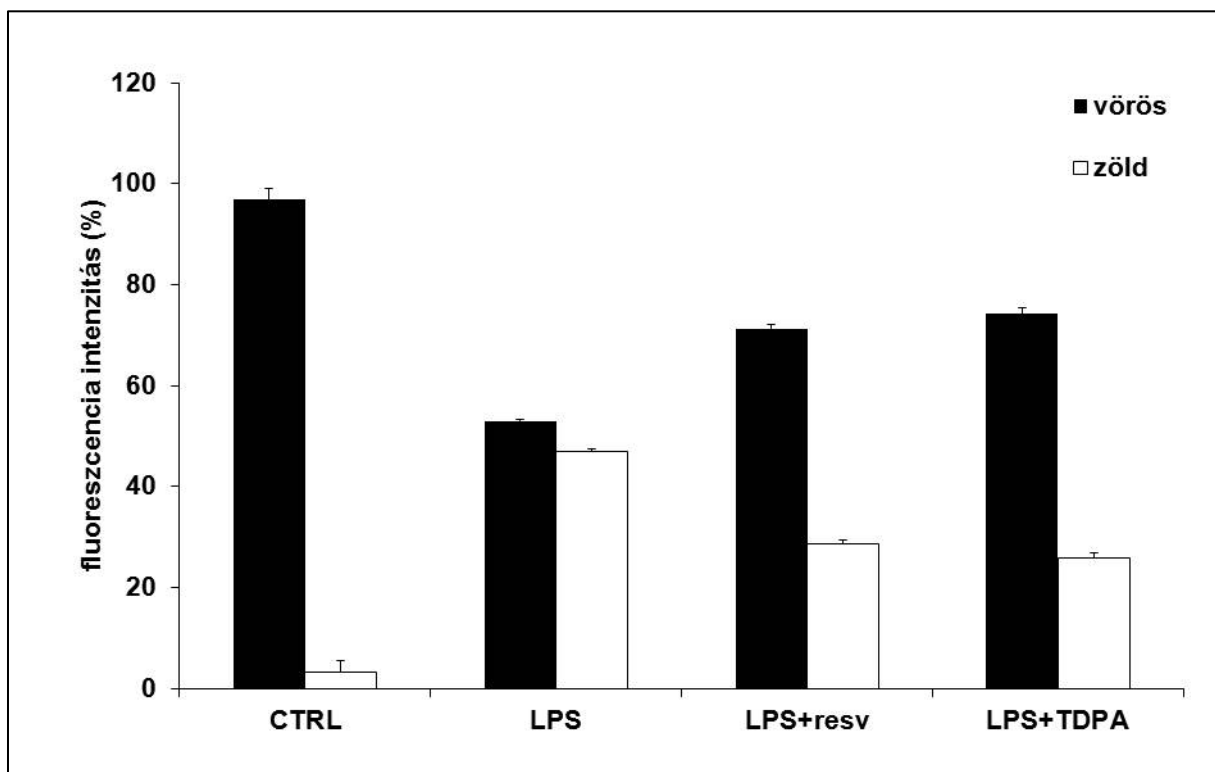


14. ábra: A rezveratrol és a TDPA hatása makrofágok LPS által indukált NFκB aktivációjára A 24 órán keresztül 100 ng/ml LPS-sel és 0-100 µM rezveratrollal vagy TDPA-val kezelt RAW Blue sejtek médiumából Quanti Blue assay-vel határoztuk meg az NFκB aktivitás mértékét. Négy, alapvetően megegyező eredményt mutató kísérlet közül egynek az eredményei láthatók, ahol az értékek 5 párhuzamos well-ből származó abszorbancia értékek átlagát és standard devianciáját jelzik. **p<0,01, ***p<0,001.

A fent leírt MTT assaynál is használt sejtek felülűszóihoz a szubsztrát médium hozzáadását követően azt találtuk, hogy az LPS kezelés hatására nagymértékben fokozódó NFκB aktivitást a TDPA a rezveratrolnál sokkal hatékonyabban tudta csökkenteni (**14. ábra**). Az 50 µM-os polifenol koncentráció mellett kapott értékeket összehasonlítva az látható, hogy míg a rezveratrol nem volt képes szignifikánsan befolyásolni az NFκB aktivációját, a TDPA 31 %-kal csillapította azt. Ez a különbség – bár igen csekély mértékben – már 5 órás kezelés után is észrevehető volt, amikor a kezelt sejtek életképessége még nem mutatott eltéréseket, akár MTT-vel, akár flow citometriás propidium-jodid/annexinV eljárással vizsgálva.

4.2.4. A TDPA és a rezveratrol védi a mitokondrium membránt az LPS-indukált depolarizációtól.

Az LPS általi makrofág aktiváció korai fázisában leírt jelenség a mitokondriumok membránpotenciáljának összeomlása¹⁰¹. Kíváncsiak voltunk rá, hogy vajon a vizsgált polifenoljaink képesek-e ezt a káros hatást csillapítani. 50 μ M rezveratrollal vagy TDPA-val előkezelt makrofágokat 100 ng/ml LPS-sel kezeltünk további 30 percig, majd flow citometriás módszerrel vizsgáltuk a mitokondrium membránpotenciál változásait. Míg az LPS a várt módon kiváltotta a membrán depolarizációját, a rezveratrol és a TDPA egyforma mértékben gátolták a jelenséget (**15. ábra**).

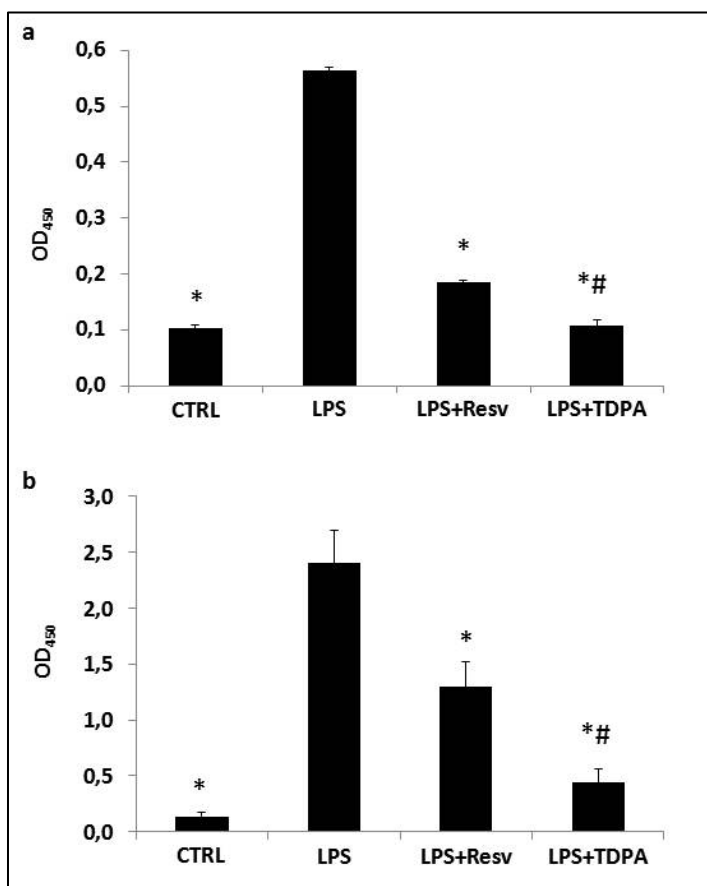


15. ábra: A rezveratrol és a TDPA hatása a mitokondriális membrán LPS által kiváltott depolarizációjára RAW 264.7 makrofágokat 50 μ M rezveratrollal vagy TDPA-val történő, 60 perces előkezelés után további 30 percig kezeltünk LPS-sel, majd JC-1 festést követően flow citometriás eljárással vizsgáltuk a mitokondriális membránpotenciált. A vörös/zöld fluoreszcencia arány csökkenése utal a mitokondriális membrán depolarizációjára. Az ábrán 6 párhuzamos kezelés fluoreszcens értékeinek átlaga, és a hozzájuk tartozó standard deviancia látható.

4.2.5. A TDPA a rezveratrolnál jobban gátolja a makrofágok LPS által indukált citokin termelését.

A makrofágok gyulladási folyamatokban mutatott kritikus szerepének egyik legfontosabb momentuma a pro- és antiinflammatorikus hatású citokinek szekretálása. Jól dokumentált

jelenség a rezveratrol proinflammatorikus citokinek expressziójára kifejtett erős, gátló hatása. Előzetes kísérleteink alapján az LPS által stimulált makrofágok a kezelés hatodik órájában mutatták a legerősebb citokin produkciót, ezért ebben az időpontban mértük meg a 100 ng/ml LPS-sel és 100 μ M polifenollal kezelt RAW Blue sejtek által a médiumba szekretált IL-1, IL-6 és TNF α mennyiségét. Meglepő módon az IL-1 mennyiségében sem LPS, sem a polifenolok hatására nem láttunk változást (az adatokat nem tüntettük fel). Ugyanakkor az LPS az IL-6 termelést a kontroll szint 5-szörösére, a TNF α -ét 17-szeresére fokozta (**16. ábra**). Ezt az erőteljes citokin produkciót a TDPA a rezveratrolnál hatékonyabban volt képes gátolni: az IL-6 szintet a LPS-kezelt csoporthoz képest a TDPA 81 %-kal, a rezveratrol 67 %-kal csökkentette (**16/a ábra**). A TNF α szintet a TDPA 82 %-kal csökkentette, szemben a rezveratrol 46 %-os eredményével (**16/b ábra**). Látható, hogy habár mindkét polifenol képes gátolni az aktivált makrofágok proinflammatorikus citokin termelését, a TDPA ebben a tekintetben kiemelkedő hatékonyságot mutat.

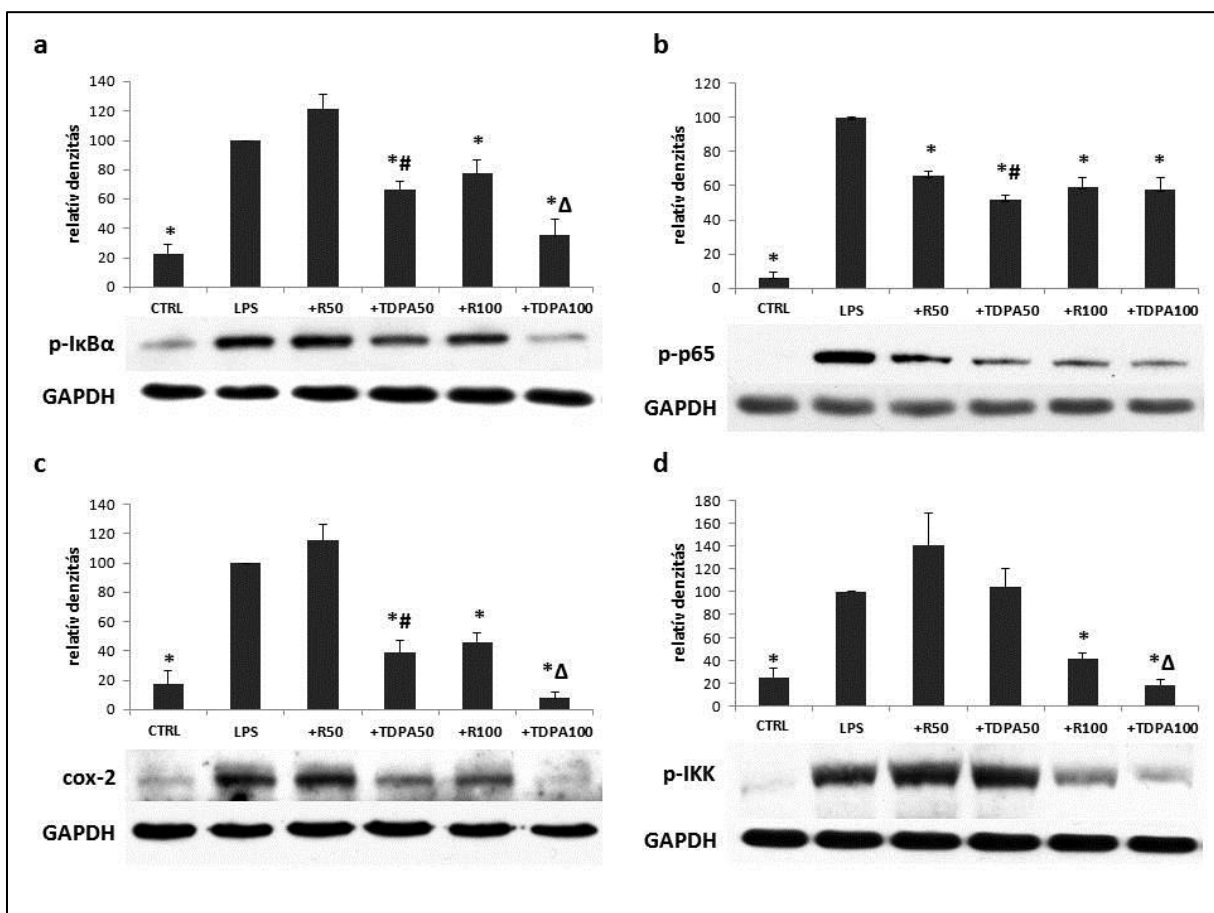


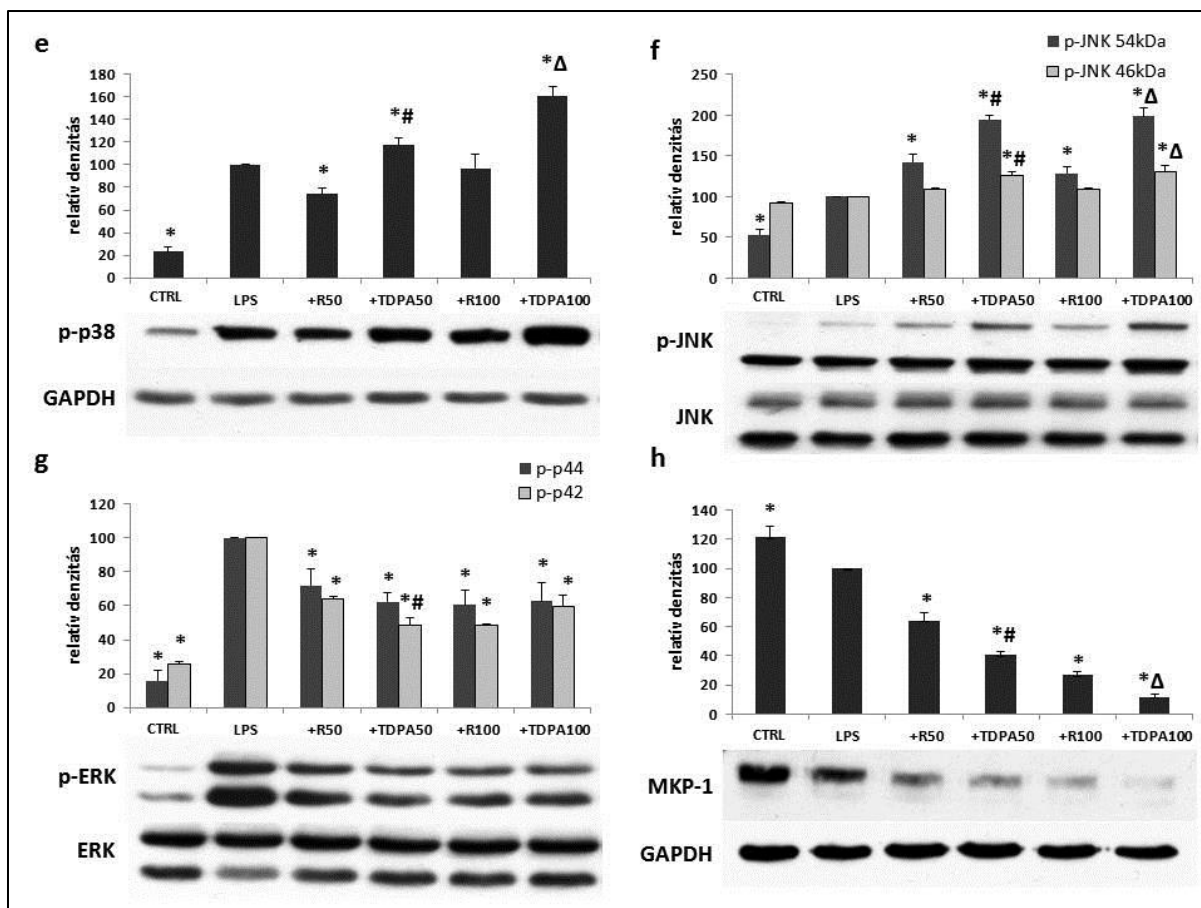
16. ábra: A rezveratrol és a TDPA hatása LPS-sel stimulált makrofágok citokintermelésére

A RAW Blue makrofágokat 6 órán át kezeltük 100 ng/ml LPS-sel és 100 μ M rezveratrollal vagy TDPA-val, majd a médiumukból ELISA kittel határoztuk meg az IL-6 (a) és a TNF α (b) mennyiségét. Az ábrán három független kísérletből kapott eredmények átlagai láthatók. * $p < 0,05$ vs LPS, # $p < 0,05$ vs LPS+Resv.

4.2.6. A TDPA és a rezveratrol eltérő módon befolyásolják az LPS-sel stimulált makrofágok jelátviteli folyamatait.

Azzal a céllal, hogy jobban megértsük a rezveratrol és a TDPA inflammatorikus folyamatokra történő eltérő hatásainak molekuláris hátterét, az LPS-sel és a polifenolokkal kezelt sejtek lizátumaiból western blottal vizsgáltuk a TLR4-NF κ B jelátvitelben résztvevő, legfontosabb jelátviteli fehérjék mennyiségét/aktiváltságának mértékét. Azt találtuk, hogy a rezveratrol és az analógja több ponton is eltérően befolyásolják a szóban forgó szignáltranszdukciós útvonal lépéseit (**17. ábra**). A TDPA a rezveratrolnál jobban gátolta az IKK, I κ B, és az NF κ B p65 alegységének foszforilációját 30 perces LPS kezelés után, valamint a COX-2 mennyiségét 3 órás kezelést követően. Az ERK foszforilációját a két analóg közel egyforma mértékben gátolta, míg meglepetésünkre a TDPA kifejezetten fokozta a p38 és a JNK fehérjék aktivitását. Az MKP-1 mennyiségét 3 óránál mindkét anyag csökkentette, a TDPA a rezveratrolnál nagyobb mértékben.





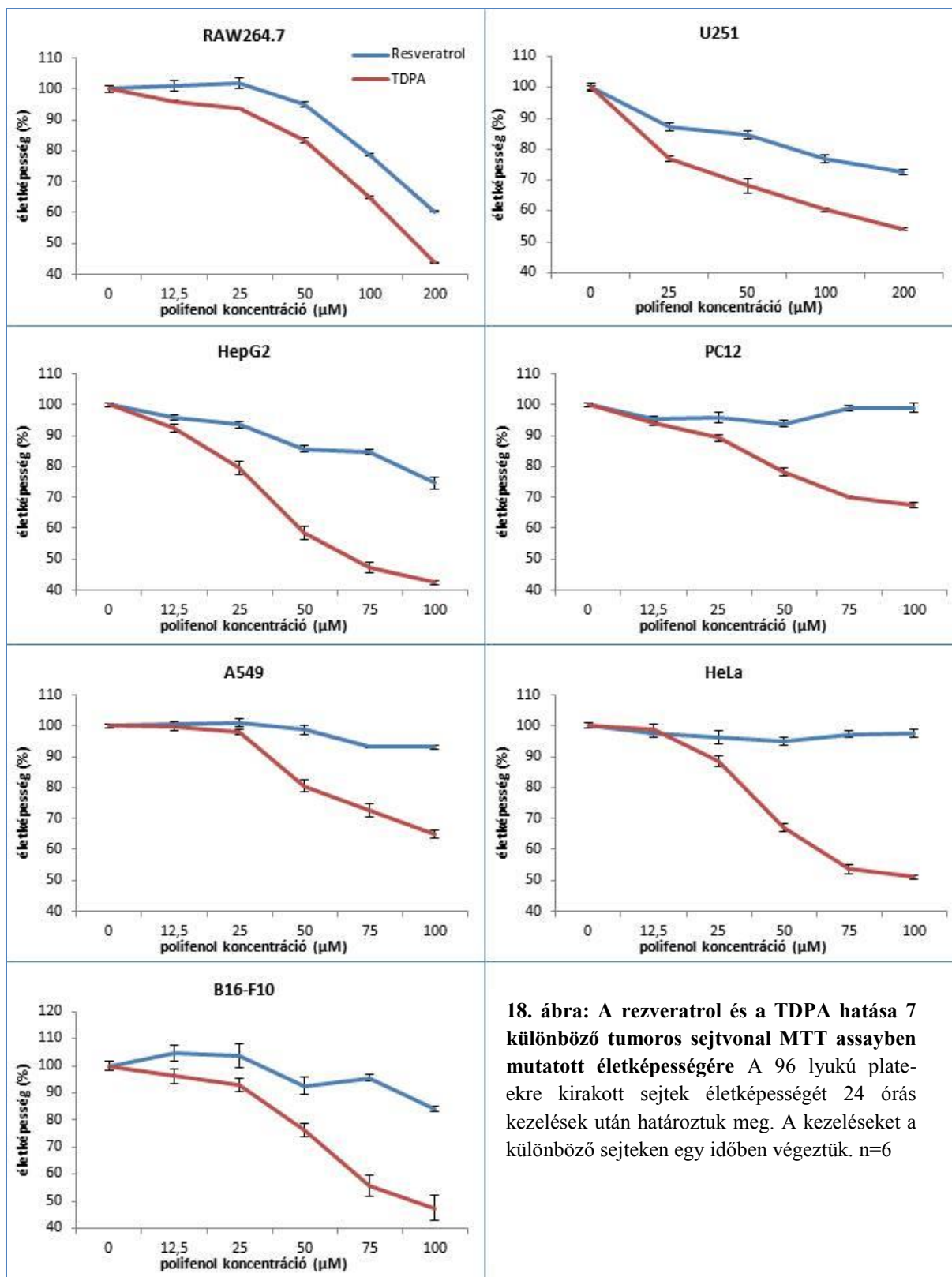
17. ábra: A rezveratrol és a TDPA eltérő hatása a makrofágok LPS által aktivált jelátvitelére

RAW Blue makrofágokat 30 percig kezeltünk 50 ill. 100 μ M rezveratrollal vagy TDPA-val, majd további 30 percig (a;b;d-g) vagy 3 óráig (c;h) 100 ng/ml LPS-sel. A jelátviteli fehérjék mennyiségét és foszforiláltóságának mértékét western blottal vizsgáltuk. Loading kontrollként GAPDH-t, vagy a lemosott nitrocellulóz membránokat újrajelölve az egyes foszforilált fehérjékhez tartozó totál proteinek alkalmaztuk. A blotok kvantifikálását ImageJ szoftverrel végeztük el. Az oszlopdiaagramok 3 ismétlésből kapott relatív pixel denzitások átlagait és SEM értékeit mutatják, alattuk pedig a reprezentatív blotok láthatók. * $p < 0,05$ vs LPS, # $p < 0,05$ vs LPS+R50, $\Delta p < 0,05$ vs LPS+R100.

4.3. A rezveratrol és a TDPA citotoxikus és szaporodásgátló hatása különböző tumoros sejtvonalakon

4.3.1. A TDPA a rezveratrolnál hatékonyabban csökkenti különböző eredetű tumoros sejtek MTT assayben mutatott életképességét.

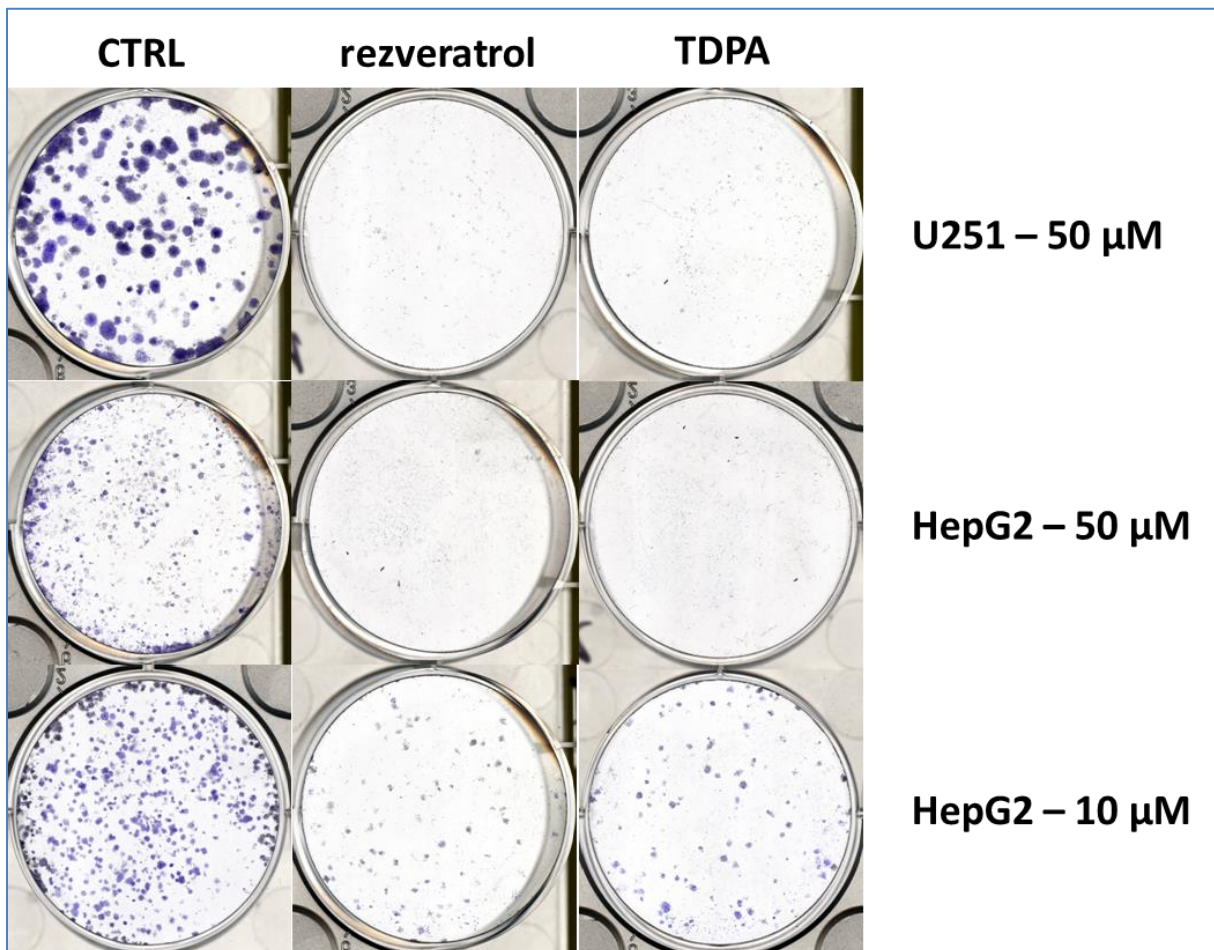
Korábbi megfigyeléseink alapján a TDPA a rezveratrolnál hatékonyabban csökkentette RAW makrofágok életképességét MTT assayvel vizsgálva. Annak eldöntésére, hogy ez a jelenség az adott sejttípusra specifikus, vagy más, tumoros sejtvonalakon is megfigyelhető, 6 további sejtvonalat kezeltünk 24 órán át rezveratrollal vagy TDPA-val, majd az élő sejtek arányát MTT teszttel vizsgáltuk. Az assay az élő sejtek metabolikus aktivitását méri: az MTT festéket az aktív sejtek dehidrogenáz enzimek redukálják, az így keletkezett formazán kristályok mennyisége feloldás után fotometriásan meghatározható. A vizsgálatba bevont sejtvonalak mindegyikéről (RAW 264.7 egér leukémia eredetű makrofág, HepG2: humán hepatocelluláris carcinoma, U251: humán glioblastoma, A549: humán tüdő carcinoma, HeLa: humán cervix carcinoma, PC12: patkány phaeochromocytoma, B16-F10: egér melanoma) elmondható, hogy a TDPA a rezveratrolnál nagyobb mértékben csökkentette az élő sejtek számát (**18. ábra**). A különbség a HeLa sejtek esetén volt a leglátványosabb: míg a rezveratrol az alkalmazott legmagasabb, 100 μM koncentrációban sem befolyásolta számottevően az életképességet, azonos koncentrációjú TDPA azt körülbelül 50 %-kal csökkentette. Mivel az MTT assay önmagában nem alkalmas annak eldöntésére, hogy a megfigyelt sejtszám csökkentő hatás milyen mértékben származik a tumoros sejtek szaporodásának gátoltságából, illetve a sejtek halálából, a polifenolok eltérő hatásainak pontosabb értelmezése céljából további, a toxikus és az antiproliferatív hatásokat felmérő kísérleteket folytattunk.



18. ábra: A rezveratrol és a TDPA hatása 7 különböző tumoros sejtvonal MTT assayben mutatott életképességére A 96 lyukú plate-ekre kirakott sejtek életképességét 24 órás kezelése után határoztuk meg. A kezeléseket a különböző sejteken egy időben végeztük. n=6

4.3.2. A TDPA a rezveratrollal azonos mértékben gátolja U251 és HepG2 sejtek kolónia formációját.

A kolónia formáció tesztben a 6 lyukú plate-ekre nagyon alacsony sűrűségben (500 sejt/well) kirakott sejteket hét napon át kezeltük a polifenolokkal. A kezelés végén a megfestett sejt kolóniák számából és méretéből következtethetünk a sejtek szaporodásának ütemére. Két humán tumoros sejtvonalon (U251 és HepG2) végzett kísérlet alapján azt láttuk, hogy a kontroll csoporthoz képest mindkét polifenol gátolta a sejtek szaporodását (**19. ábra**). 50 μM polifenol hatására alig maradtak szemmel látható kolóniák (mikroszkóp alatt vizsgálva ugyanakkor jelen voltak élő sejtek). A HepG2 sejtvonalon a kísérletet 10 μM -os polifenol koncentrációval megismételve azt találtuk, hogy a rezveratrol és a TDPA kolónia formációt gátló hatásában alapvetően nincs különbség.

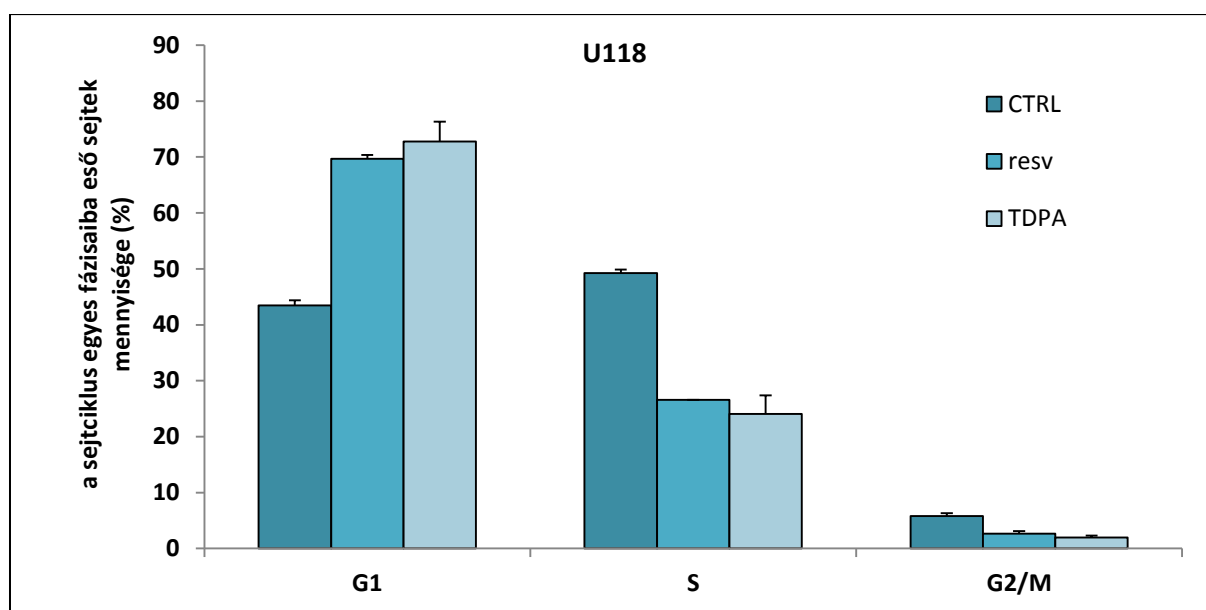


19. ábra: A rezveratrol és a TDPA hatása HepG2 és U251 sejtek kolónia formációjára

A sejteket alacsony sűrűségben (500/well) tettük ki 6 lyukú plate-ekre, majd 7 napon át kezeltük a polifenolokkal (50 ill. 10 μM). A kezelés végén a kolóniákat Coomassie blue festékkel megfestettük.

4.3.3. A TDPA a rezveratrolnál nem hatékonyabb a sejtciklus feltartóztatásában.

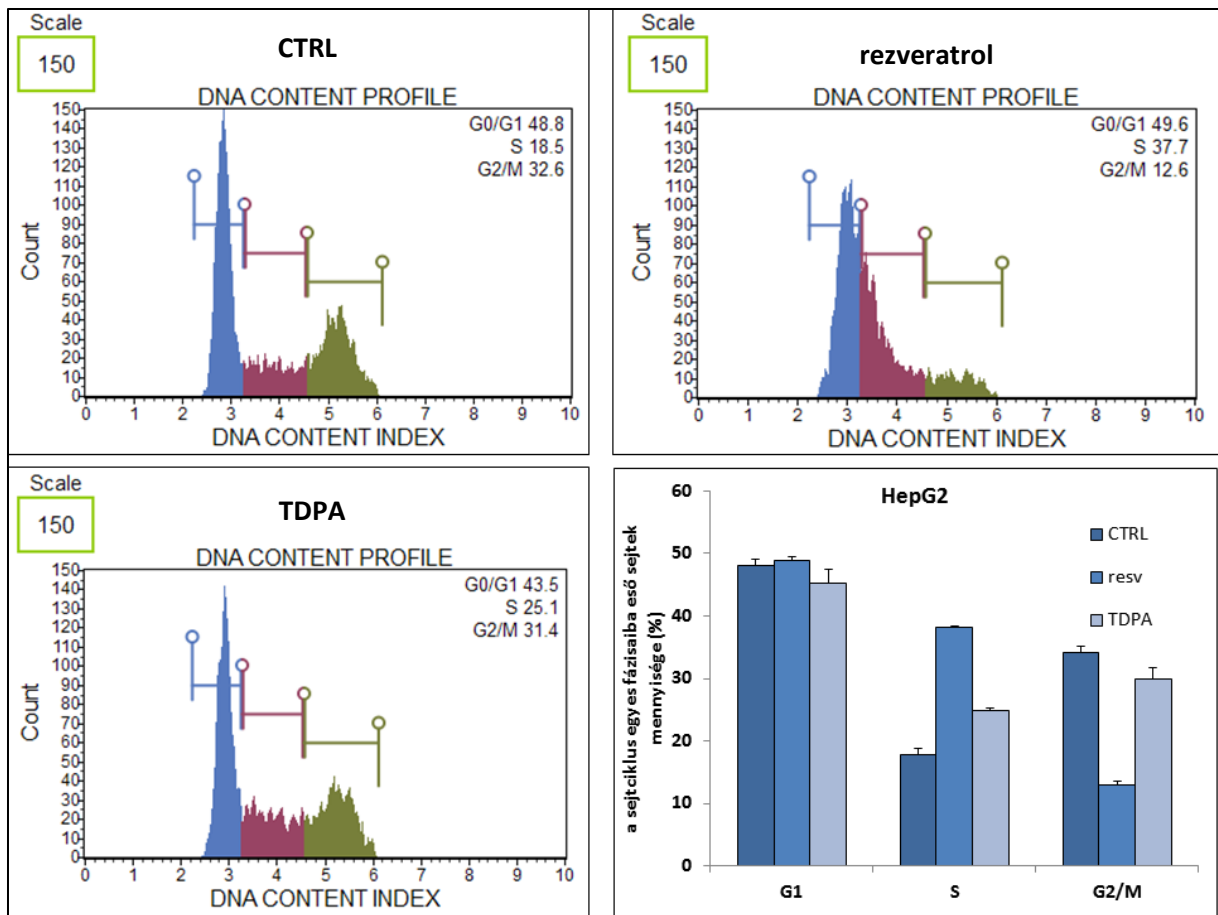
Két humán sejtvonalon (HepG2 és U118) vizsgáltuk a sejtciklus egyes fázisaiba eső sejtek arányát 24 órás polifenol kezelések hatására. A flow citometriás méréssel a sejtek DNS-tartalmának meghatározása alapján tudjuk elkülöníteni a különböző fázisban (G0/G1; S; G2/M) lévő sejteket. Az U118 glioblastoma sejtek esetében mindkét polifenol erősen akadályozta az G1→S átmenetet (**20. ábra**). Ellenben a HepG2 sejteken a rezveratrol és a TDPA sem befolyásolta a G1→S átmenetet, viszont a rezveratrol a TDPA-nál sokkal jobban gátolta az S→G2 fázisok határán történő továbbhaladást (**21. ábra**).



20. ábra: A rezveratrol és a TDPA hatása U118 glioblastoma sejtek sejtciklusára

A 6 lyukú plate-en tenyésztett sejteket 75 μ M rezveratrollal vagy TDPA-val kezeltük 24 óráig, majd a sejtciklus egyes fázisaiba eső sejtek arányát Merck-Millipore Muse citométerrel határoztuk meg. n=3

Látható, hogy a TDPA a két vizsgált sejtvonalon egyikében sem képes a rezveratrolnál hatékonyabban gátolni a sejtek szaporodását. Így az eddigi eredmények alapján arra következtettünk, hogy az MTT tesztben kapott eredményekért a TDPA rezveratrolhoz mérten erősebb citotoxikus hatása lehet a felelős, és a kutatást a sejthalál jellemzőinek vizsgálatával folytattuk tovább.

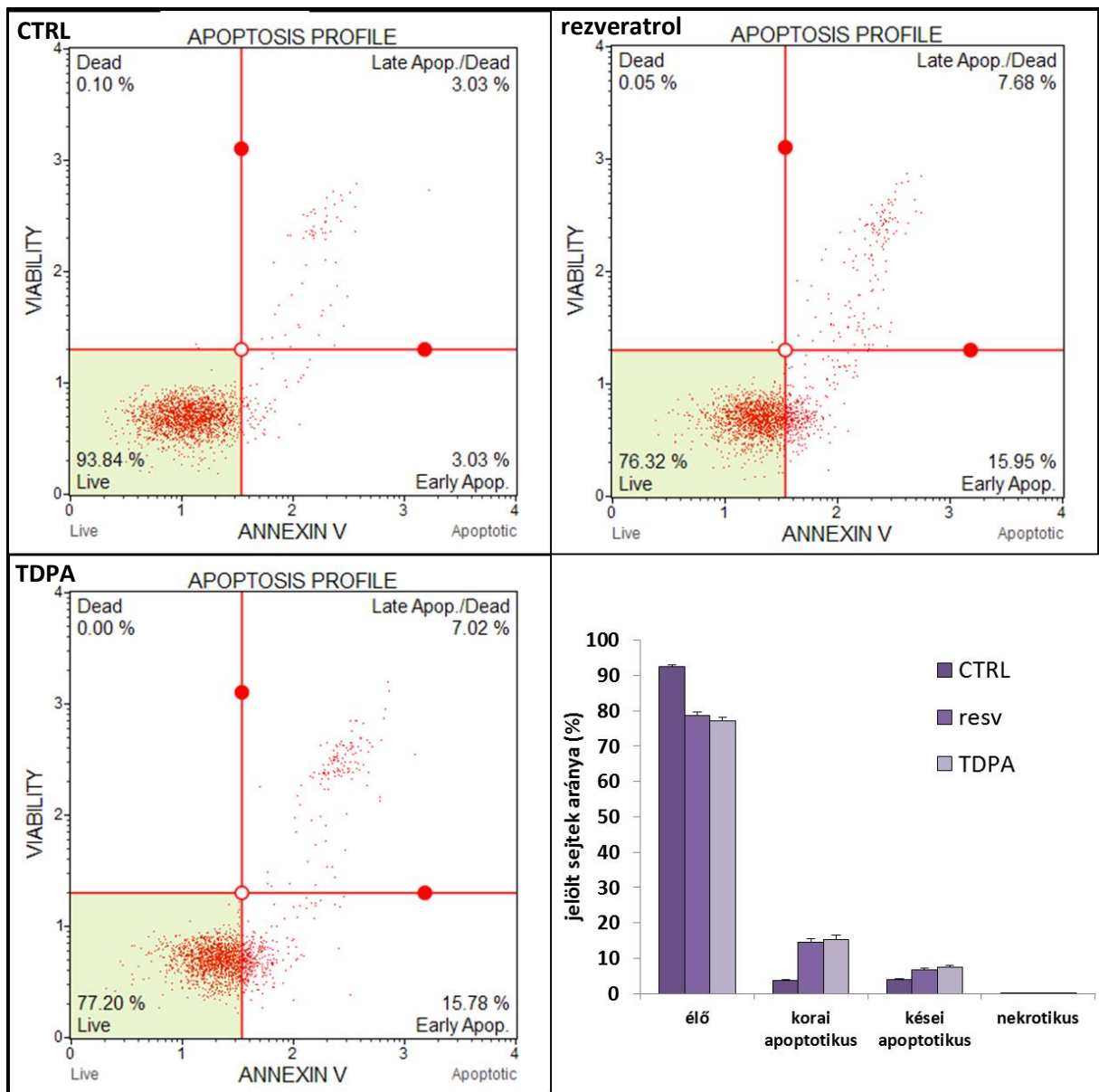


21. ábra: A rezveratrol és a TDPA hatása HepG2 sejtek sejtciklusára

A 6 lyukú plate-en tenyésztett sejteket $75 \mu\text{M}$ rezveratrollal vagy TDPA-val kezeltük 24 óráig, majd a sejtciklus egyes fázisaiba eső sejtek arányát Merck-Millipore Muse citométerrel határoztuk meg. Az oszlopdiagram 3 párhuzamos kezelésből származó átlagokat mutat, a három csoportra jellemző sejtciklus profilokat pedig egy-egy reprezentatív kép szemlélteti.

4.3.4. A rezveratrol és a TDPA azonos mértékben indukálja HepG2 sejtek apoptózisát.

A polifenoljaink által indukált apoptózis és nekrozis mértékének megállapítására annexin V/7-AAD jelölést detektáló flow citometriás módszert alkalmaztunk. Az annexin V az apoptózis során igen korán externalizálódó foszfatidil-szerinekhez kötődik, a 7-AAD pedig a propidium-jodidhoz hasonlóan csak az elhalt sejtekbe képes bejutni. A kettős jelölés kombinációi alapján jól elkülöníthetők az élő (kettős negatív), korai és kései apoptotikus (7-AAD-/annexinV+, illetve kettős pozitív), valamint a nekrotikus (7-AAD+/annexinV-) sejtek populációi. $75 \mu\text{M}$ -os koncentrációban alkalmazva, 24 órás kezelést követően a két polifenol egyformán, mintegy 14 százalékkal csökkentette az élő sejtek mennyiségét, és növelte elsősorban a korai apoptotikus sejtek arányát (**22. ábra**). Nekrozis útján elhalt sejtek gyakorlatilag egyik csoportban sem voltak jelen (az arányuk egy ezreléknél alacsonyabb volt).



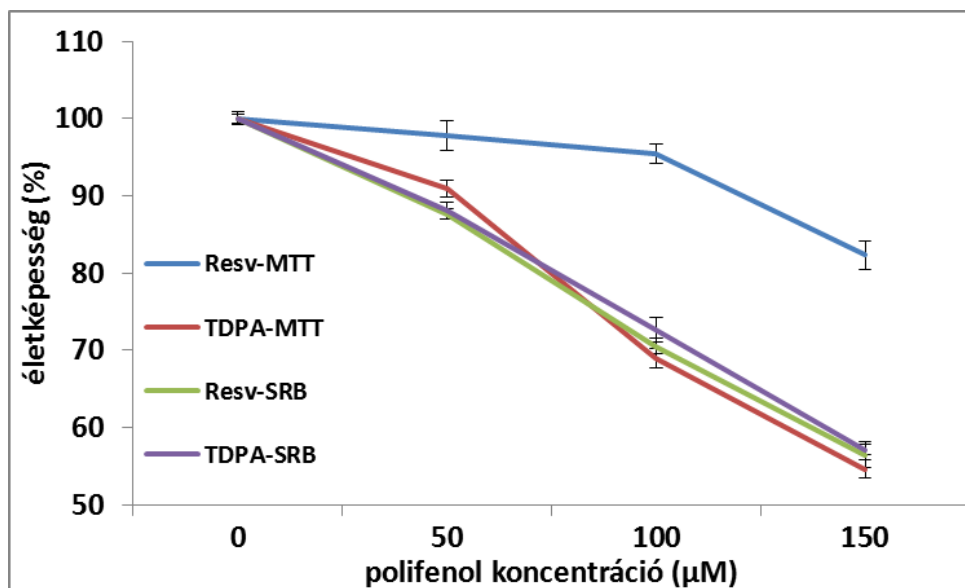
22. ábra: A rezveratrol és a TDPA hatása HepG2 sejtek életképességére

A 6 lyukú plate-en tenyésztett sejteket 75 μ M rezveratrollal vagy TDPA-val kezeltük 24 óráig, majd az élő, az apoptotikus és a nekrotikus sejtek arányát Merck-Millipore Muse citométerrel határoztuk meg. Az oszlopdiagram 3 párhuzamos kezelésből származó átlagokat mutat, a három csoportra jellemző sejtpopulációkat pedig egy-egy reprezentatív kép szemlélteti.

4.3.5. A TDPA és a rezveratrol egyforma mértékben csökkentik a sejtszámot szulforodamin B assay alapján.

A korábbi MTT assayben kapott eredményeket szeretnénk volna megerősíteni egy olyan vizsgálattal, amellyel az MTT-vel azonos kezelési paraméterek mellett (azonos sejtszám, plate típus, kezelési idő és koncentrációk) határozható meg a jelenlévő sejtek mennyisége. Erre egy másik életképesség-mérő módszert, a szulforodamin B assayt választottuk. A szulforodamin

B megfesti a fehérjéket, így mosás és feloldás után az általa adott szín intenzitása arányos a well-ben lévő fehérje mennyiségével. Egy 96 lyukú plate-et két felé osztva kezeltük a HepG2 sejteket a korábbiakhoz hasonló módon, majd 24 óra elteltével a plate egyik felét MTT-vel, a másik felét szulforodamin B-vel festettük meg. Az így kapott életképességi adatokat százalékosan feltüntetve látható, hogy míg az MTT assay a korábbiakkal megegyező módon jelentős eltérést mutat a rezveratrollal illetve TDPA-val kezelt sejtek számában, a szulforodamin B assay alapján a két polifenol teljesen azonos mértékben csökkenti a well-ekben jelenlévő celluláris fehérjék mennyiségét (**23. ábra**). A diagram négy görbéje közül egyértelműen a rezveratrollal kezelt sejtek MTT-görbéje tűnik ki: a másik három görbénél jóval magasabb százalékos életképességi értékeket mutat. A TDPA-hoz tartozó MTT-görbe ellenben gyakorlatilag a TDPA SRB-görbéjével azonos lefutású. A „kezeléseket” ezután az előzőhöz hasonlóan megismételtük, de sejtek nélkül, csak a polifenolok különböző koncentrációjú oldataival, és az MTT/SRB festékekkel. Itt nem találtunk semmilyen eltérést (az adatokat nem tüntettük fel).

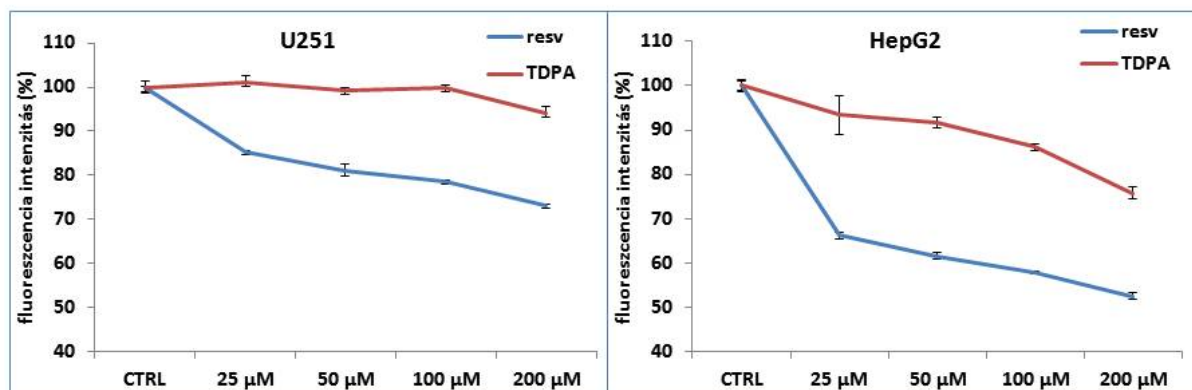


23. ábra: A polifenolok életképességre kifejtett hatásának összehasonlítása MTT és SRB assayvel HepG2 sejteket raktunk ki 96 lyukú plate-re, majd csoportonként 12 well-t megkezelünk a polifenolokkal (0-150 µM). 24 óra elteltével a plate egyik felét MTT, a másik felét SRB assaynek vetettük alá. n=6

4.3.6. A TDPA a rezveratrolnál gyengébb antioxidánsként működik tumoros sejtekben.

Végezetül összehasonlítottuk a rezveratrol és a TDPA antioxidáns hatékonyságát HepG2 és U251 sejtekben. 24 órás kezelések után mindkét sejtvonalon azt találtuk, hogy a vizsgált koncentráció-tartományban (25-200 µM) a rezveratrol a TDPA-nál magasabb antioxidáns aktivitást mutat (**24. ábra**). Érdekes módon a glioblastoma sejtekben a TDPA egyáltalán nem

működött antioxidánsként, a HepG2 sejtekben viszont igen – igaz, a hatása a rezveratrolétól mintegy 30 %-kal elmaradt.



24. ábra: A rezveratrol és a TDPA hatása U251 és HepG2 sejtek ROS mennyiségére

A 96 lyukú plate-re kirakott sejtek ROS termelését 24 órás polifenol kezelést követően dihidrorodamin123 fluoreszcens festékkel határoztuk meg. n=5

5. Az eredmények megvitatása

5.1. A paramágneses rezveratrol analógok antiinflammatorikus hatásának tanulmányozása

A nitrogéntartalmú, paramágneses rezveratrol analógokkal folytatott kutatás során a PTE ÁOK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetében szintetizált 7 új rezveratrol analóg biológiai hatását mértük fel LPS-sel aktivált RAW 264.7 makrofágok inflammatorikus markereire.

Az új molekulák azzal a céllal szintetizálódtak, hogy sikerüljön olyan analógot azonosítani, amely a rezveratrolnál hatékonyabban képes csillapítani valamilyen celluláris inflammatorikus folyamatot. Ebből a célból a rezveratrol egyik vagy mindkettő fenolos gyűrűjét nitroxid gyűrűkre cserélték, vagy a két gyűrű közé egy pirrolin gyűrűt szintetizáltak. Némelyik analóg további módosításként metil- vagy metoxicsoportokat is tartalmaz. A nitroxidok olyan stabil gyökök, melyek a celluláris membránokon könnyedén átjutva, a redox-aktív fémionok oxidálásával megelőzik a szabadgyökképződést, és extra-, valamint intracelluláris SOD-mimetikumokként működnek¹⁰². A nitroxidok redukciójával hidroxilaminok képződnek, amelyek szintén antioxidáns kapacitással bírnak. Több tanulmány szerint egyes kardioprotektív szerek¹⁰³, valamint PARP-inhibitorok¹⁰⁴ szerkezetének nitroxiddal történő kiegészítése fokozza a biológiai hatásukat, ami feltehetőleg a megnövekedett antioxidáns és gyökfogó aktivitásnak tudható be.

A kísérleteink során a makrofágok LPS által kiváltott fokozott ROS termelését mindegyik analóg csökkentette, de hatásában mind a hét elmaradt a rezveratroltól. A leggyengébb teljesítményt a HO4427 és a HO4486 mutatta, a HO4408, HO4409, HO4415 és a HO4450 viszont már 12,5 μM koncentrációban is szemmel láthatóan visszafogta a ROS mennyiséget. Ebből arra következtethetünk, hogy az antioxidáns hatás szempontjából az aromás gyűrűk jelenléte a legelőnyösebb, a hattagú nitroxidok és az izoindolin nitroxid pedig hatékonyabbak, mint a pirrolin nitroxid.

A makrofágok aktivációjának és szabadgyök termelésének további fontos összetevője az iNOS enzim működése következtében termelődő NO, ami gyorsan tovább oxidálódva nitritté alakul, melyet a sejtek médiumából kimutathatunk. A rezveratrol képes a gyulladásozó folyamatok során fellépő NO produkció csillapítására, az analógok közül 5 pedig ebben a tekintetben még hatékonyabbnak mutatkozott. A HO4427 és a HO4486 a ROS termeléshez

hasonlóan a NO szintet is csak kis mértékben csökkentette, a HO4408 és a HO4409 ellenben nagyon erős gátlást mutatott.

Az LPS hatására termelődő TNF α mennyiségét öt analóg volt képes csökkenteni, a hattagú pre-nitroxid és izoindolin-nitroxid tartalmú vegyületek a rezveratrolnál is hatékonyabban.

Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy sikerült olyan új rezveratrol analógokat azonosítanunk, amelyek annak ellenére, hogy a rezveratrolnál gyengébb antioxidánsok, annál nagyobb mértékben képesek csökkenteni az aktivált makrofágok nitrit- és TNF α mennyiségét. A vizsgált biológiai funkciók fokozásában eredményesebb a rezveratrol-szerű molekulák tetrahidropiridinnel vagy izoindolin-nitroxiddal történő módosítása, mint a pirrolin-nitroxid gyűrűk jelenléte.

5.2. A TDPA és a rezveratrol biológiai hatásainak összehasonlítása

Bár a rezveratrol in vivo és in vitro hatásairól temérdek információ látott már napvilágot, még mindig viszonylag keveset tudunk ennek az értékes polifenolnak a kémiai szerkezete és biológiai funkciói közötti összefüggésekről. A természetes és szintetikus rezveratrol analógokkal végzett vizsgálatok segíthetnek felderíteni a polifenolok jótékony élettani hatásai mögött rejlő szerkezeti feltételeket.

A TDPA a rezveratrol hármas kötéses analógja, amely a hidroxilcsoportok számában és pozíciójában nem különbözik az eredeti molekulától, a fenolos gyűrűk közötti kötés minőségében és a molekula térszerkezetében azonban attól eltér. Ezért a TDPA vizsgálatával újabb adatok nyerhetők a molekulaszervezet és a biológiai hatások kapcsolatáról. A TDPA-t kimutatták korábban rezveratrol etanos oldatában, UV sugárzást követően¹⁰⁵. Abból kiindulva, hogy a szőlő epidermisze és a szőlőhéj természetes körülmények között is intenzív UV sugárzásnak van kitéve, feltételeztük, hogy a TDPA kis mennyiségben megtalálható a szőlőben és a borban. Ezt azonban 26 magyar vörösbor tömegspektrometriás vizsgálata alapján nem tudtuk megerősíteni (az adatokat nem tüntettük fel).

5.2.1. A TDPA és a rezveratrol gyulladásgátló hatásának vizsgálata

A rezveratrol talán legjobban bizonyított és legkevésbé magyarázatra szoruló tulajdonsága az antioxidáns hatás, amit számos tanulmány alapján elsősorban a sztilbén vázon található hidroxilcsoportoknak tulajdonítanak. A hidroxilcsoportok számának növelésével a molekula antioxidáns kapacitása akár több ezerszeresére fokozódik⁹³. Emellett értelemszerűen fontos a hidroxilcsoportok elhelyezkedése is: a 4' pozícióban lévő hidroxilcsoport a másik kettőnél nagyobb mértékben járul hozzá az antioxidáns aktivitáshoz⁹¹. A cisz- és a transz-rezveratrol, valamint a dihidro-rezveratrol antioxidáns erőssége közötti különbségekből^{97,106} arra következtethetünk, hogy a két fenolos gyűrű közötti kettős kötés megléte, valamint annak sztereoizomériája szintén befolyásolja a molekula antioxidáns jellegét.

A mi kísérleteink alapján elmondható, hogy a két gyűrű közötti kettős kötés eloxidálása hármas kötéssé ugyancsak mérsékli az antioxidáns kapacitást. A TDPA ugyanis mind sejtmentes rendszerben, mind LPS által aktivált RAW makrofágokban a rezveratrolnál kevésbé csökkentette a reaktív szabadgyökök mennyiségét.

A rezveratrol az antioxidáns tulajdonsága mellett elsősorban az NFκB transzkripciós faktor gátlásán keresztül csillapítja az inflammatorikus folyamatokat¹⁰⁷. Az NFκB gátlás összefüggésben lehet az oxidatív károsodásoktól való védelemmel, hiszen ismert tény, hogy a szabadgyökök NFκB aktivációt indukálnak. Ezzel szemben 75 szubsztituált sztilbén analóg vizsgálata alapján Heynekamp szerint⁹⁵ az NFκB-t hatékonyabban gátló analógok általában a gyengébb antioxidánsok közül kerülnek ki. Erre két magyarázat kínálkozik. Egyrészt bizonyos, hogy a gyökfogó mechanizmuson kívül a polifenolok számos más, jelátviteli fehérjékkel specifikus interakcióra épülő módon is befolyásolják a gyulladást, és ezek eredő hatása az NFκB-re nem jósolható meg egyszerűen az antioxidáns kapacitásból kiindulva. Másrészt alaposabb irodalmazás után az NFκB és a ROS viszonya sem egyértelműen eldönthető. Kimutatták, hogy bár a ROS általában aktiválja az NFκB útvonalat a citoplazmában, a nukleuszban gátolhatja az NFκB transzkripciós működését¹⁰⁸. A ROS továbbá az IKK-ra, az IκB-re és a proteaszómára hatva is gátolhatja az NFκB aktivációját¹⁸. A mi eredményeink illeszkednek a Heynekamp által leírt összefüggésbe, mivel a TDPA, ami a rezveratrolnál gyengébb antioxidáns, hatékonyabban gátolta az NFκB útvonalat LPS-sel indukált makrofágokban. Ennek az útvonalnak az aktiválódása kritikus fontosságú a gyulladást okozó folyamatok iniciálása, terjedése és lefolyása szempontjából. Számos, különböző stimulusra aktiválódó receptor (PRR, TNFR, IL-1R) ligandkötését követően több, párhuzamos útvonalon aktiválódhat az IKK, ami az IκB lebomlásán keresztül az NFκB alegységeinek felszabadulásához és nukleuszba transzlokálásához vezet. A DNS-hez kötődő NFκB alegység dimerek ezután kulcsfontosságú proinflammatorikus gének (COX, iNOS, citokinek) átírását fokozzák¹⁰⁹. Az általunk vizsgált TDPA ezt a folyamatot több ponton is a rezveratrolnál jobban csillapította. A jelátviteli fehérjék foszforilációs mintázata alapján a TDPA kifejezetten erősen gátolta az IKK aktivációt, az IκB és a p65 foszforilációt. Bár ezek fontos lépések az NFκB jelátvitelben, a transzkripciós faktor végső, funkcionális aktivitásának megállapításához szükséges megvizsgálni az általa regulált gének termékeinek mennyiségi változásait. A TDPA ezen a szinten is jól teljesített. Gátolta a gyulladást, fájdalmat és lázat generáló COX-2 enzim szintézisét, valamint két fontos proinflammatorikus citokin, az IL-6 és a TNFα termelését. Ez a gátlás mindhárom esetben a rezveratrolhoz mérten erősebbnek bizonyult. Továbbá egy kifejezetten az NFκB transzkripciós aktivitását láthatóvá tévő celluláris assayben (RAW Blue) is összehasonlítottuk a két molekula hatását, ahol azt találtuk, hogy bár mindkét polifenol koncentrációfüggő módon gátolta az NFκB aktivitást, a TDPA a rezveratrolnál sokkal hatékonyabb volt. Ezek az eredmények meggyőzően bizonyítják, hogy a TDPA egy olyan rezveratrol analóg, amely az eredeti molekulát

meghaladó mértékben képes gátolni makrofágokban az NFκB útvonal LPS által indukált aktiválódását.

Az aktivált makrofágok patogénellenes válaszuk részeként nagy mennyiségű ROS-t termelnek. Ez a ROS azonban a mitokondriális membránpotenciál összeomlásához, és a légzési láncból származó további ROS növekedéshez vezethet¹¹⁰. Dave és mtsai kimutatták, hogy rezveratrollal kivédhető a mitokondriális membrán IL-1-indukált depolarizációja chondrocitákban¹¹¹. Munkacsoportunk korábbi kutatásai bebizonyították, hogy a ferulaldehid megóvjja a mitokondriális membránt az LPS által okozott károsodástól¹⁰¹. A jelen munkánkban kimutattuk, hogy a TDPA és a rezveratrol is csökkenti a makrofágok mitokondriumainak LPS-kezelést követő membrán depolarizációját, ezáltal hozzájárulhatnak a celluláris funkciók védelméhez. A polifenolok pozitív hatását a mitokondriális membránpotenciálra kézenfekvő lenne az antioxidáns hatásukkal magyarázni. A TDPA azonban a rezveratrolnál gyengébb antioxidáns, és mégis azzal megegyező hatékonyságot mutatott a depolarizáció kivédésében. Ebből arra következtethetünk, hogy az antioxidáns sajátság mellett létezik valamilyen más mechanizmus is, ami által a rezveratrol illetve a származékai védik az aktivált makrofágok mitokondriális funkcióit. Ennek a mechanizmusnak a pontos felderítése további kutatásokat igényel.

A MAP kinázok számos más funkciójuk mellett fontos szerepet töltenek be a természetes immunitásban. A MAPK család minden tagjának aktivációját megfigyelték már mintázatfelismerő receptorok ligandkötését követően¹¹². Monocitákban a MEK gátlása U0126-tal számos inflammatorikus marker (IL-1, IL-8, TNFα, PGE2) LPS általi indukcióját csökkentette, ami alapján egyértelmű a MEK-ERK útvonal p38-tól és JNK-től független, gyulladásos jelátvitelben betöltött szerepe¹¹³. Kísérleteinkben a TDPA és a rezveratrol egyaránt gátolta az LPS kezelésre bekövetkező ERK foszforilációt, ami összhangban van a polifenolok jól ismert antiinflammatorikus tulajdonságával. Ezzel szemben a p38 MAPK LPS-indukálta aktivációja csökkent 50 μM rezveratroltól, viszont tovább emelkedett TDPA hatására. Egyik polifenol sem akadályozta meg a JNK foszforilációját, sőt, a TDPA markáns JNK foszforilációt okozott. A p38 és a JNK TDPA általi fokozott aktivitása 24 órás kezelés után is megfigyelhető volt, amikor a MAP kinázok LPS általi aktivációja már lecsengett. Ezek az eredmények első közelítésben szembemennek a TDPA feltételezett antiinflammatorikus hatásával. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy a modellként használt RAW 264.7 egy Abelson egér leukémia vírus által transzformált, immortális sejtvonal. Számtalan publikáció számol be a rezveratrol tumoros sejtekre gyakorolt antiproliferatív,

sejtciklus-reguláló, és apoptózis-indukáló hatásáról^{58,62,114,115}. Az irodalom alapján a polifenolok hatása a MAP kinázokra kettős. Míg a stimulus (pl LPS) által okozott, megnövekedett MAPK aktiváció rezveratrol általi gátlását általában a molekula gyulladásgátló jellegével magyarázzák, addig a tumoros sejtekben megfigyelhető, alapszintű MAPK foszforilációt befolyásoló hatásának antitumor, apoptózis-indukáló jellegét tulajdonítanak¹¹⁶. A rezveratrol az ERK foszforiláció csökkentésével gátolta humán emlő daganatsejtek invázióját¹¹⁷, valamint humán prosztata rák sejtek növekedését¹¹⁸. A p38 rezveratrol általi foszforilációja ugyanakkor apoptózist és sejtciklus feltartóztatást okozott T24 sejtekben¹¹⁹, és szeneszcencia jellegű növekedésgátlást HCT-116 sejtekben¹²⁰. Hasonlóképpen a fokozott JNK aktiváció hozzájárul a JB6 egér epidermális sejtek rezveratrol által kiváltott apoptózisához⁵⁸. Az MTT assayben kapott eredményeink alapján 24 órás kezelés során mindkét polifenol koncentrációfüggő módon csökkenti a sejtszámot, a TDPA a rezveratrolnál nagyobb mértékben. Annak megítélésére, hogy ez elsősorban citotoxicitásból vagy szaporodásgátlásból ered, további vizsgálatok szükségesek. Azt mindenesetre fontos hangsúlyoznunk, hogy a két polifenol inflammatorikus markerekre gyakorolt eltérő hatása nem magyarázható pusztán a sejtszám-csökkentő hatásukban mutatott különbséggel, hiszen az utóbbi csak hosszabb kezeléskor (24 óra), és kisebb mértékben érvényesül. Az NFκB útvonal gátlásában és az inflammatorikus citokinek mennyiségének csökkentésében a TDPA már a korai fázisban (30 perces, ill. 6 órás LPS kezelés) is hatékonyabb a rezveratrolnál. Ezekben az időpontokban a sejthalálnak és a sejtszámcsökkenésnek még semmilyen jele nem volt észrevehető, akár MTT-vel, akár flow citometriás propidium-jodid/annexinV jelöléssel vizsgálva. A MAP kinázok aktivitásának befolyásolása és az MTT eredmények alapján azt feltételezzük, hogy a TDPA által okozott p38 és JNK aktiváció egy, a rezveratrolnál hatékonyabb tumorelles aktivitás része. Ennek igazolására még további kísérleteket végzünk, de a hepatocelluláris karcinoma és glioblastoma sejteken kapott előzetes eredményeink igazolni látszanak a hipotézisünket. Az általunk bemutatott MTT eredmények további kérdéseket is felvethetnek, ugyanis azt mutatják, hogy 24 órás LPS kezelés nem befolyásolja a sejtszámot. Ez meglepő lehet annak fényében, hogy ismert a makrofágok LPS stimulációt követő sejtciklus-blokkja¹²¹. Ugyanakkor azt feltételezzük, hogy a makrofág aktivációval járó fokozott celluláris metabolizmus, és az ezzel együtt járó megnövekedett MTT-redukáló kapacitás^{122,123} ellensúlyozhatja a sejtek szaporodásának gátlása következtében fellépő sejtszámcsökkenést.

A TDPA antiinflammatorikus hatását vizsgáló kutatásunk eredményeit összefoglalva elmondható, hogy sikerült egy olyan, újonnan szintetizált rezveratrol analógot azonosítanunk, ami az eredeti molekulánál gyengébb antioxidáns, ugyanakkor hatékonyabban gátolja makrofág sejtekben az LPS-stimulációt követő NF κ B aktivációt, valamint a COX-2, a TNF α és az IL-6 produkciót. A TDPA emelett védi a mitokondriális membránt az LPS által okozott depolarizációtól, csökkenti az aktivált makrofágokban az ERK aktivációt, ezzel szemben fokozza a p38 és a JNK MAP kinázok foszforilációját. Figyelembe véve, hogy a TDPA a rezveratroltól mindössze egyetlen kémiai kötés tekintetében különbözik, a két polifenol biológiai hatásaiban feltárt különbségek a rezveratrol eddig megismert szerkezet-funkció összefüggésével kapcsolatos tudást is kiegészítik.

5.2.1. A TDPA és a rezveratrol citotoxikus és szaporodásgátló hatásának vizsgálata

A rezveratrol pozitív élettani hatásait tagláló publikációk között a gyulladásgátló tulajdonságait leírók mellett nagy számban találunk olyanokat, melyek igen változatos mechanizmusok alapján a polifenolnak tumorellenes aktivitást tulajdonítanak (lásd **1. táblázat**). Ennek a felismerésnek a nyomán indult meg az eredeti molekulánál hatékonyabb rezveratrol származékok keresése, amelynek eredményeként mára számos ilyen analógot azonosítottak.

Az új rezveratrol analógjaink antiinflammatorikus hatását vizsgáló kutatásaink során azt tapasztaltuk, hogy a TDPA a rezveratrolnál nagyobb mértékben csökkenti az élő sejtek számát 24 órás kezelés során. Ezt az eredményt a polifenolok hatását összehasonlító MTT-assayben kaptuk, ami az intézetünkben és világszerte is egy rutinszerűen alkalmazott vizsgálati módszer a különböző farmakológiai hatóanyagok citotoxikus hatékonyságának meghatározására. Mivel mi 24 órás kezelést követően végeztük el a tesztet, azaz olyan időtartam után, ami körülbelül megegyezik a RAW makrofágok generációs idejével, ezért pusztán az MTT eredmények alapján nem volt egyértelműen megállapítható, hogy a csökkent sejtszám milyen mértékben származik a vegyületeink citotoxikus, illetve szaporodásgátló aktivitásából. A rezveratrolról mind a két aktivitás jól ismert: számos sejttípuson bizonyították már a sejtciklust blokkoló^{45,66,68,74}, valamint a sejthalált indukáló^{45,47,53,55,65} hatását. Míg a rezveratrol által okozott sejthalál egyes tanulmányok szerint tisztán apoptózis jellegű, mások szerint apoptotikus és nekrotikus vonásokat egyaránt mutat¹²⁴. Hasonlóképpen ellentmondásosak a citotoxikus hatás specificitásáról szóló információk: sok szerző állítja azt, hogy ez a hatás csak a tumoros sejteken figyelhető meg^{49,53,125}, ellenben Ferry-Dumazet és

munkatársai tanulmánya¹²⁶ alapján normális és tumoros sejteken egyaránt jelentkezik. Ezeknek a kérdéseknek a tisztázása rendkívül fontos, hiszen egy potenciális rákellenes szerrel szemben alapvető követelmény, hogy a tumoros sejtekre minél nagyobb szelektivitással, jól körülhatárolható és szabályozott mechanizmussal fejtsen ki toxikus hatást. Ellenkező esetben elkerülhetetlen a normális szövetek károsodása, és az ezzel járó terápiás mellékhatások. A kutatás következő fázisában ezért célul tűztük ki annak eldöntését, hogy a rezveratrol és a TDPA eltérő sejtszámcsökkenő hatása mögött inkább a toxikus, vagy az antiproliferatív tulajdonságaik különbsége áll. Ezt követően terveztük meghatározni a két vegyület által kiváltott sejthalál típusát, majd végezetül a hatás tumoros, illetve primer sejteken mutatkozó esetleges eltérését.

Először is az addig csak makrofágokon elvégzett MTT-assayt kiterjesztettük 6 további tumoros sejtvonalra. A vizsgálatba bevont sejtvonalak mindegyikéről (RAW, HepG2, U251, A549, HeLa, PC12, B16-F10) elmondható, hogy 24 óra alatt a TDPA a rezveratrolnál nagyobb mértékben csökkentette az élő sejtek számát. Ez meggyőzött minket arról, hogy a rezveratrol és a hármaskötéses analóg eltérő hatása nem a RAW 264.7 makrofág vonalra specifikus, hanem tumoros sejteken általánosan megfigyelhető.

Következő lépésben a polifenolok szaporodásgátló hatását vizsgáltuk meg két különböző megközelítéssel. A 7 napos kezelés hatását vizsgáló kolónia formáció tesztben és a 24 órás kezelést követő flow citometriás sejtciklus analízisben egyaránt azt láttuk, hogy bár mindkét polifenol lassítja a májkarcinoma és glioblastoma sejtek szaporodását, a TDPA a rezveratrolnál nem mutat nagyobb hatékonyságot. Ezek alapján azt feltételeztük, hogy az MTT assaykben kapott eredmények a TDPA rezveratrolénál erősebb citotoxikus hatásával magyarázhatók. Ezt azonban nem támasztották alá a 7-AAD/annexinV jelölésen alapuló flow citometriás méréseink, amelyek alapján a két vegyület egyforma mértékben csökkenti az élő sejtek mennyiségét, és megnöveli a korai apoptotikus sejtek arányát, miközben az alkalmazott koncentrációban és kezelési idő mellett nekrotikus sejthalált nem okoznak.

A kutatásnak ezen a pontján látszólagos ellentmondáshoz érkeztünk: míg az MTT assay alapján kifejezetten nagy különbség mutatkozott a rezveratrol és a TDPA sejtszámcsökkentő hatásában, addig a másik három módszer eredményeiből az következett, hogy a két polifenol hatása a citotoxicitás és a szaporodásgátlás terén is közelítőleg egyforma. Mivel ismert jelenség, hogy bizonyos stimulusokra a sejtek eltérően reagálhatnak különböző kezelési körülmények (plate típus, sejtsűrűség, médium térfogat) között, egy olyan módszert kerestünk, amellyel

mege erősíthetők az MTT assay eredményei, az MTT-vel azonos kísérleti felállásban. A választásunk egy másik életképesség-tesztre, a szulfurodamin B (SRB) assayre esett. Az MTT és a SRB assayt egy adott plate-en, azonos időben és módon kezelt sejtekkel elvégezve feloldódott a korábbi ellentmondás. A SRB teszt ugyanis a többi vizsgálati eredménnyel összhangban azt mutatta, hogy a TDPA és a rezveratrol sejtszámcsökkentő hatásában nincs különbség. A TDPA esetében az MTT és a SRB azonos lefutású koncentráció-függő sejtszámcsökkentő hatást mutatott, és ezekkel megegyezett a rezveratrol SRB-görbéje. Az SRB görbék alapján és a flow citométeres apoptózis assayből kapott életképességi értékek körülbelül egyformák. Egyedül a rezveratrolhoz tartozó MTT görbe adott a másik háromtól nagyban eltérő eredményt, a rezveratrolnak egy relatíve alacsony sejtszámcsökkentő hatást jelezve.

A két módszer eltérő eredményeinek értelmezése céljából fontos tudni, hogy pontosan melyik min alapul. A SRB festék a celluláris proteinekhez kötődik, így egyaránt megfesti az élő, metabolikusan aktív és az elpusztult sejteket. A kísérlet során ügyeltünk rá, hogy a festés előtt a médium leszívásával és PBS-sel való mosással az elhalt sejtek jelentős részét eltávolítsuk, így elmondható, hogy a SRB assayvel a jelenlévő élő sejtek mennyiségét határoztuk meg az összfehérje mennyiség alapján. Az MTT festék ezzel szemben a leírása szerint egy olyan tetrazólium származék, amely a celluláris dehidrogenáz enzimek működése következtében redukálódva oldhatatlan kristályokká alakul. Az oldott MTT eltávolítása és a keletkezett formazán kristályok visszaoldása után az életképes sejtek számával arányos színintenzitást kapunk, ami fotometriásan mérhető. Fontos hangsúlyozni, hogy ez egy metabolikus assay, ezért az olyan kezelések hatásáról, amelyek megváltoztatják a sejtek katabolikus/anabolikus anyagcserefolyamatait, az életképesség tekintetében félrevezető eredményeket adhat. Az egyedi sejtek által termelt formazán mennyisége függhet továbbá a sejtek denzitásától, a szaporodásuk ütemétől, és a pH-tól¹²⁷. A módszer évtizedekre visszanyúló és nagyon elterjedt használata ellenére nem tisztázott az MTT redukciójának celluláris mechanizmusa. A legtöbb forrás szerint mitokondriális¹²⁸ dehidrogenázok redukálják (elsősorban a szukcinát-dehidrogenáz), mások szerint az endoplazmás retikulum NAD^+ - vagy NADP^+ -dependens enzimeit, illetve a glikolitikus eredetű NADH ¹²⁹. Bizonyították emellett a szuperoxid¹³⁰ MTT-redukáló aktivitását is, aminek fényében megkérdőjelezhető a módszer pontossága olyan kezelések mellett, amik szabadgyökös reakciókat indítanak el a sejtekben. A kísérleteinkben a rezveratrolos kezelések esetében az MTT assay a valósnál magasabb sejtszámot jelezett. Továbbá a jó antioxidáns hatékonysággal bíró rezveratrollal kezelt sejtek a gyengébb

antioxidáns TDPA-val kezeltéknél nagyobb MTT-redukáló aktivitást mutattak, aminek kapcsán felmerülhet, hogy a rezveratrol esetleg közvetlenül redukálja az MTT-t. Ennek azonban ellentmond az, hogy sejtmertes rendszerben a rezveratrol nem okozott mérhető formazánképződést. Mindezek alapján azt gondoljuk, hogy a rezveratrol jó antioxidáns jellegének köszönhetően megváltoztatja a sejtek oxidatív állapotát olyan módon, hogy azoknak fokozódik az MTT-redukáló kapacitása. A rezveratrolnál gyengébb antioxidánsként működő TDPA esetén ez a jelenség nem figyelhető meg, a TDPA-kezelésekhez tartozó MTT- és SRB görbék ezért azonos lefutást mutatnak. Hasonló jelenségről számolnak be Wang és mtsai¹²⁸, akik azt találták, hogy prosztata- és emlőrák sejtekkel végzett kísérletekben az MTT assay az ATP vagy DNS tartalmat mérő, valamint a tripán blue assaykhez képest körülbelül kétszeresen alulbecsülte az epigallokatekin-gallát antiproliferatív aktivitását.

A rezveratrol rákos sejtek életképességére kifejtett hatását a publikációk nagy részében MTT assayvel határozzák meg. Az eredményeink azonban arra hívják fel a figyelmet, hogy a rezveratrol (és feltehetően számos más antioxidáns vegyület) tulajdonságát vizsgáló kutatásokban a citotoxicitás és az antiproliferatív hatás felmérésére az MTT assay komoly fenntartásokkal alkalmazható. Az ilyen esetekben az MTT assay kiváltására számos más, életképesség-mérő módszer választható, amelyek közül mi a SRB assayt alkalmasnak találtuk a polifenolok sejt számcsökkentő hatásának meghatározására.

Az eredmények alapos értékelése után kijelenthető, hogy a TDPA a rezveratrollal megegyező mértékben indukálja tumoros sejtek apoptózisát, továbbá a rezveratrolnál nem hatékonyabb a sejtciklus feltartóztatásában. A kutatás során tapasztalt látszólagos ellentmondások pedig megmutatták, mennyire fontos, hogy tisztában legyünk az alkalmazott kísérleti módszerek működésének hátterével, és hogy a kapott eredményeket kritikusán szemléljük.

Ezek az eredményeink szükségszerűen módosítják a TDPA antiinflammatorikus hatását vizsgáló kutatásunk eredményeinek értelmezését is. Egyfelől további vizsgálatokat tesznek szükségessé annak eldöntésére, hogy a TDPA miért fokozza a p38 és JNK MAP kinázok aktivációját. Másrészt annak ismeretében, hogy a TDPA egyáltalán nem pusztítja jobban a sejteket, mint a rezveratrol, még szembetűnőbb a két vegyület NFκB-gátló hatása közötti különbség.

6. Összefoglalás

Munkám során egy jól ismert, gyümölcsökben és vörösborban előforduló polifenol, a rezveratrol szintetikus analógjainak hatását vizsgáltam tumoros sejtvonalakon és LPS által aktivált makrofág sejteken. A kutatás első fázisában nitrogéntartalmú, paramágneses molekulák, a második fázisban pedig egy hármas-kötéses rezveratrol származék vizsgálatára került sor. A kísérletek során több analógról bizonyosodott be, hogy az eredeti molekulánál hatékonyabban képes a makrofágok gyulladás során történő aktivációjának csillapítására. Ezek a vegyületek és az általuk nyert, a rezveratrol szerkezet-funkció összefüggésére vonatkozó adatok értékes információkat nyújthatnak új, a polifenolok multi-target jellegét kiaknázó gyógyszerfejlesztések számára.

Kimutattam továbbá, hogy az MTT assay a rezveratrol hatását vizsgáló kutatásokban csak korlátozottan használható, helyette a SRB assayt találtam alkalmasnak a polifenol által okozott sejtszámcsökkentő hatás meghatározására. Figyelembe véve, hogy az in vitro tesztekben máig az MTT assay az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a rezveratrol toxicitásának meghatározására, ez az eredmény nagyban befolyásolja a polifenol hatását taglaló közlemények eredményeinek értelmezését, valamint a jövőben végzendő kísérleteink kivitelezését.

7. Hivatkozások listája

1. Medzhitov R (2010) *Inflammation 2010: New adventures of an old flame*. Cell 140:771-6.
2. Jin S, Li Y, Pan R, Zou X (2014) *Characterizing and controlling the inflammatory network during influenza A virus infection*. Sci Rep 4:3799.
3. Medzhitov R (2008) *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature 454:428-35.
4. Serhan CN, Savill J (2005) *Resolution of inflammation: the beginning programs the end*. Nat Immunol 6:1191-7.
5. Matsuura M (2013) *Structural modifications of bacterial lipopolysaccharide that facilitate gram-negative bacteria evasion of host innate immunity*. Front Immunol 4:109.
6. Park BS, Lee JO (2013) *Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes*. Exp Mol Med 45:e66.
7. Moran AP, Prendergast MM, Appelmeik BJ (1996) *Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease*. FEMS Immunol Med Microbiol 16:105-15.
8. Miyake K (2004) *Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2*. Trends Microbiol 12:186-92.
9. Gyorfy Z, Duda E, Vizler C (2013) *Interactions between LPS moieties and macrophage pattern recognition receptors*. Vet Immunol Immunopathol. 152:28-36.
10. Kawai T, Akira S (2010) *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol 11:373-84.
11. Kawai T, Akira S (2011) *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. Immunity 34:637-50.
12. Lamothe B, Besse A, Campos AD, Webster WK, Wu H, Darnay BG (2006) *Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I κ B kinase activation*. J Biol Chem 282:4102-12.
13. Trinchieri G (2010) *Type I interferon: friend or foe?* J Exp Med 207:2053-63.
14. Baldrige CW, Gerard GW (1933) *The extra respiration of phagocytosis*. Am J Physiol 103:235-236.

15. Rossi F, Zatti M (1964) *Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells.* Experientia 20:21-3.
16. Genestra M (2007) *Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants.* Cell Signal 19:1807-19.
17. Huang J, Canadien V, Lam GY, Steinberg BE, Dinauer MC, Magalhaes MA, Glogauer M, Grinstein S, Brumell JH (2009) *Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases.* Proc Natl Acad Sci 106:6226-31.
18. Morgan MJ, Liu ZG (2011) *Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling.* Cell Res 21:103-15.
19. Maitra U, Singh N, Gan L, Ringwood L, Li L (2009) *IRAK-1 contributes to lipopolysaccharide-induced reactive oxygen species generation in macrophages by inducing NOX-1 transcription and Rac1 activation and suppressing the expression of antioxidative enzymes.* J Biol Chem 284:35403-35411.
20. West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Walsh MC, Choi Y, Shadel GS, Ghosh S (2011) *TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS.* Nature 472:476-80.
21. Kitamura A, Sasaki Y, Abe T, Kano H, Yasutomo K (2014) *An inherited mutation in NLRP4 causes autoinflammation in human and mice.* J Exp Med 211:2385-96.
22. Cooks T, Pateras IS, Tarcic O, Solomon H, Schetter AJ, Wilder S, Lozano G, Pikarsky E, Forsheo T, Rosenfeld N, Harpaz N, Itzkowitz S, Harris CC, Rotter V, Gorgoulis VG, Oren M (2013) *Mutant p53 prolongs NF- κ B activation and promotes chronic inflammation and inflammation-associated colorectal cancer.* Cancer Cell 23:634-46.
23. Jeremiah N, Neven B, Gentili M, Callebaut I, Maschalidi S, Stolzenberg MC, Goudin N, Frémond ML, Nitschke P, Molina TJ, Blanche S, Picard C, Rice GI, Crow YJ, Manel N, Fischer A, Bader-Meunier B, Rieux-Laucat F (2014) *Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations.* J Clin Invest 124:5516-20.
24. Vogel SN, Awomoyi AA, Rallabhandi P, Medvedev AE (2005) *Mutations in TLR4 signaling that lead to increased susceptibility to infection in humans: an overview.* J Endotoxin Res 11:333-9.
25. Branger J, Florquin S, Knapp S, Leemans JC, Pater JM, Speelman P, Golenbock DT, van der Poll T (2004) *LPS-binding protein-deficient mice have an impaired defense against Gram-negative but not Gram-positive pneumonia.* Int Immunol 16:1605-11.

26. Okin D, Medzhitov R (2012) *Evolution of inflammatory diseases*. *Curr Biol* 22:R733-40.
27. Pandey KB, Rizvi SI (2009) *Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease*. *Oxid Med Cell Longev* 2:270-8.
28. Veres B (2012) *Anti-Inflammatory Role of Natural Polyphenols and Their Degradation Products*, chapter 18 in "Severe Sepsis and Septic Shock - Understanding a Serious Killer", book edited by Ricardo Fernandez, ISBN 978-953-307-950-9.
29. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2005) *Dietary polyphenols and the prevention of diseases*. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45:287-306.
30. Koeberle A, Werz O (2014) *Multi-target approach for natural products in inflammation*. *Drug Discov Today* 19:1871-82.
31. Csermely P, Agoston V, Pongor S (2005) *The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design*. *Trends Pharmacol Sci* 26:178-82.
32. Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IM, Chin D, Wagner AE, Rimbach G (2012) *Curcumin-from molecule to biological function*. *Angew Chem Int Ed Engl* 51:5308-32.
33. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T (2008) *Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?* *Mutat Res* 658:68-94.
34. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM (1997) *Wine as a biological fluid: history, production and role in disease prevention*. *J Clin Lab Anal* 11:287-313.
35. Simonetti P, Pietta P, Testolin P (1997) *Polyphenol Content and Total Antioxidant Potential of Selected Italian Wines*. *J Agric Food Chem* 45:1152–1155.
36. Renaud S, de Lorgeril M (1992) *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. *Lancet* 339:1523-6.
37. Szekeres T, Fritzer-Szekeres M, Saiko P, Jäger W (2010) *Resveratrol and resveratrol analogues - structure-activity relationship*. *Pharm Res* 27:1042-8.
38. Law M, Wald N (1999) *Attribution of time lag theory to explain French paradox*. *BMJ* 319:1073.
39. Zhu X, Liu Q, Wang M, Liang M, Yang X, Xu X, Zou H, Qiu J (2011) *Activation of Sirt1 by resveratrol inhibits TNF- α induced inflammation in fibroblasts*. *PLoS One* 6:e27081.
40. Basly JP, Marre-Fournier F, Le Bail JC, Habrioux G, Chulia AJ (2000) *Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol*. *Life Sci* 66:769-77.

41. Ciolino HP, Yeh GC (1999) *Inhibition of aryl hydrocarbon-induced cytochrome P-450 1A1 enzyme activity and CYP1A1 expression by resveratrol*. Mol Pharmacol 56:760-7.
42. Parker JA, Arango M, Abderrahmane S, Lambert E, Tourette C, Catoire H, Néri C (2005) *Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons*. Nat Genet 37:349-50.
43. Chang TK, Lee WB, Ko HH (2000) *Trans-resveratrol modulates the catalytic activity and mRNA expression of the procarcinogen-activating human cytochrome P450 1B1*. Can J Physiol Pharmacol 78:874-81.
44. Chang TK, Chen J, Lee WB (2001) *Differential inhibition and inactivation of human CYP1 enzymes by trans-resveratrol: evidence for mechanism-based inactivation of CYP1A2*. J Pharmacol Exp Ther 299:874-82.
45. Ahmad N, Adhami VM, Afaq F, Feyes DK, Mukhtar H (2001) *Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells*. Clin Cancer Res 7:1466-73.
46. Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, Jang M, Pezzuto JM, Dannenberg AJ (1998) *Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells*. J Biol Chem 273:21875-82.
47. Huang C, Ma WY, Goranson A, Dong Z (1999) *Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway*. Carcinogenesis 20:237-42.
48. Bhat KP, Lantvit D, Christov K, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM (2001) *Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models*. Cancer Res 61:7456-63.
49. Fulda S, Debatin KM (2004) *Sensitization for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol*. Cancer Res 64:337-46.
50. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB (2000) *Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation*. J Immunol 164:6509-19.
51. Chen ZH, Hurh YJ, Na HK, Kim JH, Chun YJ, Kim DH, Kang KS, Cho MH, Surh YJ (2004) *Resveratrol inhibits TCDD-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1 and*

- catechol estrogen-mediated oxidative DNA damage in cultured human mammary epithelial cells.* Carcinogenesis 25:2005-13.
52. Karlsson J, Emgard M, Brundin P, Burkitt MJ (2000) *Trans-resveratrol protects embryonic mesencephalic cells from tert-butyl hydroperoxide: electron paramagnetic resonance spin trapping evidence for a radical scavenging mechanism.* J Neurochem 75:141-50.
 53. Clément MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, Pervaiz S (1998) *Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells.* Blood 92:996-1002.
 54. Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL (1997) *Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A 94:14138-43.
 55. Zhou HB, Yan Y, Sun YN, Zhu JR (2003) *Resveratrol induces apoptosis in human esophageal carcinoma cells.* World J Gastroenterol 9:408-11.
 56. Dragone T, Cianciulli A, Calvello R, Porro C, Trotta T, Panaro MA (2014) *Resveratrol counteracts lipopolysaccharide-mediated microglial inflammation by modulating a SOCS-1 dependent signaling pathway.* Toxicol In Vitro 28:1126-35.
 57. Bhat KP, Pezzuto JM (2001) *Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells.* Cancer Res 61:6137-44.
 58. She QB, Huang C, Zhang Y, Dong Z (2002) *Involvement of c-jun NH(2)-terminal kinases in resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis.* Mol Carcinog 33:244-50.
 59. Jung KH, Lee JH, Thien Quach CH, Paik JY, Oh H, Park JW, Lee EJ, Moon SH, Lee KH (2013) *Resveratrol suppresses cancer cell glucose uptake by targeting reactive oxygen species-mediated hypoxia-inducible factor-1 α activation.* J Nucl Med 54:2161-7.
 60. Gautam SC, Xu YX, Dumaguin M, Janakiraman N, Chapman RA (2000) *Resveratrol selectively inhibits leukemia cells: a prospective agent for ex vivo bone marrow purging.* Bone Marrow Transplant 25:639-45.
 61. Stewart JR, Ward NE, Ioannides CG, O'Brian CA (1999) *Resveratrol preferentially inhibits protein kinase C-catalyzed phosphorylation of a cofactor-independent, arginine-rich protein substrate by a novel mechanism.* Biochemistry 38:13244-51.

62. Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, Gerez C, Guittet O (1998) *Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase*. FEBS Lett 421:277-9.
63. Horvath Z, Saiko P, Illmer C, Madlener S, Hoechtl T, Bauer W, Erker T, Jaeger W, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T (2005) *Synergistic action of resveratrol, an ingredient of wine, with Ara-C and tiazofurin in HL-60 human promyelocytic leukemia cells*. Exp Hematol 33:329-35.
64. Chan WK, Delucchi AB (2000) *Resveratrol, a red wine constituent, is a mechanism-based inactivator of cytochrome P450 3A4*. Life Sci 67:3103-12.
65. She QB, Bode AM, Ma WY, Chen NY, Dong Z (2001) *Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase*. Cancer Res 61:1604-10.
66. Schneider Y, Vincent F, Durantou B, Badolo L, Gossé F, Bergmann C, Seiler N, Raul F (2000) *Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells*. Cancer Lett 158:85-91.
67. Chung EY, Kim BH, Hong JT, Lee CK, Ahn B, Nam SY, Han SB, Kim Y (2011) *Resveratrol down-regulates interferon- γ -inducible inflammatory genes in macrophages: molecular mechanism via decreased STAT-1 activation*. J Nutr Biochem 22:902-9.
68. Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, Pietra VD, Racioppi L, Soldati G, Manna C, Galletti P, Zappia V (1998) *Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition*. Biochem Biophys Res Commun 250:53-8.
69. Holmes-McNary M, Baldwin AS Jr (2000) *Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I κ B kinase*. Cancer Res 60:3477-83.
70. Delmas D, Passilly-Degrace P, Jannin B, Cherkaoui Malki M, Latruffe N (2002) *Resveratrol, a chemopreventive agent, disrupts the cell cycle control of human SW480 colorectal tumor cells*. Int J Mol Med 10:193-9.
71. Martinez J, Moreno JJ (2000) *Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production*. Biochem Pharmacol 59:865-70.
72. Buttari B, Profumo E, Segoni L, D'Arcangelo D, Rossi S, Facchiano F, Saso L, Businaro R, Iuliano L, Riganò R (2014) *Resveratrol counteracts inflammation in human M1 and M2 macrophages upon challenge with 7-oxo-cholesterol: potential therapeutic implications in atherosclerosis*. Oxid Med Cell Longev 2014:257543.

73. Marambaud P, Zhao H, Davies P (2005) Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *J Biol Chem* 280:37377-82.
74. Pozo-Guisado E, Alvarez-Barrientos A, Mulero-Navarro S, Santiago-Josefat B, Fernandez-Salguero PM (2002) *The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle.* *Biochem Pharmacol* 64:1375-86.
75. Atten MJ, Attar BM, Milson T, Holian O (2001) *Resveratrol-induced inactivation of human gastric adenocarcinoma cells through a protein kinase C-mediated mechanism.* *Biochem Pharmacol* 62:1423-32.
76. Cullberg KB, Olholm J, Paulsen SK, Foldager CB, Lind M, Richelsen B, Pedersen SB (2013) *Resveratrol has inhibitory effects on the hypoxia-induced inflammation and angiogenesis in human adipose tissue in vitro.* *Eur J Pharm Sci* 49:251-7.
77. Mitchell SH, Zhu W, Young CY (1999) *Resveratrol inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells.* *Cancer Res* 59:5892-5.
78. Stewart JR, Christman KL, O'Brian CA (2000) *Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosphorylation.* *Biochem Pharmacol* 60:1355-9.
79. Zhang F, Wang H, Wu Q, Lu Y, Nie J, Xie X, Shi J (2013) *Resveratrol protects cortical neurons against microglia-mediated neuroinflammation.* *Phytother Res* 27:344-9.
80. Tan Y, Lim LH (2008) *trans-Resveratrol, an extract of red wine, inhibits human eosinophil activation and degranulation.* *Br J Pharmacol* 155:995-1004.
81. Mahyar-Roemer M, Katsen A, Mestres P, Roemer K (2001) *Resveratrol induces colon tumor cell apoptosis independently of p53 and precede by epithelial differentiation, mitochondrial proliferation and membrane potential collapse.* *Int J Cancer* 94:615-22.
82. Tinhofer I, Bernhard D, Senfter M, Anether G, Loeffler M, Kroemer G, Kofler R, Csordas A, Greil R (2001) *Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2.* *FASEB J* 15:1613-5.
83. Cerqueira AM, Khaper N, Lees SJ, Ulanova M (2013) *The antioxidant resveratrol down-regulates inflammation in an in-vitro model of Pseudomonas aeruginosa infection of lung epithelial cells.* *Can J Physiol Pharmacol* 91:248-55.

84. Locatelli GA, Savio M, Forti L, Shevelev I, Ramadan K, Stivala LA, Vannini V, Hübscher U, Spadari S, Maga G (2005) *Inhibition of mammalian DNA polymerases by resveratrol: mechanism and structural determinants*. *Biochem J* 389:259-68.
85. Haworth RS, Avkiran M (2001) *Inhibition of protein kinase D by resveratrol*. *Biochem Pharmacol* 62:1647-51.
86. Walle T (2011) *Bioavailability of resveratrol*. *Ann NY Acad Sci* 1215:9-15.
87. Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Mérei A, Halmai R, Mészáros LG, Sümegi B, Wittmann I (2011) *Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients*. *Br J Nutr* 106:383-9.
88. Bhatt JK, Thomas S, Nanjan MJ (2012) *Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus*. *Nutr Res* 32:537-41.
89. Crandall JP, Oram V, Trandafirescu G, Reid M, Kishore P, Hawkins M, Cohen HW, Barzilai N (2012) *Pilot study of resveratrol in older adults with impaired glucose tolerance*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 67:1307-12.
90. Magyar K, Halmosi R, Palfi A, Feher G, Czopf L, Fulop A, Battyany I, Sumegi B, Toth K, Szabados E (2012) *Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease*. *Clin Hemorheol Microcirc* 50:179-87.
91. Stivala LA, Savio M, Carafoli F, Perucca P, Bianchi L, Maga G, Forti L, Pagnoni UM, Albini A, Prosperi E, Vannini V (2001) *Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol*. *J Biol Chem* 276:22586-94.
92. Paulitschke V, Schicher N, Szekeres T, Jäger W, Elbling L, Riemer AB, Scheiner O, Trimurtulu G, Venkateswarlu S, Mikula M, Swoboda A, Fiebiger E, Gerner C, Pehamberger H, Kunstfeld R (2010) *3,3',4,4',5,5'-hexahydroxystilbene impairs melanoma progression in a metastatic mouse model*. *J Invest Dermatol* 130:1668-79.
93. Murias M, Jäger W, Handler N, Erker T, Horvath Z, Szekeres T, Nohl H, Gille L (2005) *Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship*. *Biochem Pharmacol* 69:903-12.
94. Ashikawa K, Majumdar S, Banerjee S, Bharti AC, Shishodia S, Aggarwal BB (2002) *Piceatannol inhibits TNF-induced NF-kappaB activation and NF-kappaB-mediated gene expression through suppression of IkkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation*. *J Immunol* 169:6490-7.

95. Heynekamp JJ, Weber WM, Hunsaker LA, Gonzales AM, Orlando RA, Deck LM, Jagt DL (2006) *Substituted trans-stilbenes, including analogues of the natural product resveratrol, inhibit the human tumor necrosis factor alpha-induced activation of transcription factor nuclear factor kappaB*. J Med Chem 49:7182-9.
96. Kang SS, Cuendet M, Endringer DC, Croy VL, Pezzuto JM, Lipton MA (2009) *Synthesis and biological evaluation of a library of resveratrol analogues as inhibitors of COX-1, COX-2 and NF-kappaB*. Bioorg Med Chem 17:1044-54.
97. Orallo F (2006) *Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol*. Curr Med Chem 13:87-98.
98. Wang D, Hang T, Wu C, Liu W (2005) *Identification of the major metabolites of resveratrol in rat urine by HPLC-MS/MS*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 829:97-106.
99. Faragher RG, Burton DG, Majecha P, Fong NS, Davis T, Sheerin A, Ostler EL (2011) *Resveratrol, but not dihydroresveratrol, induces premature senescence in primary human fibroblasts*. Age (Dordr) 33:555-64.
100. Anisimova NY, Kiselevsky MV, Sosnov AV, Sadovnikov SV, Stankov IN, Gakh AA (2011) *Trans-, cis-, and dihydro-resveratrol: a comparative study*. Chem Cent J 5:88.
101. Tucsek Z, Radnai B, Racz B, Debreceni B, Priber JK, Dolowschiak T, Palkovics T, Gallyas F Jr, Sumegi B, Veres B (2011) *Suppressing LPS-induced early signal transduction in macrophages by a polyphenol degradation product: a critical role of MKP-1*. J Leukoc Biol 89:105-11.
102. Soule BP, Hyodo F, Matsumoto K, Simone NL, Cook JA, Krishna MC, Mitchell JB (2007) *Therapeutic and clinical applications of nitroxide compounds*. Antioxid Redox Signal 9:1731-43.
103. Bognár B, Ahmed S, Kuppusamy ML, Selvendiran K, Khan M, Jeko J, Hankovszky OH, Kálai T, Kuppusamy P, Hideg K (2010) *Synthesis and study of new paramagnetic and diamagnetic verapamil derivatives*. Bioorg Med Chem 18:2954-63.
104. Kálai T, Balog M, Szabó A, Gulyás G, Jeko J, Sümegi B, Hideg K (2009) *New poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors with antioxidant activity based on 4-carboxamidobenzimidazole-2-ylpyrrolidine and -tetrahydropyridine nitroxides and their precursors*. J Med Chem 52:1619-29.
105. Montsko G, Nikfardjam MP, Szabo Z, Boddi K, Lorand T, Ohmacht R, Mark L (2008) *Determination of products derived from trans-resveratrol UV photoisomerisation by means of HPLC-APCI-MS*. J Photochem Photobiol A 196:44-50.

106. Rius C, Abu-Taha M, Hermenegildo C, Piqueras L, Cerda-Nicolas JM, Issekutz AC, Estan L, Cortijo J, Morcillo EJ, Orallo F, Sanz MJ (2010) *Trans- but not cis-resveratrol impairs angiotensin-II-mediated vascular inflammation through inhibition of NF- κ B activation and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma upregulation.* J Immunol 185:3718-27.
107. Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK (1999) *Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol.* Br J Pharmacol 126:673-80.
108. Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H (2005) *Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus.* Antioxid Redox Signal 7:395-403.
109. Jakus PB, Kalman N, Antus C, Radnai B, Tucsek Z, Gallyas F Jr, Sumegi B, Veres B (2013) *TRAF6 is functional in inhibition of TLR4-mediated NF- κ B activation by resveratrol.* J Nutr Biochem 24:819-23.
110. Kobayashi T, Ogawa Y, Watanabe Y, Furuya M, Kataoka S, del Saz EG, Tsunawaki S, Dinauer MC, Seguchi H (2004) *Mitochondrial transmembrane potential is diminished in phorbol myristate acetate-stimulated peritoneal resident macrophages isolated from wild-type mice, but not in those from gp91-phox-deficient mice.* Histochem Cell Biol 122:323-32.
111. Dave M, Attur M, Palmer G, Al-Mussawir HE, Kennish L, Patel J, Abramson SB (2008) *The antioxidant resveratrol protects against chondrocyte apoptosis via effects on mitochondrial polarization and ATP production.* Arthritis Rheum 58:2786-97.
112. Arthur JS, Ley SC (2013) *Mitogen-activated protein kinases in innate immunity.* Nat Rev Immunol 13:679-92.
113. Scherle PA, Jones EA, Favata MF, Daulerio AJ, Covington MB, Nurnberg SA, Magolda RL, Trzaskos JM (1998) *Inhibition of MAP kinase kinase prevents cytokine and prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-stimulated monocytes.* J Immunol 161:5681-6.
114. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM (1997) *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes.* Science 275:218-20.

115. Lu R, Serrero G (1999) *Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells.* J Cell Physiol 179:297-304.
116. Kundu JK, Surh YJ (2008) *Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives.* Cancer Lett 269:243-61.
117. Tang FY, Chiang EP, Sun YC (2008) *Resveratrol inhibits heregulin-beta1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and cell invasion in human breast cancer cells.* J Nutr Biochem 19:287-94.
118. Stewart JR, O'Brian CA (2004) *Resveratrol antagonizes EGFR-dependent Erk1/2 activation in human androgen-independent prostate cancer cells with associated isozyme-selective PKC alpha inhibition.* Invest New Drugs 22:107-17.
119. Bai Y, Mao QQ, Qin J, Zheng XY, Wang YB, Yang K, Shen HF, Xie LP (2010) *Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo.* Cancer Sci 101:488-93.
120. Heiss EH, Schilder YD, Dirsch VM (2007) *Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells.* J Biol Chem 282:26759-66.
121. Vairo G, Royston AK, Hamilton JA (1992) *Biochemical events accompanying macrophage activation and the inhibition of colony-stimulating factor-1-induced macrophage proliferation by tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and lipopolysaccharide.* J Cell Physiol 151:630-41.
122. Baehner RL, Boxer LA, Davis J (1997) *The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes.* Blood 48:309-13.
123. van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppele GJ, Beelen RH, Langenhuijsen MM (1991) *Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay.* J Immunol Methods 141:15-22.
124. Michels G, Wätjen W, Weber N, Niering P, Chovolou Y, Kampkötter A, Proksch P, Kahl R (2006) *Resveratrol induces apoptotic cell death in rat H4IIE hepatoma cells but necrosis in C6 glioma cells.* Toxicology 225:173-82.
125. Zhou JH, Cheng HY, Yu ZQ, He DW, Pan Z, Yang DT (2011) *Resveratrol induces apoptosis in pancreatic cancer cells.* Chin Med J (Engl) 124:1695-9
126. Ferry-Dumazet H, Garnier O, Mamani-Matsuda M, Vercauteren J, Belloc F, Billiard C, Dupouy M, Thiolat D, Kolb JP, Marit G, Reiffers J, Mossalayi MD (2002)

- Resveratrol inhibits the growth and induces the apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells.* Carcinogenesis 23:1327-33.
127. Sieuwerts AM, Klijn JG, Peters HA, Foekens JA (1995) *The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival.* Eur J Clin Chem Clin Biochem 33:813-23.
128. Wang P, Henning SM, Heber D (2010) *Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols.* PLoS One 5:e10202.
129. Berridge MV, Tan AS (1993) *Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction.* Arch Biochem Biophys 303:474-82.
130. Madesh M, Balasubramanian KA (1998) *Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide.* Indian J Biochem Biophys 35:184-8.

8. Publikációk listája

Az értekezés a következő publikációkon alapul:

Antus C, Radnai B, Dombovari P, Fonai F, Avar P, Matyus P, Racz B, Sumegi B, Veres B.

Anti-inflammatory effects of a triple-bond resveratrol analog: Structure and function relationship.

Eur J Pharmacol. 2015 Feb 5; 748:61-7.

impakt faktor: 2,532 (2014)

független idéző közlemények száma: 0

Kálai T, Borza E, Antus C, Radnai B, Gulyás-Fekete G, Fehér A, Sümegi B, Hideg K.

Synthesis and study of new paramagnetic resveratrol analogues.

Bioorg Med Chem. 2011 Dec 15; 19:7311-7.

impakt faktor: 2,921

független idéző közlemények száma: 6

További publikációk:

Fonai F, Priber JK, Jakus PB, Kalman N, Antus C, Pollak E, Karsai G, Tretter L, Sumegi B, Veres B.

Lack of cyclophilin D protects against the development of acute lung injury in endotoxemia.

Biochim Biophys Acta. 2015 Sep 15; [Epub ahead of print]

impakt faktor: 4,882

független idéző közlemények száma: 0

Poór M, Veres B, Jakus PB, Antus C, Montskó G, Zrínyi Z, Vladimir-Knežević S, Petrik J, Kőszegi T.

Flavonoid diosmetin increases ATP levels in kidney cells and relieves ATP depleting effect of ochratoxin A.

J Photochem Photobiol B. 2014 Mar 5; 132:1-9.

impakt faktor: 2,803

független idéző közlemények száma: 4

Jakus PB, Kalman N, Antus C, Radnai B, Tucsek Z, Gallyas F Jr, Sumegi B, Veres B.

TRAF6 is functional in inhibition of TLR4-mediated NF- κ B activation by resveratrol.

J Nutr Biochem. 2013 May; 24:819-23.

impakt faktor: 4,592

független idéző közlemények száma: 10

Radnai B, Antus C, Racz B, Engelmann P, Priber JK, Tucsek Z, Veres B, Turi Z, Lorand T, Sumegi B, Gallyas F Jr.

Protective effect of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ34 on mitochondrial depolarization-mediated cell death in hepatocellular carcinoma cells involves attenuation of c-Jun N-terminal kinase-2 and protein kinase B/Akt activation.

Mol Cancer. 2012 May 14;11:34.

impakt faktor: 5,134

független idéző közlemények száma: 2

Radnai B, Tucsek Z, Bogнар Z, Antus C, Mark L, Berente Z, Gallyas F Jr, Sumegi B, Veres B.

Ferulaldehyde, a water-soluble degradation product of polyphenols, inhibits the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mice.

J Nutr. 2009 Feb;139:291-7.

impakt faktor: 4,091

független idéző közlemények száma: 11

Konferencia poszterek:

Absence of cyclophilin D enhances the cholesterol and fat anabolism in mouse liver (FEBS3+ Meeting, Molecules of Life, Portoroz, Slovenia, 2015)

Crucial role of cyclophilin D in the pathogenesis of LPS-induced acute lung injury liver (FEBS3+ Meeting, Molecules of Life, Portoroz, Slovenia, 2015)

Egy hármas kötéses rezveratrol analóg antiinflammatorikus hatása (45. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2015)

A ciklofilin D szerepe az LPS által indukált gyulladási folyamatok génexpressziójának változásában (44. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2014)

Cyclophilin D dependent mPT amplifies inflammatory response in septic shock (14th ISANH Congress on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants, Paris, France, 2014)

A 3,4',5-trihidroxi-tolán U251 humán glioblastoma sejtekre kifejtett citotoxikus és antiproliferatív hatásának vizsgálata (43. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2013)

Paramágneses rezveratrol analógok anti-inflammatorikus, citotoxikus és anti-proliferatív hatásának vizsgálata (A Magyar Biokémiai Egyesület Jelátviteli Szakosztályának III. Konferenciája, Esztergom, 2012)

A ciklofillin D hiányának hatása a lipopoliszacharid indukálta tüdőkárosodásra egérben (A Magyar Biokémiai Egyesület Jelátviteli Szakosztályának III. Konferenciája, Esztergom, 2012)

A TRAF6 funkcionális gátlása rezveratrollal a TLR4 – NF κ B útvonalon (A Magyar Biokémiai Egyesület Jelátviteli Szakosztályának III. Konferenciája, Esztergom, 2012)

Egy új rezveratrol analóg, az SZV1361 antiproliferációs és citotoxikus hatása humán hepatocelluláris karcinoma sejtvonalon (41. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2011)

Inhibition of TLR4 - TRAF6 - NF- κ B pathway with resveratrol in murine macrophages (41. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2011)

LPS-indukálta szeptikus sokk gátlása ferulaldehiddel MKP-1 aktiválásán keresztül RAW264.7 egér makrofág sejtvonalon (40. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2010)

A ferulaldehyd – egy polifenol degradációs termék hatása LPS indukálta makrofág sejtvonalon (39. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2009)

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani mindenkinek, aki az elmúlt években bármilyen módon segítséget nyújtott a kutatásaimmal kapcsolatban. Köszönöm Dr. Sümegi Balázs Professor Úrnak, hogy az intézetünk és a doktori iskola vezetőjeként lehetővé tette számomra, hogy a témában kutassak. Hálás vagyok a Septic Shock Team minden egykori és jelenlegi tagjának – Radnai Balázsnak, Tucsek Zsuzsannának, Kálmán Nikolettának, Fónai Fruzsínának, Jakus Péternek, Dombóvári Péternek és mindenekelőtt témavezetőmnek, Veres Balázsnak – hogy a munkát egy szellemileg termékeny, és mindenkor baráti légkörben végezhettem. Köszönöm a technikai segítséget Pásztor Annának, Horváth Bertalannak, Girán Lászlónak és Halász Helénának. Köszönöm továbbá a családomnak és Máténak, hogy mindvégig támogattak.

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program (Apáczai Csere János Doktoranduszi Ösztöndíj) kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. A kutatáshoz a PTE ÁOK-KA-2013/31 támogatás is hozzájárult a vegyszerek és eszközök biztosításával.