

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2339.

ULAKCSAI ZSÓFIA ÉVA

Experimentális és klinikai farmakológia
című program

Programvezető: Dr. Szökő Éva, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Tábi Tamás, egyetemi docens

A rezveratrol sejtvédő hatásának és mechanizmusának tanulmányozása *in vitro* primer fibroblaszt kultúrán

Doktori értekezés

Dr. Ulakcsai Zsófia Éva

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tábi Tamás, PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Zupkó István, DSc, egyetemi docens
Dr. Köles László, PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szabó Dóra, DSc, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Sára, PhD, egyetemi docens
Dr. Ducza Eszter, PhD, egyetemi docens

Budapest
2019

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés.....	9
1.1 Rezveratrol.....	9
1.1.1 A rezveratrol kémiai szerkezete, előfordulása és bioszintézise	9
1.1.2 A rezveratrol farmakológiai jelentősége	11
1.1.2.1 A rezveratrol receptorális támadáspontjai.....	12
1.1.2.2 SIRT1 aktiváció.....	13
1.1.2.3 Kardioprotektív hatás	14
1.1.2.4 Antioxidáns és prooxidáns jellemzők	14
1.1.2.5 Gyulladásgátló hatás	16
1.1.2.6 Neuroprotektív hatás	16
1.1.2.7 Diabéteszben kifejtett hatás.....	17
1.1.2.8 Tumorelles hatása.....	18
1.1.3 A rezveratrol farmakokinetikája	18
1.2 Apoptózis.....	19
1.2.1 Az apoptózisra jellemző morfológiai változások.....	20
1.2.2 Az apoptózis molekuláris mechanizmusa.....	21
1.2.2.1 Extrinzik útvonal	21
1.2.2.2 Intrinzik útvonal	22
1.2.2.3 Granzym-B útvonal	24
1.2.2.4 Kaszpázok	25
1.3 A rezveratrol és az apoptózis.....	28
1.3.1 Apoptózis indukció	28
1.3.2 Apoptózis gátlás.....	30
1.3.2.1 Mitokondriális hatások.....	30
1.3.2.2 Autofágiát befolyásoló hatások.....	33
1.3.2.3 Prekondicionálás	38
2. Célkitűzések	39
3. Módszerek	40
3.1 Vegyületek és kezelt állatok	40
3.2 Sejtkultúra és sejtenyésztés	41

3.3	A kaszpáz-3 aktivitás mérése	41
3.4	A laktát-dehidrogenáz enzim felszabadulásának mérése	42
3.5	A ROS termelődés tanulmányozása valamint a mitokondriális membránpotenciál változásának vizsgálata JC-1 festéssel	42
3.6	A sejtben lévő savas sejtalkotók tanulmányozása akridin-narancs festéssel.....	43
3.7	Western Blot analízis.....	43
3.8	Statisztikai analízis	45
4.	Eredmények.....	46
4.1	A rezveratrol hatása a szérum-megvonás indukálta kaszpáz-3 aktivációra	46
4.2	A rezveratrol “sejtmentő” hatása a már aktiválódott kaszpáz-3-ra	49
4.3	A rezveratrol csökkentette a szérum-megvonás hatására megnövekedett laktát-dehidrogenáz enzim felszabadulást	50
4.4	A rezveratrol kaszpáz-3 aktivációra kifejtett hatásában szerepet játszó jelátviteli útvonalak vizsgálata	51
4.5	Az aromás szénhidrogén receptor útvonal szerepének vizsgálata a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációval szemben jelentkező protektív hatásában	53
4.6	Az ösztrogén-receptor útvonal szerepének vizsgálata a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációval szemben jelentkező protektív hatásában	54
4.7	Az antioxidáns sajátosság szerepe a rezveratrol preventív hatásában.....	56
4.8	A mitokondrium szerepének vizsgálata a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációval szemben jelentkező protektív hatásában.....	57
4.9	Az autofágia szerepének vizsgálata a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációval szemben jelentkező protektív hatásában	59
5.	Megbeszélés	62
5.1	A rezveratrol hatása a szérum-megvonás indukálta kaszpáz-3 aktivációra és a sejtek életképességére.....	62
5.2	A rezveratrol kaszpáz-3 aktivációra kifejtett hatása mögött a p38 kináz útvonal szerepe feltételezhető.....	64
5.3	A rezveratrol lehetséges receptorális támadáspontjainak vizsgálata citoprotektív hatásával összefüggésben	64
5.4	A rezveratrol nem antioxidáns tulajdonsága révén védi ki a kaszpáz-3 aktivációt	66
5.5	A mitokondriális depolarizáció és a reaktív oxigéngyökök szerepe a rezveratrol által kiváltott protektív hatásban	67
5.6	Az autofágia szerepe a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációt kivédő hatásában	68
6.	Következtetések	72
7.	Összefoglalás.....	75

8. Summary	76
9. Irodalomjegyzék.....	77
10. Saját publikációk jegyzéke	92
11. Köszönetnyilvánítás	93

Rövidítések jegyzéke

Ac-DEVD-AMC: acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metilkumarin

AHR: aromás szénhidrogén receptor

Akt: protein kináz B

AMPK: AMP-aktivált-protein-kináz

Apaf-1: apoptózis proteáz-aktivátor faktor

ARNT: aromás szénhidrogén receptor nukleáris transzlokátor

ATG: „autophagy-related” gén

BAP: benzo(a)pirén

BH: Bcl-2 homológ

BIR: „baclovirus IAP repeat”

CAD: kaszpáz aktiválta DNáz

CARD: „caspase activation and recruitment domain”

Cyt-C: Citokróm-C

DCFDA: klorometil-dikloro-dihidrofluoreszcein-diacetát

DED: „death effector domain”

DISC: „death-inducing signaling complex”

DMSO: dimetil-szulfoxid

eIF2 α : eukarióta transzlációs iniciációs faktor 2 α -alegysége

eNOS: endoteliális nitrogén-monoxid szintáz

Ösztr: ösztradiol

FBS: főtális borjú vérszérum

FADD: Fas-asszociált haláldomén

Fulv: fulvesztrant

GSH: glutation

H₂O₂: hidrogén-peroxid

HE: hidroetidin

HO-1: hemoxigenáz-1

HUVEC: humán köldökvéna endotél sejt

IAP: apoptózis inhibitor protein

ICAD: kaszpáz aktiválta DNáz inhibitor

IC₅₀: félmáximális gátló koncentráció

iNOS: indukálható nitrogén-monoxid szintáz

JNK: Jun N-terminális kináz

Klor: klorokin

LC3: mikrotubulus-asszociált protein 1 könnyű lánc 3

LDH: laktát-dehidrogenáz

LOX1: lektinszerű oxidált-lipoprotein receptor

MAPK: mitogén-aktiválta protein kináz

MOMP: mitokondrium külső membrán permeabilizáció

mTOR: „mammalian target of rapamycin”

mTORC1: mTOR komplex 1

NAC: N-acetilcisztein

NAD: nikotinamid-adenin-dinukleotid

NF-κB: nukleáris faktor-kappa B

NO: nitrogén-monoxid

NuMa: „Nuclear Mitotic apparatus protein”

ORP150: oxigén-regulált-protein 150

PARP: poliADP-ribóz polimeráz

PBS: foszfáttal pufferelt sóoldat

PGC-1 α : peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma koaktivátor-1 α

PI3K: foszfatidilinozitol-3-kináz

PAS: preautofagoszómális struktúra

PVDF: polivinilidén-fluorid

Rapa: rapamicin

RIPA: radioimmunprecipitációs assay

REZ: rezveratrol

ROS: reaktív oxigén gyökök

SAPK: stresszaktivált proteinkinázok

SzM: szérum-megvonás

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

SIRT: sirtuin

SOD: szuperoxid-dizmutáz

SQSTM1: “sequestosome 1”

Tam: tamoxifen

TBST: TRIS-szel pufferelt sóoldat

TEMED: tetrametilén-diamin

TMF: trimetoxiflavon

TNF: tumornekrózis-faktor

TRADD: TNF-R1-asszociált haláldomén

TRIS: Tris-hidroximetil-aminometán

1. Bevezetés

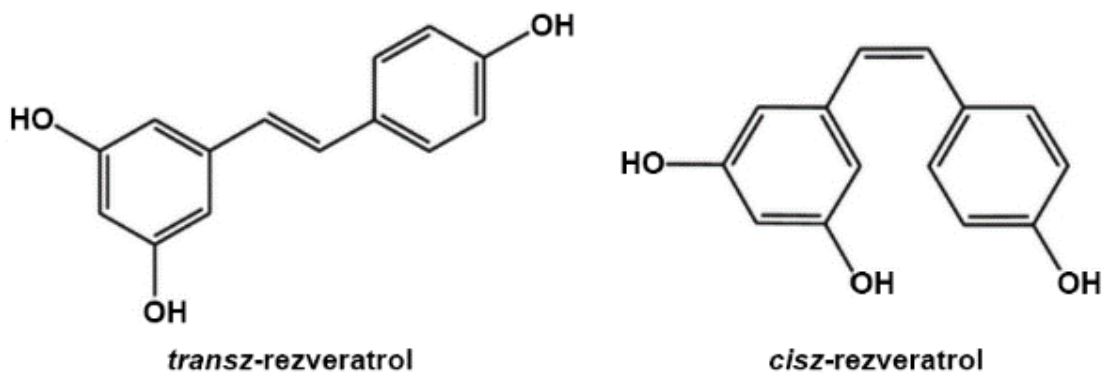
1.1 Rezveratrol

1992 óta, amikor is Siemann és Creasy kimutatták jelenlétét a vörösborsban (1), a rezveratrol az élettani és biokémiai kutatások közkedvelt tárgyává vált. A vegyület számos növényben, de legnagyobb mértékben a kék szőlő héjában és magvaiban található meg. Előnyös hatásait jó néhány korral járó degeneratív megbetegedés esetében leírták már, így többek között ismert kardioprotektív (2), neuroprotektív (3, 4), antioxidáns (5), gyulladáscsökkentő (6, 7), tumorelles (8, 9), öregedés-gátló (10) és sejtvédő hatása is (11-14). Igazoltan hat az apoptózisra, viszont az ezzel kapcsolatos irodalom eléggé ellentmondásos, hiszen pro- és antiapoptotikus tulajdonságai egyaránt ismertek (15-20). Ezen különbségek a tanulmányokban abból adódhatnak, hogy a vegyület eltérő hatást fejthet ki tumoros, illetve nem-transzformált sejtek esetében (12, 21, 22).

A rezveratrol célpontjai és hatásmechanizmusa még kevésbé tisztázottak. Az irodalmi források alapján hatással van különböző metabolikus és jelátviteli útvonalakra (11, 18, 23-25), van pro- és antioxidáns aktivitása is (26, 27), és számos transzkripciós faktor szabályzásában is részt vesz (28, 29).

1.1.1 A rezveratrol kémiai szerkezete, előfordulása és bioszintézise

A rezveratrol kémiailag egy 3,5,4'-trihidroxi-sztilbén polifenol vegyület, mely *cisz*-, és *transz*-izomerként is megtalálható (1. ábra). Bár a természetben nagyobb mennyiségben fordul elő *transz*-izomerként és biológiai hatásaiért is főként ez az izomer felelős, UV-megvilágítás hatására a *transz*-rezveratrol molekulák a kevésbé aktív *cisz* izomerré alakulnak (30, 31).



1. ábra: A transz- és a cisz-rezveratrol kémiai szerkezete (31)

A rezveratrol a természetben egy igen gyakran előforduló vegyület, számos növényben megtalálható, például a kékszőlőben, a földimogyoróban és különböző bogyós gyümölcsökben (32, 33). Keletkezését tekintve, a rezveratrol egy fitoalexin, azaz egy olyan vegyület, amely a növényben *de novo*, káros stimulus hatására termelődik. A káros hatás lehet egy növényt ért mechanikai sérülés, UV sugárzás, ózon ártalom vagy például gombafertőzés (34). A rezveratrol szintézisében a sztilbén-szintáz enzim játszik szerepet, amely a növényt ért stressz hatására aktiválódik (35). A rezveratrol mennyisége többek között függ a növény fajtájától, az időjárástól és a káros stimulustól (31, 34).

Egy nemrégiben megjelent tanulmány eredményei alapján azonban a rezveratrol kizárólag táplálékkal történő bevitele nem elegendő ahhoz, hogy a vegyület a tápcsatornából megfelelő mértékben felszívódjon és a vérben a mennyisége elérje a terápiás hatás eléréséhez szükséges koncentrációt (34).

A rezveratrol előállítása egyrészt növényekből történő kivonással történhet. A vegyület különböző növényi komponensekből történő nagyobb mennyiségű előállítása bizonyos kombinációs technikák alkalmazásával továbbra is a kutatások népszerű tárgyát képezi (36). Egy másik, gyakrabban alkalmazott eljárás, különböző mikroorganizmusokat felhasználva (pl. *Saccharomyces cerevisiae*), a rezveratrol géntechnológiával történő előállítása (37).

1.1.2 A rezveratrol farmakológiai jelentősége

A rezveratrolt tartalmazó növények népgyógyászatban történő alkalmazása hosszú múltra nyúlik vissza. Az ártéri japánkeserűfű (*Polygonum cuspidatum*) gyökerét, melynek egyik aktív komponense a rezveratrol, már a japán és a kínai tradicionális orvoslás is használta többek között dermatitis, hiperlipidémia vagy gonorrhoea kezelésére (38).

A rezveratrol 1992-ben, az úgynevezett Francia Paradoxon elmélet megjelenésével került a tudományos kutatások középpontjába. Renaud és Lorgeril elmélete abból indult ki, hogy a franciák épp annyi zsíros ételt fogyasztanak, mint például a norvégok, ennek ellenére a szívinfarktus gyakorisága Franciaországban csupán mintegy ötöde volt a Norvégiában tapasztalhatónak. Sőt, egész Európában, Franciaországban volt a legalacsonyabb a halálos kimenetelű szívinfarktus gyakorisága. E jelenséget – miszerint a magas zsírbevitel mellett is váratlanul alacsony a szívinfarktus előfordulási aránya Franciaországban – nevezzük Francia Paradoxonnak. Akkoriban gyanították, hogy a paradoxon a mérsékelt vörösbor fogyasztással hozható összefüggésbe, ma pedig már ismert, hogy a vörösbor valóban tartalmaz számos kedvező élettani hatással bíró vegyületet, többek között rezveratrolt is (38, 39).

A '90-es évek óta számos irodalmi adat jelent meg a rezveratrollal kapcsolatban, melyek különböző farmakológiai hatásokat tulajdonítanak a vegyületnek. Ezek közül kiemelendő kardioprotektív, gyulladásgátló, neuroprotektív, antioxidáns/prooxidáns és tumor-ellenes hatása. Ezekkel összefüggésben a rezveratrol feltételezett hatásmechanizmusa is széles körben tárgyalt témája a szakirodalomnak, a vegyület számos receptor és celluláris célpont működésének befolyásolására képes. A teljesség igénye nélkül ilyenek lehetnek egyes proteinek, mint például a survivin, a Bcl2, a p53 és a sirtuinok (SIRT 1,3,5), illetve transzkripciós faktorok, mint a nukleáris faktor-kappa B (NF- κ B) vagy mitokondriális enzimek (29, 40). A fent leírt farmakológiai promizskuitás ismeretében könnyen érthetővé válik, hogy a rezveratrol biológiai hatásai mögött többnyire nem egyetlen, hanem adott esetben egy egész sereg célmolekula aktivitásának karakterisztikus befolyásolása áll.

1.1.2.1 A rezveratrol receptoriális támadáspontjai

A rezveratrol farmakológiai hatásaival gyakran összefüggésbe hozott receptoriális támadáspontok az aromás szénhidrogén és az ösztrogén receptorok.

Az aromás szénhidrogén receptor (AHR) az aromás szénhidrogén receptor nukleáris transzlokátorral (ARNT) összekapcsolódva egy heterodimer transzkripció faktorhoz létre, ami a környezeti szennyezők egy sorát, például a 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioxint képes megkötni (41). Az AHR számos gén transzkripcióját aktiválja, többek között olyanokét, amelyek a kromatin struktúra módosítására vagy például az RNS-szintézis elongációs fázisának befolyásolására képesek (42-46). Az AHR receptorok felelőssé tehetőek komplex patológiás folyamatok és humán betegségek kialakításáért, így például a kémiai karcinogeneziséért, a szolid tumor növekedéséért vagy az arterioszklerózisért (46). Kimutatták, hogy az AHR antagonistájaként a rezveratrol megakadályozza a receptor transzaktivációs viselkedését és gátolja az agonisták által indukált géneexpressziót (47).

Egy meglehetősen jól dokumentált sajátossága a rezveratrolnak az ösztrogén receptorokon kifejtett hatása is. A rezveratrol ösztrogén receptorokhoz történő kötődése agonista (48) vagy antagonistista (49) hatásokat is eredményezhet. Agonista hatását mind az α -, mind pedig a β -típusú ösztrogén receptorokon kifejti (48, 50). Leírták már az ösztrogén receptorokat, mint a rezveratrol molekuláris támadáspontjait például a kardiomiopátiát előnyösen befolyásoló hatásával összefüggésben (51), illetve kimutatták a 17β -ösztradiolhoz hasonló védő hatását sztreptozotocin-indukálta diabétesz esetén is (52). Ugyanakkor igazolták, hogy a rezveratrol antitumor aktivitása kapcsolatba hozható antiösztrogén hatásával ösztrogénfüggő sejtburjánzások, mint például prolaktinóma esetén (53, 54).

1.1.2.2 SIRT1 aktiváció

McCay és munkatársai 1989-ben megállapították, hogy a kalóriabevitel csökkentés egy hatékony módszere az egészség megőrzésének és az élettartam meghosszabbításának (55). Később bebizonyosodott, hogy a kalória megvonás élettartam növelésének hátterében a SIRT1 enzim kulcsszerepet játszik. A sirtuin enzimek nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD)-dependens deacetyláz aktivitású molekulák, melyek az élővilág széles skáláján megtalálhatóak a baktériumoktól az emberig. Befolyásolják az öregedést és szabályozzák a transzkripció, az apoptózis, és a stressztűrés folyamatát. Az utóbbi évtized eredményei ezt a kalóriamegvonás alatti éberség és energia hatékonyság szerepkörével egészítik ki.

A rezveratrol sokrétű háttérmechanizmusai közül kiemelkedő jelentőséget tulajdonítottak a SIRT1 enzimnek. Kimutatták, hogy a rezveratrol is képes aktiválni a SIRT1 enzimet és ezáltal „utánozni” a kalóriamegvonás protektív hatását (10, 11). Jóllehet, ezzel kapcsolatban a vélemények ellentmondásosak, hiszen számos közlemény megkérdőjelezi, hogy a direkt SIRT1 aktiváció *in vivo* körülmények között is működik-e (56, 57). Egyes megközelítések szerint a rezveratrol előnyös biológiai hatásaiban a SIRT1 nem direkt támadáspontként, sokkal inkább egy „downstream” komponensként szerepel (58). Egy humán bronchiális epiteliális sejtekkel végzett vizsgálatban kimutatták a rezveratrol antiapoptotikus hatása mögött a SIRT1 up-reguláció szerepét. A vizsgálatban COPD modellezésére a bronchiális epiteliális sejtek apoptózisát 2%-os cigarettafüst kivonattal váltották ki. Ha a sejteket a káros stimulust megelőzően 20 μ M rezveratrollal kezelték, azt tapasztalták, hogy a rezveratrol óvta a sejteket az apoptózistól. Kimutatható volt, hogy jelentősen up-regulálódott a SIRT1 és az oxigén-regulált-protein 150 (ORP150), következésképpen nagymértékben csökkent az apoptotikus markerek, például a kaszpáz-3 aktivitása (12). A rezveratrol hatásosnak bizonyult az élettartam megnyújtásában egyes elhízást imitáló állatkísérleti modellekben és az inzulin rezisztencia megelőzésében, serkentette továbbá a mitokondriális biogenezist és javította a vaszkuláris funkciót (10, 59-61).

A kalóriamegvonás hatásának bizonyos egyéb aspektusai azonban nem jellemzőek a rezveratrolra, így például a szívfrekvencia és a test maghőmérsékletének csökkentése

(62). Rezveratrol hatására továbbá nem volt kimutatható az élettartam növekedés nem elhízott kísérleti állatokban (63, 64).

1.1.2.3 Kardioprotektív hatás

Számos preklinikai vizsgálat bizonyítja, hogy a rezveratrol valóban jótékony hatással bír a szív- és érrendszeri betegségek kivédésében, sőt, azok gyógyításában is, így a magas vérnyomás, az érlemezés, az iszkémiás szívbetegségek kezelésében vagy például az iszkémiás prekondicionálásban (2).

A rezveratrol kardioprotektív hatásában szerepe lehet az AMP-aktivált-protein-kináz (AMPK) aktiválásának (65), a SIRT1 enzimnek és az endogén antioxidáns enzimek serkentésének is (66). Tenyésztett vaszkuláris sejtek vizsgálatokor figyelték meg, hogy a rezveratrol fokozza az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) expresszióját és aktivitását, és ezáltal a nitrogén-monoxid (NO) biohasznosulását, mely az erek védelmében egy rendkívül fontos tényező (67). Vizsgálták továbbá magas szívinfarktus rizikójú betegek vérében a trombocita aggregáció jellemzőit, és azt találták, hogy a rezveratrol jelentősen csökkentette a vérlemezkék összecsapódási hajlamát (68).

Bár a preklinikai vizsgálatok sikerei a megelőzés és kezelés fázisban is megfigyelhetők voltak, de az ígéretes hatások ellenére csak kevés klinikai vizsgálatot végeztek és ezek eredményei is gyakran ellentmondásosnak bizonyultak (69).

1.1.2.4 Antioxidáns és prooxidáns jellemzők

A rezveratrollal kapcsolatban antioxidáns és prooxidáns tulajdonságát is leírták már.

Az oxidatív stressz reaktív oxigén gyökök (ROS) felhalmozódásával jár a szervezetben. A megnövekedett ROS mennyiség a sejtes makromolekulák (lipidek, proteinek és nukleinsavak) oxidatív módosulásához vezethet, az így bekövetkező DNS károsodás mutagenezist, onkogenezist és öregedéssel járó degeneratív betegségeket okozhat (70).

A rezveratrolról, mint antioxidáns vegyületről számos irodalmi adat beszámolt. Liang és munkatársai az osteoarthritis modellezéseként nyúl ízületi kondrocitákat alkalmazva, a sejtek apoptózisát nitroprusszid-nátriummal váltották ki. Ennek hatására aktiválódott a kaspáz-3 és átrendeződött a citoskeleton, emellett az intracelluláris NO és ROS szintje is emelkedett. A kísérlet során 100 μM rezveratrollal tizennyolc óráig előkezelték a sejteket, majd a tápoldatukhoz 1,5 mM nitroprusszid-nátriumot adagoltak és hat óra után vizsgálták a rezveratrol hatását. A rezveratrol csökkentette a ROS termelést, az apoptózist és a citoskeletális átrendeződést, a NO szintet azonban nem befolyásolta. Ebben a kutatásban a rezveratrol sejtvédő hatását szabadgyök-fogó hatásával magyarázták (27). Egy másik tanulmányban a cukorbetegség szövődményeként kialakuló neuronális károsodást modellezve, PC12 neuronokat vizsgáltak. A hiperkglükémia a neuronális cukorszintet is befolyásolja és a tartósan magas intracelluláris cukortartalom az idegsejtek károsodásához vezet. Ezt a jelenséget glükóz-neurotoxicitásnak nevezik. A neurotoxicitás összefüggésbe hozható azzal, hogy a magas cukorszint, például a monoszacharidok autooxidációja révén, ROS felhalmozódáshoz vezet, ami az idegsejtek apoptózisát indukálja. A kísérletben harminc percig 10 μM -os rezveratrol előkezelést alkalmaztak, majd hiperglikémiát modellező környezetet idéztek elő és huszonnégy óra múlva megvizsgálták a sejteket. Azt tapasztalták, hogy a rezveratrol növelte a sejtek életképességét, csökkentette az apoptotikus sejtek mennyiségét és az oxidatív stresszt. A hatás hátterében részben a rezveratrol antioxidáns, szabadgyök-fogó tulajdonsága áll, másfelől igazolták a foszfatidilinozitol-3-kináz/protein kináz B/FoxO3 (PI3K/Akt/FoxO3) jelátviteli útvonal aktiválásának szerepét is (71).

Zini és munkatársai szerint általánosságban elmondható, hogy a rezveratrol antioxidáns tulajdonsága mögött három alapmechanizmus áll. Egyfelől a vegyület maga is szabadgyök-fogó hatású, mely kémiai szerkezetével, a fenolos hidroxilcsoportok közötti delokalizált elektronrendszer szabadgyök stabilizáló hatásával magyarázható. Másfelől a mitokondriális elektrontranszport-láncban csökkenti a III. komplex aktivitását a koenzim Q kompetitív gátlásával és ezáltal csökkenti a ROS termelődést. Harmadrészt pedig gátolja a lipidperoxidációs folyamatokat (5). Mindemellett, a rezveratrol endogén antioxidáns enzimeket is indukál, melyek fontos szerepet töltenek be a szervezetet ért ROS ártalom mérséklésében. Ilyenek például a szuperoxid-dizmutáz (SOD), a glutation(GSH)-reduktáz, a GSH-peroxidáz és a GSH-transzferáz (72).

Érdekes módon az antioxidáns tulajdonsága mellett a rezveratrol prooxidáns tulajdonságáról is beszámolt a szakirodalom. Valószínűleg a hatás mibenléte a rezveratrol kezelés koncentrációjától és a vizsgált sejttípustól függ. A folyamat hátterében az a tény áll, hogy egy antioxidáns molekula egy redoxreakciót követően prooxidáns vegyületté válhat. Prooxidáns tulajdonsága révén a rezveratrol a sejtek DNS tartalmának oxidatív károsodását eredményezheti, ezzel apoptózist indukálva. A háttérmechanizmus még kevésbé ismert, de valószínűsíthető, hogy a rezveratrol a kromatin-kötésből mobilizálódó Cu(II) hatására oxidálódik és válik citotoxikussá. Abból kiindulva, hogy a rosszindulatú daganatos sejtek réz tartalma relatíve magas, a rezveratrol tumor-ellenes hatása mögött meghúzódó folyamatok között prooxidáns tulajdonsága is valószínűsíthető (26).

1.1.2.5 Gyulladásgátló hatás

A rezveratrolról kimutatták, hogy jelentős gyulladásgátló hatással is bír. Rezveratrol jelenlétében csökken a gyulladásos mediátorok szintézise és felszabadulása, változik az eikozanoidok szintézisének mértéke, gátolja a ciklo-oxigenáz-1,2 és lipoxigenáz enzimek működését (6, 7), illetve csökkenti a gyulladásos folyamatok kialakulását indukáló egyik legfontosabb transzkripciós faktor, az NF- κ B szintézisét (28).

1.1.2.6 Neuroprotektív hatás

A rezveratrol neuroprotektív tulajdonságát kimutatták különböző *in vitro* és *in vivo* betegségmodellekben is, például Alzheimer-, Parkinson-, Huntington-kórban, agyi iszkémiában és epilepsziában.

A rezveratrol-indukált SIRT1 expresszió megvédi a neuronokat számos káros ágenstől, mint például a reaktív oxigénszármazékoktól (ROS), a hidrogén-peroxidtól (H₂O₂) a nitrogén-monoxidtól, és az A β -peptidektől, valamint a védő hatás hátterében a rezveratrol antioxidáns tulajdonságainak is kiemelkedő fontosságot tulajdonítanak.

Állatkísérletekben vizsgálták például a rezveratrol esetleges alkalmazhatóságát az Alzheimer-kór kezelésében. Ebben a patológiás állapotban fehérje-aggregáció

következtében β -amyloid plakkok jönnek létre. A plakkok citotoxikusak, hatásukra reaktív oxigén gyökök keletkeznek, apoptózis indukálódik. Rezveratrol hatására csökkent az β -amyloid peptidek mennyisége. Megállapították, hogy a rezveratrol nem közvetlenül a peptidek termelődését gátolja, hanem lebontásuk mértékét serkenti proteozóma-függő útvonalon (3, 4).

1.1.2.7 Diabéteszben kifejtett hatás

A rezveratrol lehetséges szerepét a cukorbetegség kezelésében széleskörűen tanulmányozták, a vegyület hatását 1-es és 2-es típusú diabétesz mellitusban is vizsgálták. A rezveratrol javítja a glükóz homeosztázist, csökkenti az inzulin-rezisztenciát, védő hatást fejt ki a hasnyálmirigy β -sejtjeire és fokozza az inzulin szekréciót. Az 1-es típusú diabétesz modellezésére streptozotocinnal kezelt patkányokat, amely a hasnyálmirigy β -sejtjeinek pusztulásához, így inzulin-hiányos állapothoz vezetett. A kísérletekben a rezveratrol mérsékelte a hiperglikémiás epizódokat, kimutatták β -sejtvédő hatását és potenciózta az alkalmazott konvencionális terápiát (73-76).

A 2-es típusú diabétesz kezelésével kapcsolatban elvégzett vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy a rezveratrol serkenti a hasnyálmirigy β -sejtjeinek inzulin szekrécióját, fokozza a GLUT4 transzlokációját az izomsejtek plazmamembránjába, így növelte azok cukorfelvételét. Szintén serkentette a glikogén-szintáz működését, és csökkentette a glikogén-foszforiláz aktivitását, így növelte a máj glikogén raktárát. A hatások szoros összefüggésben állnak a SIRT1 és AMPK expressziójának és aktivitásának változásával. Feltehetőleg a rezveratrol már említett gyulladásgátló és antioxidáns tulajdonsága is hozzájárul a diabéteszben kifejtett kedvező hatásához. A kezdeti humán vizsgálatok megerősítették a preklinikai vizsgálatok eredményeit a 2-es típusú cukorbetegség esetében (76).

1.1.2.8 Tumorelles hatás

A karcinogenezis, onkogenezis vagy tumorképződés egy komplex, több lépcsős és tényezős folyamat, melynek során mind sejt, mind pedig molekuláris szinten kóros átalakulások játszódnak le. Egymáshoz szorosan kapcsolódó fázisai az iniciáció, a promóció, a transzformáció és a progresszió. Az iniciáció egy fokozott osztódási hajlamot takar valamilyen kijavíthatatlan mutáció következtében. A promóció fázisban már premalignus elváltozás észlelhető, de a malignus átalakulás, a transzformáció váltja ki a progressziót, azaz a klinikai daganat kialakulását (77).

Az utóbbi évek során bebizonyosodott a rezveratrol tumor-ellenes hatása. Elsőként Jang és munkatársai mutatták ki 1997-ben egy egér modellen, hogy a rezveratrol karcinogenezist gátló hatással bír bőrrák esetében. Leírták továbbá, hogy gátolja a daganatos sejteket az iniciáció, promóció és progresszió szakaszában is (8). A rezveratrol *in vitro* citotoxikus tulajdonságát a humán tumorsejtek több típusán kimutatták, így például mieloid és limfoid tumorsejteken, mell, bőr, méh, petefészek, gyomor, prosztata, vastagbél, máj, hasnyálmirigy és pajzsmirigy karcinómasejteken is. Tumorelles hatását változatos szignál transzdukciós célpontokon keresztül hatva fejti ki, mely által képes befolyásolni a sejtnövekedést, a sejtosztódást, az apoptózist, az angiogenezist, illetve bizonyos gyulladáshoz kapcsolódó metasztázis folyamatokat (9). A rezveratrol daganatos sejtekre kifejtett apoptotikus hatását az 1.3.1 fejezetben részletezem.

1.1.3 A rezveratrol farmakokinetikája

Míg a rezveratrol számtalan előnyös farmakológiai tulajdonsággal rendelkezik, farmakokinetikai jellemzői, sajnálatos módon, eléggé kedvezőtlenek. Sok más polifenolos vegyülethez hasonlóan *in vivo* orális alkalmazás esetén biohasznosulása alacsony, a vegyület gyors metabolizációja miatt. Ennek következtében, magas rezveratrol dózisok bevitelére volna szükség a klinikailag szignifikáns hatások eléréséhez. Emellett problémát jelent, hogy a biológiailag aktívabb *transz*-rezveratrol könnyedén átalakul UV besugárzás hatására a kevésbé aktív *cis*-izomerré (30).

A rezveratrol a májban és a belekben gyorsan metabolizálódik glükuronidáció és szulfatáció révén (78). Jelenleg kevés adat áll rendelkezésünkre és ellentmondásos annak a szakmai megítélése, hogy a metabolizmus során megszűnik-e a rezveratrol hatása. Habár, egy nemrégiben megjelent vizsgálat szerint a keletkező fő metabolitok a transz-rezveratrol-3-O-szulfát, transz-rezveratrol-3-O-glükuronid és a transz-rezveratrol-4'-O-glükuronid, melyek a rezveratrol hatásához hasonlóan antioxidáns jellemzőket mutattak. Dózis-függően gátolták a proliferációt és apoptózist indukáltak (79).

Eliminációját tekintve részben vizelettel, részben széklettel ürül ki, teljes kiürüléséhez körülbelül 72 óra szükséges.

Összefoglalva elmondható, hogy a rezveratrol rendkívül rossz farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkezik. Ugyanakkor megfelelő formulálással, például mikrokapszulák, nanopartikulumok, liposomák, ciklodextrin rendszerek alkalmazásával ez a probléma kiküszöbölhető (4).

1.2 Apoptózis

Fiziológiás körülmények között a sejtosztódás és a sejthalál együttesen biztosítják egy adott sejtpopuláció folyamatos megújulását és a sejtek számának viszonylagos állandóságát. Mivel a sejthalálnak számos formája létezik, az ezzel foglalkozó szakirodalom megkülönbözteti a “programozott sejthalál” jelenségét. A programozott sejthalál egyik behatóan tanulmányozott, fiziológiás megjelenési formája az apoptózis, ami a mitózis legfontosabb ellenpárja a sejtpopuláció mennyiségi szabályozásában (80).

Kerr, Wyllie és Currie nevéhez fűződik az apoptózis elnevezése, mely javaslatuk szerint egy aktív, programozott folyamat, amit egyaránt aktiválhatnak fiziológiás és patológias stimulusok is (81). Az apoptózis tehát a fiziológiás és bizonyos patológias folyamatokban is nagy jelentőséggel bír. Szerepe van az embrionális fejlődésben, a differenciálódásban, proliferációban és a már szükségtelen, károsodott, fertőzött, funkció-vesztett sejtek eliminációjában (82). Ezek alapján elmondható, hogy az apoptózis alapvető fontosságú a szövetintegritás, illetve a többsejtű organizmusok, szervek, szövetek kialakításában. Ugyanakkor, ha a programozott sejthalál mechanizmusában hiba adódik és ezáltal az

apoptózis mértéke túl alacsonnyá, vagy fokozottá válik, különböző betegségek alakulhatnak ki, ilyenek például a fejlődési rendellenességek, autoimmun, degeneratív és daganatos megbetegedések (83, 84).

1.2.1 Az apoptózisra jellemző morfológiai változások

Az apoptózis kezdete és vége között eltelt idő függ a sejt típusától, az apoptotikus útvonaltól és a stimulustól, miközben a sejt az apoptózisra jellemző morfológiai változásokon megy keresztül. Kezdetben pyknosis, azaz kromatin kondenzáció figyelhető meg a sejtmagban, mely a magmembrán közelében kezdődik, így egy gyűrű-szerű szerkezet alakul ki. A sejt elkezd zsugorodni, amihez nagymértékben hozzájárul a citoskeleton kollapszusa, a citoskeletális fehérjék lebontása. Ezt követően a sejt felszíne felhólyagosodik („blebbing”) és a sejtmag kisebbedik, majd a DNS fragmentálódik, és bekövetkezik a sejtmag szétesése. A folyamatok során a plazmamembrán intakt marad, de az apoptózis előrehaladtával, már megfigyelhető membránfodrozódás és változik a citoplazmatikus organelumok ultraszerkezete is. Végül a sejt sejtmembránnal határolt apoptotikus testekre esik szét, fagociták, makrofágok aktiválódnak különböző biokémia változások következtében és az apoptotikus testek fagocitózissal eliminálódnak. A fagocitózisban döntő szerepet játszik a membrán foszfolipid asszimétriája változása. A foszfatidil-szerin a sejthártya belső oldaláról a külső felszínre kerül és annexin-1-gyel együtt „egyél meg” mintát alakít ki, ami szükséges a fagociták általi felismeréshez és felvételhez. A fagociták felszínén számos receptor van, mely felismeri az említett „egyél meg” jelet, ilyenek a scavenger-receptorok (CD36, CD68) és a lektinszerű oxidált-lipoprotein receptor (LOX1). Az egészséges sejtektől „ne egyél meg” jelek tartják távol a fagocitákat (81, 85, 86). Fontos jellegzetessége az apoptózisnak, hogy nem jár gyulladással, hiszen a plazmamembrán integritása nem szakad meg, így az intracelluláris anyagok nem jutnak ki az extracelluláris térbe (87).

1.2.2 Az apoptózis molekuláris mechanizmusa

Az apoptotikus sejthalált külső és belső tényezők egyaránt kiválthatják. A külső faktorok lehetnek például vírusok vagy DNS károsító, mutagén hatások (ilyen az UV sugárzás vagy a hősokek), illetve származhatnak egy másik sejtől is. A belső faktorok a sejtben keletkeznek, általánosan megfogalmazva, valamilyen stressz hatására. Ilyen például a növekedési faktorok hiánya, a szabadgyökök, a citoplazmatikus stressz vagy a szérumbegvonás. A stimulustól függően tehát a sejthalál az extrinzik, másnéven halál-receptor mediált, illetve az intrinzik, mitokondriális útvonalon is elindulhat (88). Ugyanakkor bizonyított, hogy a kétféle útvonal egymástól nem függetlenül, hanem szorosan kapcsolódva, egymást befolyásolva működik (89). Az apoptózis molekuláris mechanizmusának extrinzik és intrinzik útvonalait a 2. ábra mutatja be. Az extrinzik és intrinzik útvonalakon kívül létezik még egy további, harmadik apoptotikus útvonal is, az úgynevezett granzym-B útvonal, mely szintén egy külső jelmolekulák által aktivált sejthalál útvonal (88).

1.2.2.1 Extrinzik útvonal

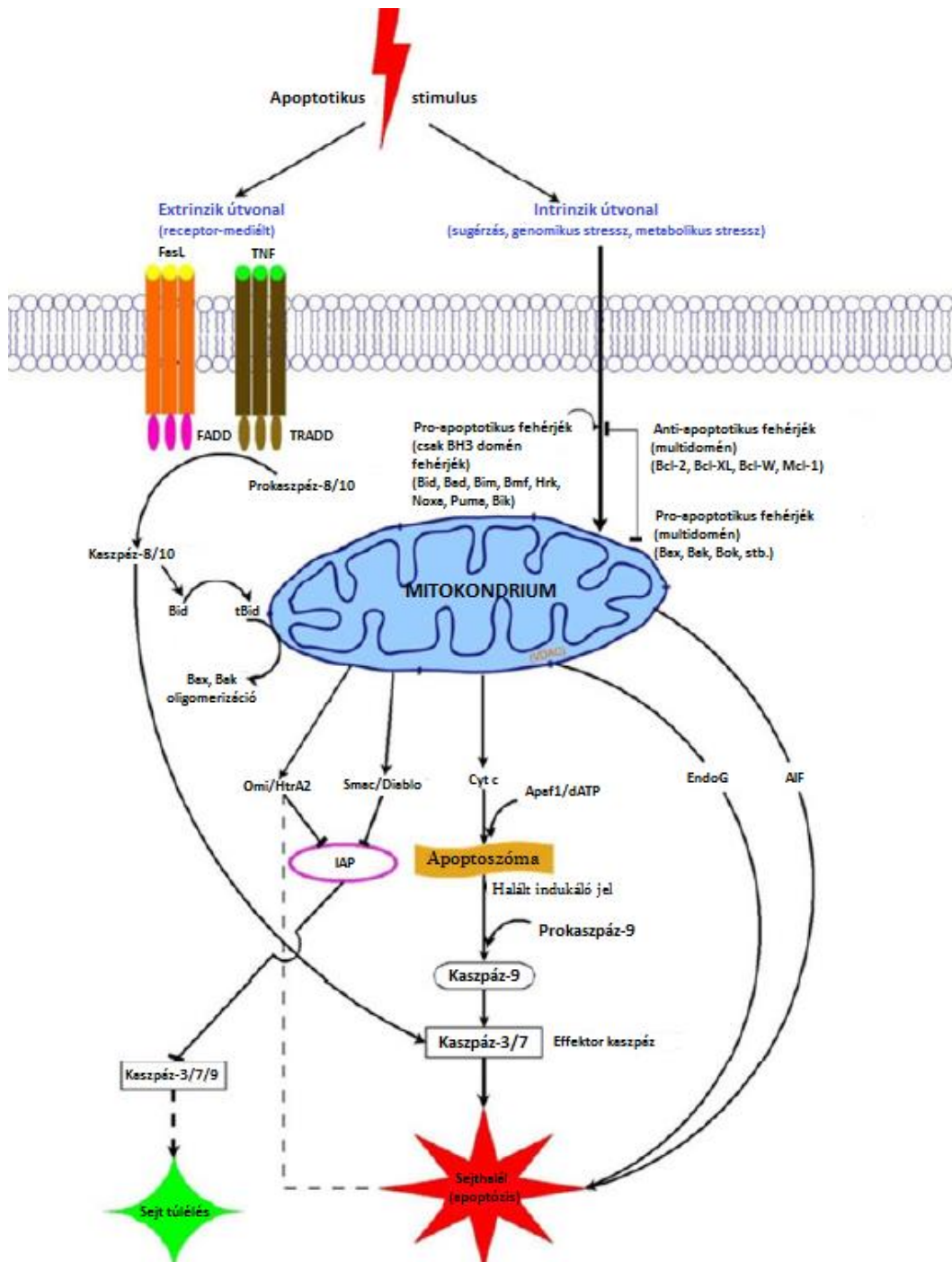
Az extrinzik vagy halál-receptor mediált útvonal esetében az apoptózis különböző halál-ligandok (FasL, TNF- α) és sejtfelszíni receptorok kötődése révén indukálódik. Ezeknek a receptoroknak (Fas/Apo/CD95, TNFR1, TRAIL/Apo-2L) fontos jellemzőjük, hogy a sejtközötti tér felé néző ligandum-kötő régiójuk mellett intracellulárisan tartalmaznak egy úgynevezett fehérje-interakciós haláldomént. Halál-ligand kötődésekor a receptorok oligomerizálódnak és a citoplazmában szabadon jelen lévő, haláldoménal rendelkező adaptor fehérjék kapcsolódnak a receptor haláldoménjéhez. Ilyen adaptor fehérje például a FADD (Fas-asszociált haláldomén), amely a halál doménjével a Fas halál receptorhoz, míg a halál effektor doménjével a prokaspáz-8-hoz képes kapcsolódnani. Az így kialakuló komplexhez kapcsolódik a prokaspáz-8 és létrejön az úgynevezett „death-inducing signaling complex” (DISC). Ezt követően a komplexbe beépült iniciátor prokaspáz-8 autoaktivációja révén további kaszpáz-8 keletkezik és aktiválja az effektor, azaz végrehajtó kaszpázokat (kaspáz-3, -6 és -7), majd a sejt elpusztul (84).

1.2.2.2 Intrinziik út vonal

Az intrinziik út vonal a mitokondriális út vonal, melynek kulcspontja a MOMP (mitokondrium külső membrán permeabilizáció) kialakulása, amiért főként a Bcl-2 fehérje család tagjainak működése felelős. A Bcl-2 családba nagyjából húsz fehérje tartozik, melyek mindegyike tartalmaz legalább egyet a négy konzervatív Bcl-2 homológ (BH) domén közül. A Bcl-2 fehérjék három fő csoportba oszthatók (82, 84).

Az első csoportba a mind a négy BH domént tartalmazó anti-apoptotikus fehérjék tartoznak, a Bcl-2, a Bcl-XL, a Bcl-W, az A1 és a Mcl-1, melyek a mitokondriumban, az endoplazmás retikulumban, illetve a perinukleáris membránokban helyezkednek el. Szerepük a sejt túlélésének elősegítése, amit a Bcl-2 család további két, pro-apoptotikus csoportjába tartozó tagjainak semlegesítésével valósítanak meg. A Bcl-2 család második csoportjába a csak BH3 domént tartalmazó Bid, a Bad, és a Bim tartoznak, melyeknek az apoptózis indukációjában van fontos szerepe. A multi-BH domént tartalmazó pro-apoptotikus fehérjecsoportba tartozó Bax, Bak, Bok tagok BH1, BH2 és BH3 doménnel is rendelkeznek. Halál stimulusra a csak BH3 domént tartalmazó proteinek poszttranszlációs módosuláson esnek át, aktiválódnak és transzlokálódnak a külső mitokondriális membránba, ahol interakcióba lépnek multi-domén pro-apoptotikus fehérjékkel így bekövetkezik a Bax és Bak oligomerizációja, melynek hatására pórus képződik a mitokondrium külső membránján. A folyamat eredményeként víz lép be a mátrixba, megszűnik a transzmembrán potenciál, szétkapcsolódik a légzési lánc, és fehérjék kerülnek ki az intramembrán térből a citoszólba, melyek mind hozzájárulnak a sejthalához. A mitokondriumból kiszabadult fehérjék többsége kaspáz kaspázot indukál. Az egyik legfontosabb és leghamarabb felfedezett ilyen fehérje a citokróm-c. Ez kötődik a citoplazmában prekursoraként jelen lévő Apaf-1-hez (apoptózis proteáz-aktivátor faktor), mely Apaf-1 oligomerizációt és prokaspáz-9 kötést indukál, így kialakul egy DISC-szerű szerkezet, az apoptoszóma. A komplexum kialakulásához ATP hidrolízisre és nukleotid cserére (ADP/ATP) is szükség van. Az apoptoszómán belül autóaktiváció révén aktív kaspáz-9 keletkezik és effektor kaspázokat aktivál, minek hatására megindulnak a „kivégző lépések”. A szintén a mitokondriumból felszabaduló endonukleáz G és AIF kaspáz-független DNS fragmentációt, illetve kromatin

kondenzációt indukálnak, míg a Smac/DIABLO és Omi/HtrA2 az IAP-ok semlegesítésével járul hozzá a sejthalálhoz (82, 84).



2. ábra: Az apoptózis molekuláris mechanizmusának extrinzik és intrinzik útvonala. A kiváltó stimulustól függően a sejthalál az extrinzik, másnéven halál-receptor

mediált, illetve az intrinzik, vagy mitokondriális útvonalon is elindulhat, melyek egymáshoz szorosan kapcsolódva, egymást befolyásolva működnek. Az extrinzik útvonal esetében az apoptózis különböző halál-ligandok, sejtfelszíni receptorokhoz (Fas/Apo/CD95, TNFR1, TRAIL/Apo-2L) történő kötődése révén indukálódik. Halál-ligand (FasL, TNF- α) kötődésekor a receptorok oligomerizálódnak és az intracelluláris felszínen a receptoriális haláldoménen keresztül adaptor fehérjék toborzódnak, ilyenek a FADD (Fas-asszociált haláldomén fehérje) és TRADD (TNF-R1-asszociált haláldomén fehérje). Létrejön a DISC, és aktiválódik a prokaspáz-8 (-10). Az aktiválódott kaszpáz-8, (-10) a továbbiakban autoaktivációért és effektor kaszpázok, kaszpáz-3, illetve kaszpáz-7 aktiválásáért felel. Az intrinzik útvonal a mitokondriális útvonal. Halál stimulusra a pro-apoptotikus csak BH3 domént tartalmazó proteinek (Bid, Bad, Bim, stb.) antiapoptotikus fehérjékhez (Bcl-2, Bcl-XL, stb.) kötődnek és ezáltal semlegesítik azokat. Ez a multidomén pro-apoptotikus fehérjék (Bax, Bak) oligomerizációjához vezet a mitokondriális membránban. A külső membránban pórusok keletkeznek, így a fokozott permeabilitás révén apoptotikus mediátorok szabadulnak fel (Omi/HtrA2, Smac/DIABLO, citokróm-C (Cyt-C), endoG és AIF). Citokróm-C felszabadulás hatására Apaf-1 és dATP/ATP jelenlétében apoptoszóma képződik, ami a prokaspáz-9 aktivációjához vezet. Autoaktiváció révén további kaszpáz-9 keletkezik és aktiválja a kaszpáz-3-at. Az IAP-ok a kaszpáz aktivitás szabályozásáért felelnek. Az apoptotikus mediátorok (Omi/HtrA2, Smac/DIABLO) hatására aktiválódott kaszpázokhoz kötődnek és így védik a sejtet az apoptózistól. Az EndoG és AIF kaszpáz-függetlenül okoz apoptózist, kromatin kondenzációt és darabolódást eredményezve. Kaszpáz-8 hatására hasítással aktiválódik a pro-apoptotikus csak BH3 domént tartalmazó fehérje, a Bid is, ami így kapcsolatot teremt az extrinzik és intrinzik út között (82).

1.2.2.3 Granzym-B útvonal

A granzym-B útvonal esetében az apoptózist a citotoxikus T-sejtek által termelt proteolitikus enzim, a granzym-B indukálja, mely maga is kaszpáz jellegű aktivitással rendelkezik. A T-sejt ezt az enzimet a célsejt membránjához való kötődése után juttatja be annak citoplazmájába. A bejuttatás mechanizmusa még ma sem tisztázott, valószínűsíthető azonban a T-sejtből származó perforinmolekulák szerepe. A sejtbe került granzym-B enzim iniciátor kaszpázként működik, aktiválja a prokaspáz-7 és prokaspáz-3 enzimeket (88).

A három apoptotikus útvonal kivétel nélkül minden esetben ugyanazzal a lépéssel, bizonyos proteolitikus enzimek, a kaszpázok működésének beindulásával és/vagy aktivitásának fokozódásával folytatódik a második szakaszban.

1.2.2.4 Kaszpázok

A kaszpázok az aszpartát specifikus cisztein-proteázok családjába tartoznak, tehát aktív centrumukban cisztein található és az úgynevezett konszenzus szekvencia mellett hasítják el a peptidkötést, mely aminosav-motívumnak az utolsó tagja minden esetben egy aszpartát. A kaszpázok ezen tulajdonsága eredményezi azt, hogy szubsztrátjaikat rendkívül pontosan, csak meghatározott helyeken és csak részlegesen bontják (limitált proteolízis). Valamennyi kaszpáz tulajdonsága, hogy inaktív zimogénként szintetizálódik. Emlős sejtekben ezidáig 14 különböző kaszpázt írtak le, melyek közül emberben 12 fordul elő (kaspáz-1-10, -12 és -14) (90).

Funkciójuk alapján három csoportba sorolhatók. Egy részük különböző gyulladásozó folyamatokban vesz részt (kaspáz-1, -4, -5, -11, -12, -13, -14). A második csoport tagjai az iniciátor kaszpázok, melyek az apoptózis indukálásáért felelnek, hosszú prodomént tartalmaznak, amin kaszpáz-8 és -10 esetében úgynevezett „death effector domain” (DED), kaszpáz-2 és -9 esetében „caspase activation and recruitment domain” (CARD) található. Az effektor kaszpázok csoportjába a kaszpáz-3, -6 és -7 tartozik. Rövid prodoménjük van, iniciátor kaszpázok hatására aktiválódnak és a sejthalál végrehajtásáért felelnek (82, 84). Az iniciátor és effektor kaszpázok szerkezeti sémáját a 3. ábra mutatja.

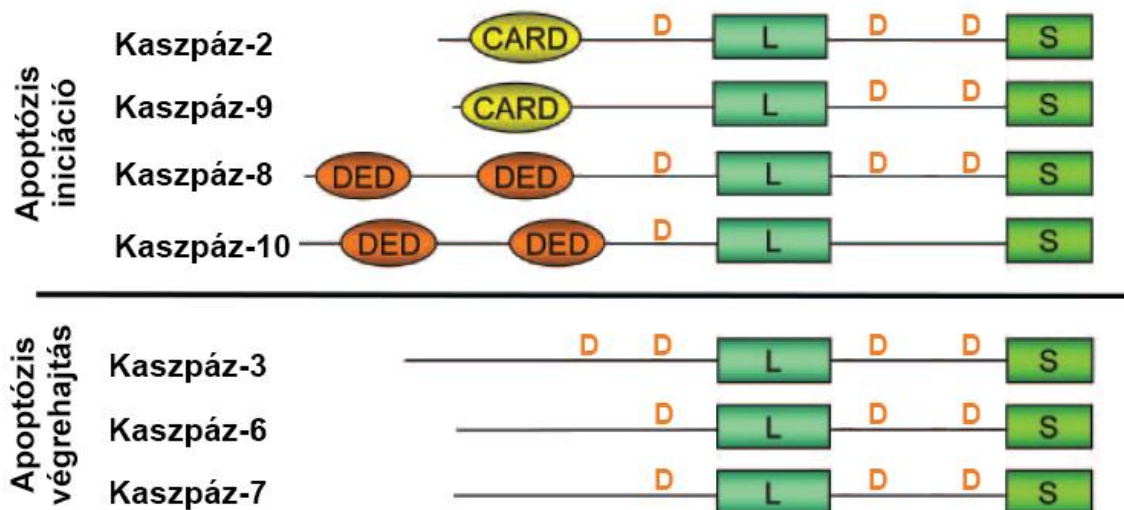
Az iniciátor és effektor kaszpázok eltérő mechanizmussal aktiválódnak. Az iniciátor kaszpázok esetében az aktiváció nagy, többkomponensű molekuláris komplexumokban történik (az extrinzik útvonalnál a DISC-ben, az intrinzik útvonal esetén az apoptoszómában). Mivel a proenzimeknek is van alapaktivitásuk, így ha közel kerülnek egymáshoz az említett DISC-ben és apoptoszómában, képesek autoaktivációra. Az effektor kaszpázokat vagy aktív iniciátor kaszpázok, vagy a citotoxikus T-sejtek által a célsejtbe juttatott granzym-B enzimek aktiválják. Az effektor kaszpázok általában nagyobb számban fordulnak elő és aktívabbak, mint az iniciátor kaszpázok (84).

Az effektor kaszpázok aktivációjával megkezdődik az apoptózis utolsó szakasza, amely mindhárom típusú útvonal esetén egyforma módon történik. Az aktív effektor kaszpázok koncentrációjának ugrásszerű megemelkedése a sejt normális működéséhez nélkülözhetetlen szerkezeti és szabályozó fehérjék tömeges lebontásához vezet. Az effektor kaszpáz-3, -6 és -7 citoplazmatikus endonukleázokat, különböző proteázokat

aktiválnak, szubsztrátjaik közé tartoznak például a citokeratinok, a DNS sérülések helyreállításában (DNS repaire) nélkülözhetetlen poliADP-ribóz polimeráz (PARP), az α -fodrin citoszkeletális fehérje vagy egy a mitotikus apparátushoz kapcsolódó nukleáris fehérje (NuMa, vagyis „Nuclear Mitotic apparatus protein”), mely a mikrotubulusok stabilizálásához szükséges. Ennek következményeként a citoplazmatikus és a sejtmagi vázrendszer dezorganizálódik, az intracelluláris transzport folyamatok súlyosan károsodnak és az alapvető sejtélettani folyamatok leállnak (91).

A kaszpáz-3-at tekintjük a legfontosabb effektor kaszpáznak, melyet mind a kaszpáz-8, -9 és -10 iniciátor kaszpázok képesek aktiválni. Az effektor kaszpázok inaktív enzimek gátló régiójának lehasításával olyan enzimeket képesek aktiválni, amelyek nukleáz aktivitással rendelkeznek, s kiemelt szerepet játszanak az apoptotikus sejt DNS állományának internukleoszómális fragmentálásában. A kaszpáz-3 például specifikusan aktiválja a kaszpáz aktiválta DNáz (CAD) enzimet. A CAD inhibitor (ICAD) a CAD enzimhez kötődve inaktív állapotban tartja azt, a kaszpáz-3 általi hasítását követően azonban leválik a CAD molekuláról, így az aktív DNS hasító enzim bejuthat a magba. A CAD internukleoszómális DNS hasítást eredményez, ami a kromatin állomány kondenzációjához vezet (92). A kaszpáz-3 továbbá bizonyos citoszkeletális reorganizációs és dezintegrációs folyamatokat indukál, s az apoptotikus sejtől különböző strukturális változások következtében úgynevezett apoptotikus testek keletkeznek. Egy szerkezeti fehérjét, a gelsolint úgy tartják számon, mint a kaszpáz-3 egyik kulcsfontosságú szubsztrátját. A gelsolin hasítása az aktin filamentumok hálózatának széteséséhez vezet, így a sejtalak megváltozik, valamint az intracelluláris transzport és a szignáltranszdukciós folyamatok összeomlanak (93).

Mindezeket követően, az apoptózis a korábbiakban már taglalt lépéssel, az apoptotikus sejtek fagocitózisával zárul.



3. ábra: Az iniciátor és az effektor kaszpázok szerkezeti sémája. Az iniciátor kaszpázok, hosszú prodomént tartalmaznak, amin kaszpáz-8 és -10 esetében DED (death effector domain), kaszpáz-2 és -9 esetében CARD (caspase activation and recruitment domain) található. Az effektor kaszpázok csoportjába a kaszpáz-3, -6, -7 tartozik, rövid prodoménjük van (84).

Az egészséges sejt homeosztázishoz elengedhetetlen a kaszpáz kaszkád szigorú ellenőrzése. A folyamatban rengeteg negatív szabályozó van, a legfontosabbak talán az apoptózis inhibitor protein (IAP) család tagjai. Közülük legnagyobb jelentőséggel bír a XIAP, a c-IAP1, a c-IAP2 és a Survivin, melyek mind tartalmazzák a „baclovirus IAP repeat” (BIR) protein domént, aminek segítségével kötődni tudnak a kaszpázok aktív alegységéhez és ezáltal képesek az apoptózis direkt gátlására (94).

1.3 A rezveratrol és az apoptózis

Az előző fejezetekben említésre került a rezveratrol tumor-ellenes hatása, melyet számos tanulmány igazolt. A kutatások eredményei azonban ellentmondásosnak tűnhetnek, hiszen a rezveratrol sejtvédő hatása is bebizonyosodott az elmúlt évek során. A kettős hatás hátterében feltehetőleg a rezveratrol kezelés változó dózisa és időtartama, illetve a vizsgálatokban szereplő sejtek eltérő típusa áll. Megannyi kutatás foglalkozik a rezveratrol hatásainak hátterében meghúzódó folyamatok megértésével. Sok háttérmechanizmus már jól körülírt, mégis a hatások teljes körű megismeréséhez további vizsgálatok szükségesek.

1.3.1 Apoptózis indukció

Számos tanulmány leírta, hogy a rezveratrol daganatos sejtekben kimutatható antiproliferatív aktivitása mögött többek között apoptózist indukáló tulajdonsága áll (9, 15-17). Az alábbiakban a teljesség igénye nélkül szeretnék néhány példát bemutatni a rezveratrol proapoptotikus sajátosságára és a jelenség mögött álló mechanizmusokra vonatkozóan.

Kimutatták, hogy a rezveratrol képes sejthalált indukálni az apoptózis intrinzik útvonalában fontos szerepet játszó Bcl-2 fehérje család befolyásolása által. A vegyület az antiapoptotikus Bcl-2 fehérjék gátlásával és a proapoptotikus Bad, Bak vagy Bax proteinek aktivációjával citokróm-c felszabadulást és kaszpáz aktivációt okoz (95, 96). SW480 humán vastagbél daganatsejtekben negyvennyolc órás, 30 μ M rezveratrol kezelés fokozta az apoptózis intrinzik útvonalában fontos szerepet játszó Bax és Bak proapoptotikus fehérjék akkumulációját, konformáció változását és mitokondriális relokalizációját, ezáltal megnövekedett kaszpáz aktivációt okozva (97).

Tameda és munkatársai a rezveratrol halál-receptor mediált, TRAIL-indukálta apoptózisra kifejtett hatását vizsgálták daganatos sejtekben. A vizsgálatban HepG2 humán hepatocelluláris karcinóma sejtvonalat alkalmaztak. A rezveratrol 100 μ M, vagy annál magasabb koncentrációja eredményesen csökkentette a tumoros sejtek életképességét, ennél alacsonyabb koncentráció nem okozott szignifikáns károsodást a

sejtekben. A hatás idő-függő volt, huszonnégy és negyvennyolc óra után vizsgálták a sejteket, negyvennyolc óra után a sejtek életképessége már nagyon alacsony volt. Alacsonyabb, 50 μM koncentrációt alkalmazva a vegyület nem indukált apoptózist, ugyanakkor az osztódó sejteket S fázisban megállította. A kutatásban vizsgálták, hogyan változik a korai apoptózis mértéke, ha csak 50 μM rezveratrollal, vagy csak 10 ng/ml TRAIL-el, vagy kettőjük kombinációjával kezelik a sejteket huszonnégy órán át. Csak rezveratrol, illetve TRAIL kezeléssel 3,4% és 9,6% volt a korai apoptózis mértéke, míg kombinációjukat alkalmazva ez az arány 49,6%-ra emelkedett. A sejtek TRAIL érzékenységének fokozódását a rezveratrol dózis-függő survivin down-reguláló hatásával magyarázták (98).

A rezveratrol apoptózist indukáló sajátosságát több alkalommal összefüggésbe hozták már a foszfatidilinozitol-3-kináz/protein kináz B/„mammalian target of rapamycin” (PI3K/Akt/mTOR) útvonalat gátló (99-101), a mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK) útvonalakat moduláló (102, 103) vagy az NF- κ B, STAT3 aktivációt gátló hatásával is (9).

Sok tanulmány alátámasztja, hogy a PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonal kritikus jelentőségű a daganatos sejtek proliferációjában, tumorgenezisében, metasztázisában. Az Akt szerin/treonin-kináz és PI3K-függően aktiválódik növekedési faktorok, illetve stressz jelenlétében. Az mTOR az egyik központi szereplője a PI3K/Akt jelátviteli kaszkádnak és többek között szintén a proliferáció, differenciálódás és sejt túlélés szabályozásában van szerepe. Aziz és munkatársai vizsgálatában a huszonnégy órás rezveratrol kezelés 50 μM maximum koncentrációban, dózis-függő módon fokozta az LNCaP androgén-reszponzív humán prosztata karcinómasejtek apoptózist a PI3K/Akt útvonal gátlásával és ezáltal a Bcl-2 fehérje család modulációjával (95).

A MAPK-családba három, funkcionálisan különböző kináz alcsalád tartozik. Az ERK-alcsaládba tartozó molekulák mitogén- és differenciálódási jeleket közvetítenek, míg a további két csoportba sorolható kinázok a stressz és a gyulladásos citokinek által kiváltott válaszban vesznek részt. Az utóbbi két alcsaládot alkotják a stresszaktivált proteinkinázok (SAPK) és a Jun N-terminális kinázok (JNK), valamint a p38 MAPK, amely a magas ozmolaritás és a reaktív oxigénradikálok által kiváltott stresszválaszt közvetíti. A rezveratrolra jellemző ellentmondásosság a MAPK családra kifejtett hatásával kapcsolatban is megfigyelhető, hiszen a szakirodalom közölte már a vegyület

pro- és antiapoptotikus hatását is a MAPK útvonal befolyásolásán keresztül (99, 104). Humán neuroblasztóma SH-SY5Y sejteken például a rezveratrol alacsony koncentrációban (1 pM–10 µM) aktiválta, míg magasabb koncentrációban (50–100 µM) gátolta az ERK 1/2 kinázt (24). Továbbá, egy tanulmány alapján, a rezveratrol a JNK és p38 kináz útvonalak aktivációjával képes volt apoptózis kiváltására JB6 limfóma sejteken (105). A rezveratrol MAPK útvonallal kapcsolatba hozható antiapoptotikus hatását a következő fejezetben részletezem.

Az NF-κB és STAT3 transzkripciós faktorok többek között antiapoptotikus gének, például a Bcl-XL és cFLIP expresszióját váltják ki és ezáltal a sejtproliferáció fenntartását szolgálják (106). Humán melanóma sejtvonalat vizsgálva, 25-100 µM-os rezveratrol kezelés hatására csökkent az NF-κB és fokozódott a JNK aktivációjának mértéke, ami mérsékelt Bcl-XL és cFLIP szintet eredményezett, így fokozódott a DR5+ melanóma sejtek TRAIL érzékenysége. A hatás dózis függőnek mutatkozott, a legnagyobb hatékonyságot a vegyület 100 µM-os koncentrációjánál észlelték, de a vizsgálat azt is igazolta, hogy a DR5+ sejtek pusztulásának mértéke a kezelés időtartamától is függött. Tizenkét nap után már nagymértékű sejtpusztulást tapasztaltak, de az NF-κB és JNK aktivációjának mértékében már hat óra után jelentős változást figyeltek meg (107).

1.3.2 Apoptózis gátlás

A rezveratrol sejtvédő hatását számos irodalmi adat alátámasztja, bár a pontos háttérmechanizmus még kevésbé ismert, a citoprotektív hatást magyarázó mechanizmusok rendkívül nagy változatosságot mutatnak és csak bizonyos részfolyamatokra képesek rávilágítani. Az alábbiakban a rezveratrol sejtvédő, antiapoptotikus hatása mögött feltételezett legfőbb folyamatok ismertetésére teszek kísérletet.

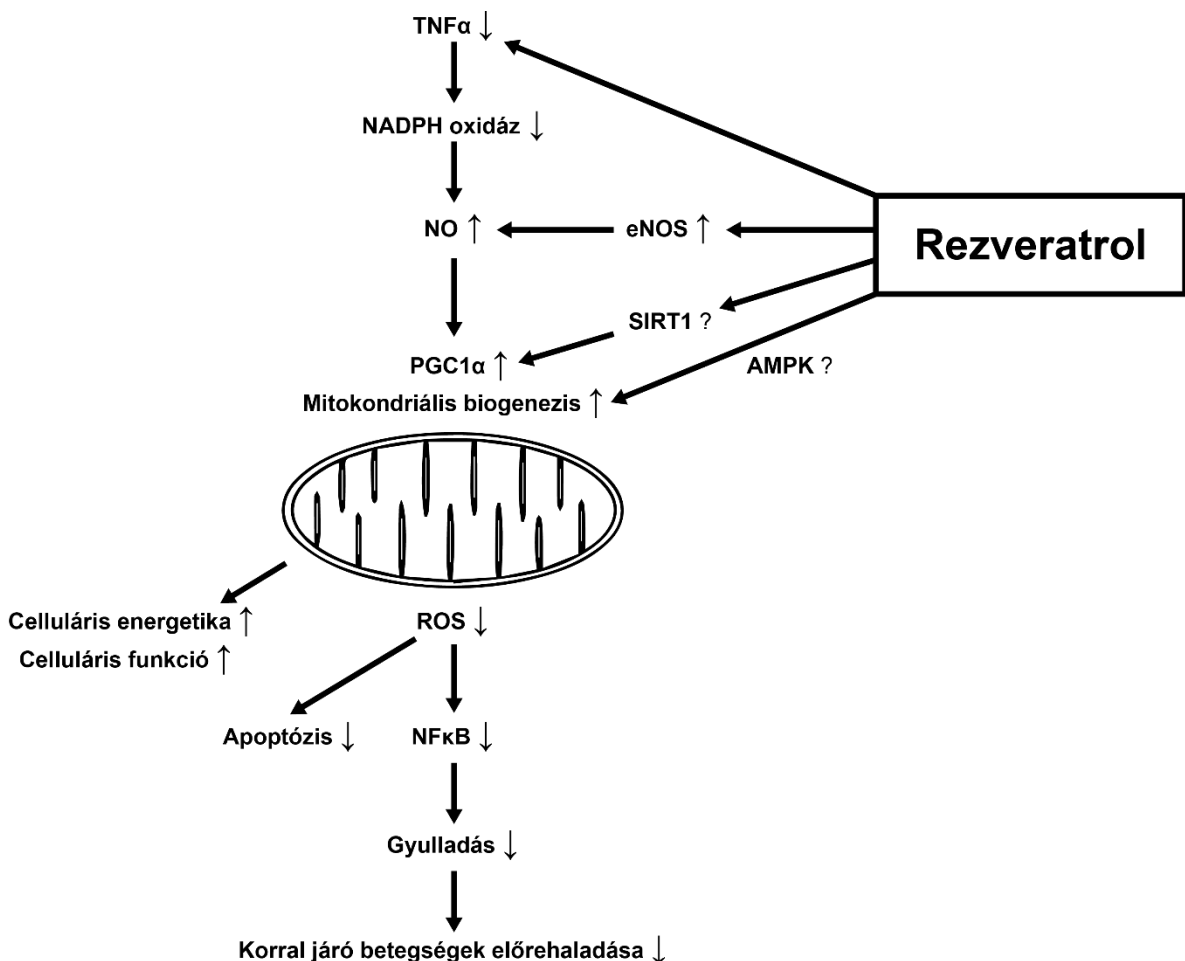
1.3.2.1 Mitokondriális hatások

A mitokondriális elektrontranszport-lánc és a ROS termelődés befolyásolását gyakran felelőssé teszik a rezveratrol egyes farmakológiai hatásaiért, így a sejtvédő hatásáért is.

A mitokondriális biogenezis jelentőséggel bír a sejtszintű metabolizmus, a redox folyamatok, valamint a szignáltranszdukció szabályozásában. Károsodása a celluláris energetikai egyensúly felborulásához, oxidatív stresszhez, ezáltal patológiás állapotok kialakulásához vezethet. Rágcsálókön végzett, az öregedést és a metabolikus szindrómát modellező kísérletekben fiziológiai javulás volt megfigyelhető az állatoknál rezveratrol kezelés hatására, melyet a májban, a vázizomrendszerben (60, 61), az agyban (108) és az erekben (19) fokozott mitokondriális biogenezis kísért. Egy összetett mechanizmus lehet a magyarázata a rezveratrol indukálta mitokondriális biogenezisnek és az ebből következő citoprotektív hatásnak (4. ábra). Az egyik elmélet feltételezi, hogy a rezveratrol a SIRT1 aktiválásával elősegíti a peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma koaktivátor-1 α (PGC-1 α), a mitokondriális biogenezis „fő szabályozójának” deacetilációját és aktivációját. Egy másik magyarázat szerint, különféle útvonalak egymással összehangolt működése, például az energia szenzorként funkcionáló AMPK lehetőséget nyújtanak arra, hogy a PGC-1 α a SIRT1-től függetlenül aktiválódjon. A károsodott mitokondrium (például diabétesz esetén vagy az öregedés folyamán) befolyásolhatja az ATP termelést, a sejtek szintetikus és szekretoros funkcióját, a sejtszintű oxido-redukciós homeosztázist és a nukleáris génexpressziót. A rezveratrol által kiváltott mitokondriális biogenezis ezen károsodás helyreállításában játszhat szerepet. Továbbá, mivel a mitokondriális proliferáció csökkentheti a mitokondriumon áthaladó egységnyi elektronok számát, ezáltal a rezveratrol képes lehet a mitokondriális ROS termelés mérséklésére. Összefoglalva a rezveratrol, megfelelő koncentrációban alkalmazva, csökkentheti a mitokondriális oxidatív stresszt (11, 20).

Mindemellett, mint sok más hatásában, a rezveratrol mitokondriumot befolyásoló tulajdonságában is megjelenik egyfajta kettősség. Gueguen és munkatársai az elektrontranszportot végző légzési lánc egyik tagját, az I. komplexet azonosították a rezveratrol direkt mitokondriális támadáspontjaként. Érdekes módon azt tapasztalták, hogy *in vitro* a rezveratrol alacsony dózisban (<5 μ M) stimulálta, míg magasabb dózisban (50 μ M) inkább gátolta az I. komplex aktivitását. *In vivo*, fiatal egereket vizsgálva a rezveratrol fokozta az agyi mitokondriumokban az I. komplex működését, a légzési lánc működésének befolyásolása nélkül. Ugyanakkor idősebb, már kisebb antioxidáns védekezőképességgel rendelkező egerek esetében a rezveratrol kezelés aktiválva az I. komplexet, oxidatív stressz kialakulásához vezetett. Ezen eredmények megerősítették az

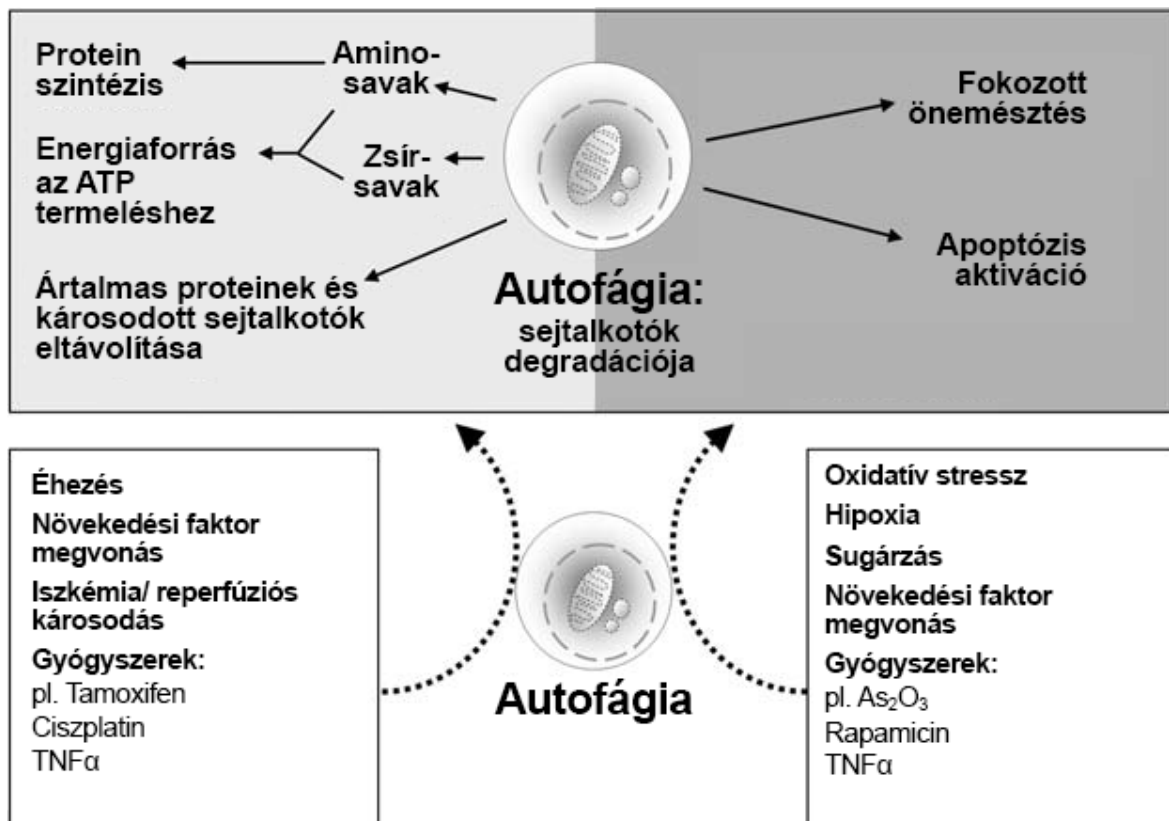
alkalmazott koncentráció és életkor jelentőségét a rezveratrol kezelés mitokondriumra kifejtett hatása szempontjából (40).



4. ábra: A rezveratrol indukálta mitokondriális protekció feltételezett mechanizmusa. Az elmélet feltételezi, hogy a rezveratrol a SIRT1 és/vagy az AMPK aktiválásával fokozza az eNOS enzim és csökkenti a TNF α -aktiválta NADPH-oxidáz működését, mely utóbbi az egyik legfőbb extramitokondriális ROS forrásnak számít. Az oxidatív stressz csökkentésével a rezveratrol növeli a NO biológiai elérhetőségét, elősegítve ezáltal a PGC-1 α aktivációját, ami mitokondriális protekciót és fokozott mitokondriális biogenezist okoz. A fiatal mitokondriumok képződése és a mitokondriális ROS termelés mérséklése jelentősen csökkenti a celluláris oxidatív stresszt és gyulladást, helyreállítják a celluláris energiagazdálkodást és mérsékelik a sejthalált (11).

1.3.2.2 Autofágiát befolyásoló hatások

Az autofágia, vagyis a sejtek önmészése egy alapvető sejtéletteni folyamat, melynek során a sejt lebontja elöregedett, sérült, hibás, funkcióját veszített, felesleges, vagy kóros makromolekuláit, organelumait (109). Az autofágia, kisebb-nagyobb intenzitással, minden eukarióta élőlény sejtjeiben zajlik, fenntartva ezzel a hosszú-élettartamú fehérjék és sejtorganelumok körforgásának homeosztatis egyensúlyát. Ez a sejtekben alapszinten zajló autofágia elsősorban a sejt felépítő (szintetikus) és lebontó (katabolikus) folyamatainak egyensúlyát tartja fenn (110). Bár korábban kizárólag úgy tekintettek az autofágiára, mint egy önpusztító mechanizmusra, mely sejthalálhoz vezet, ma már inkább az az általános vélekedés, hogy főleg citoprotektív hatást közvetít, megakadályozva az apoptotikus vagy nekrotikus halálát a stressz ártalmat szenvedett sejteknek. Mindez megnyilvánulhat például abban, hogy a sejtek az autofágia által intracelluláris tápanyagokat mobilizálnak hipoxia, illetve glükóz, aminosav vagy növekedési faktorok megvonása esetén. Továbbá, a sejtek az autofágia segítségével képesek megszabadulni olyan potenciálisan ártalmas citoplazmatikus anyagoktól, mint a feltekeredett fehérjeaggregátumok, bizonyos külső behatólok, mikróbák vagy a károsodott mitokondriumok, melyek a toxikus ROS és az apoptotikus proteinek egyik legfőbb forrásai (111, 112). A károsodott mitokondriumok autofágia által történő eltávolítását mitofágiának nevezzük (113). Az autofágia kiváltásában szerepet játszó egyes tényezők és az autofágia két típusú kimenetelét, sejthalált, illetve túlélést biztosító hatását az 5. ábra mutatja (18).

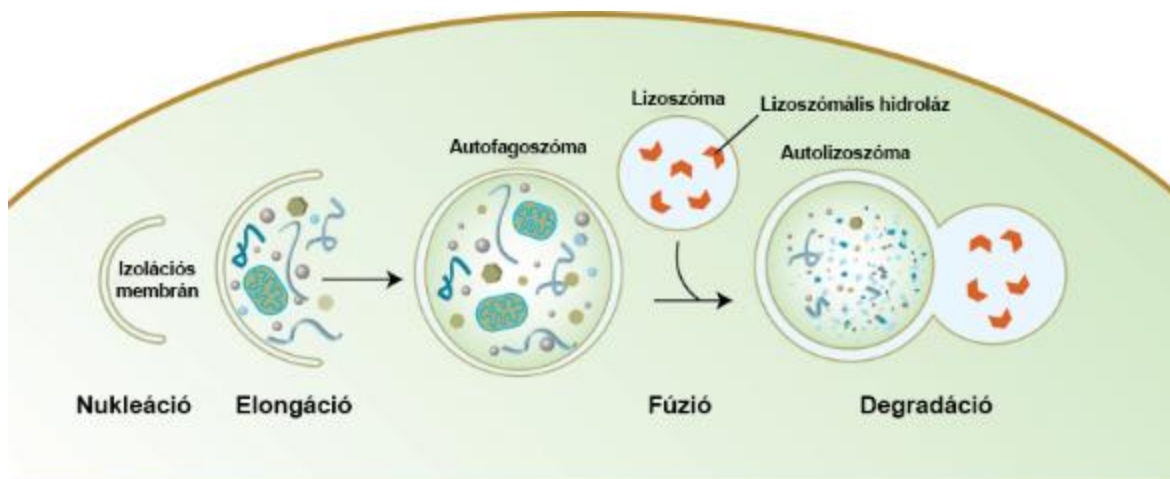


5. ábra: Az autofágia kettős szerepe a túlélésben és sejthalálban. A celluláris alkotóelemek autofágiával történő lebontása által aminosavak és zsírsavak keletkeznek, melyek egyaránt felhasználhatók protein szintézisre vagy ATP termelésre stresszes állapotokban, mint például az éhezés. Az autofágia továbbá biztosítja a protein aggregátumok és károsodott mitokondriumok eltávolítását, melyek apoptózist indukálhatnak illetve apoptotikus proteinek és toxikus ROS forrásai lehetnének. Ugyanakkor, az elhúzódó autofágia sejthalálhoz is vezethet az eltúlzott önemésztés és az apoptózis aktivációja által. Egyes vizsgálatok igazolták az autofágia túlélést elősegítő hatását többek között éhezéssel, növekedési faktor megvonással, iszkémia/ reperfüziós károsodással és különböző kémiai ágensekkel szemben. Autofágiás sejthalált figyeltek meg például hipoxia, oxidatív stressz, besugárzás, növekedési faktor megvonás, illetve lipopoliszacharidok és különböző vegyületek hatására (18).

Az autofágiának három alapvető mechanizmusát ismerjük, a makro-, a mikro- és a chaperon-közvetített autofágiát (114, 115). A makroautofágia során a degradációra szánt citoplazmatikus tartalom a lizoszómákhoz szállítódik a kettős membránnal rendelkező vezikulumok, az autofagoszómák által. Első lépésként kialakul az autofagoszóma, vagyis a citoplazma egyes komponenseit egy izoláló membrán szegregálja. Korábban úgy

gondolták, hogy az izoláló membrán az endoplazmás retikulum, vagy a Golgi-készülék membránjaiból fűződik le, a mai általános felfogás szerint viszont egy „preautofagoszómális struktúrából” (PAS) keletkezik (116). Ezt a lépést nukleációnak nevezzük. Ezt követi az elongáció folyamata, mikor az izoláló membrán növekszik, meggömbül, végül pedig záródik és így kialakul az autofagoszóma. Az autofagoszóma ezután összeolvad a primer lizoszómával és létrejön az autolizoszóma. A kialakult autolizoszómákban a lizoszómális hidrolázok az elkülönített citoplazma komponenseket lebontják, majd ezek monomerjei kikerülnek az organelumból a citoplazmába és újrahasznosulnak a sejt szintetikus folyamataiban (14). A makroautofágia egyes lépéseit a 6. ábra mutatja meg. A mikroautofágia mechanizmusának az alapja, hogy a citoplazma komponensei, elsősorban a degradálandó fehérjék közvetlenül kapcsolódnak a lizoszóma membránjához. Ez a membránterület kis betüremkedések által keletkező vezikulumok révén kerül be a lizoszóma belsejébe. Ilyen módon autofágiás típusú multivezikuláris testek alakulnak ki a sejtben. A chaperon közvetített autofágia során egy chaperon fehérje képez komplexet a lebontandó molekulával, amely a lizoszómák membránjában található receptor-szerű fehérje, a LAMP-2A segítségével jut be a lizoszómába (117, 118).

Az autofágia molekuláris mechanizmusát eredetileg élesztőtörzseken azonosították (*Saccharomyces cerevisiae*) (119), majd kiterjesztve a vizsgálatokat különböző modellorganizmusokra, többek között emlősökre is, megállapították, hogy az autofágia működéséhez nélkülözhetetlenek az úgynevezett „autophagy-related” (ATG) gének (118).



6. ábra: A makroautofágia lépéseinek sematikus ábrája. Az autofágia az izolációs membrán kialakulásával kezdődik (nukleáció). Következő lépésként az izoláló membrán nyúlik, meggörbül, végül pedig záródik és a degradációra szánt citoplazmatikus tartalmat az izoláló membrán szegregálja, így kialakul az autofagoszóma (elongáció). Az autofagoszóma ezután összeolvad a primer lizoszómával és létrejön az autolizoszóma (fúzió). Itt a lizoszómális hidrolázok az elkülönített citoplazma komponenseket lebontják (degradáció), majd ezek monomerjei kikerülnek az organellumból a citoplazmába és újrahasznosulnak a sejt szintetikus folyamataiban (18).

Az autofágia folyamatának egyik legfőbb regulátora mind humán, mind pedig rágcsáló sejtekben az mTOR kináz útvonal, mely gátolja az autofágiát abban az esetben, ha a sejt bőségesen el van látva tápanyagokkal és növekedési faktorokkal. Az mTOR aktivációhoz vezető legfontosabb szignalizációs út az inzulin/inzulin-szerű növekedési faktor jelátviteli útvonal. A növekedési faktor hiányára, vagy megvonására a sejtek autofágiával válaszolnak. Normális körülmények között az inzulin-szerű növekedési faktor kapcsolódik a sejtmembránban lévő receptorához. Ennek következtében aktiválódik a PI3K/Akt útvonal, melynek hatására a Rheb fehérje, amely az mTOR egyik legfontosabb aktivátora, kötött formájából felszabadul. Az aktív Rheb megköti az mTOR inhibitorát, az FKBP38 fehérjét. Vagyis, amíg az inzulin-szerű növekedési faktor kellő mennyiségben jelen van és hat a sejtre, addig az mTOR aktív állapotban van és gátolja az autofágiát, valamint fenntartja a sejt szintetikus folyamatainak működését és a proliferációt (120). Az mTOR komplex 1 (mTORC1) aktivációját és ebből következően az autofágia gátlását bizonyos MAPK kinázok, például az ERK is közvetíthetik (121). Egyéb fontos autofágia

regulátorok például az AMPK, ami válaszul a lecsökkent ATP szintre, gátolja az mTOR-t (122); az eukarióta transzlációs iniciációs faktor 2 α -alegysége (eIF2 α) esszenciális a tápanyag megvonás indukálta autofágia folyamatában (123); vagy a JNK kináz, mely stressz-aktiválta, összetett jelátviteli kaszkádokban vesz részt (124). A p38 MAPK kináz autofágiára kifejtett hatása nem egyértelmű, hiszen egyrészt leírták, hogy a p38 csökkenti az autofágiás fluxust és részt vesz az autofágia lipopoliszacharidok indukálta gátlásában (125), ugyanakkor igazolták, hogy a p38 MAPK gátlása nagyméretű, tökéletlen autolizoszómák felhalmozódását okozta. Valószínűsíthető, hogy a p38 kináz az autofágia utolsó, érési szakaszában játszik kritikus szerepet, melynek során az effektív autolizoszómák kialakulnak (126).

A rezveratrol a kísérleti körülményektől függően képes az autofágiát befolyásolva apoptotikus (127-129) vagy citoprotektív hatást kiváltani (13, 14). Az alábbiakban néhány olyan példát szeretnék bemutatni, ahol a rezveratrol által kiváltott citoprotektív hatásban szerepet tulajdonítottak az autofágiának.

Morselli és munkatársai azt találták, hogy a rezveratrol autofágiát indukálva képes megnövelni az élettartamot humán és fonálféreg sejtekben, a Sirtuin 1/SIR-2.1 útvonal aktiválása által (14). Egy másik tanulmányban, myocardialis iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások kivédésének lehetőségeit vizsgálták patkánymodelleket alkalmazva, s a protektív hatás kiváltásában a rezveratrol hatásosnak bizonyult. Kardioprotektív hatását az Akt/Bcl-2 túlélési útvonalat indukálva és az autofágiát fokozva váltotta ki. A tapasztalatok alapján, a rezveratrol-indukálta autofágia folyamata az mTOR útvonaltól független volt (130). Ugyanakkor, egy H9c2 embrionális patkány szívizomsejtekkel végzett vizsgálatban, hipoxiát és reoxigenizációt követően a rezveratrol az mTOR útvonal aktivációján keresztül, autofágiát indukálva fejtette ki kardioprotektív hatását (131). Egy további vizsgálatban, szintén H9c2 sejteken, a rezveratrol citoprotektív hatását tanulmányozták hidrogén-peroxiddal kiváltott oxidatív stressz ellen. A rezveratrol képes volt kivédeni a H9c2 sejtek oxidatív stressz okozta apoptózist, növelte a sejtek túlélését. A citoprotektív hatás hátterében az állt, hogy a rezveratrol a p38 MAPK útvonal aktiválása által autofágiát indukált (13).

1.3.2.3 Prekondicionálás

A prekondicionálás fogalmát Murry és munkatársai vezették be 1986-ban. Az elnevezés arra a jelenségre utal, miszerint rövid iszkémiás periódusok megvédik a szívet az ismételten fellépő, de immáron hosszabb iszkémiás inzultus káros következményeivel szemben (132). Ezt követően több olyan vizsgálatot végeztek, melyek során a prekondicionálás védő hatását exogén anyagokkal próbálták kiváltani. Mivel a rezveratrol kardioprotektív hatása ismert volt, ezzel a vegyülettel kapcsolatban is felmerült a prekondicionálás lehetősége, mint lehetséges protektív mechanizmus. Kimutatták, hogy a rezveratrol reno-, cerebro-, kardioprotektív és számos egyéb organoprotektív hatásában is fontos szerepet játszhat az iszkémiás prekondicionáláshoz hasonló mechanizmus (133-137). Ezen jelenség mögött nem egyszerűen a rezveratrol szabadgyökfogó, antioxidáns vagy gyulladáscsökkentő hatása áll, hanem számos intracelluláris jelátviteli útvonal befolyásolása is szerepet játszik a protektív hatásban. Így például az indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS), hemoxigenáz-1 (HO-1), SIRT1, MAPK kinázok vagy az NF- κ B regulációja is számottevő a rezveratrol által kiváltott prekondicionálásban (136). Feltételezhetően a rezveratrol prekondicionáló hatásában az általa kiváltott autofágia indukciónak is nagy jelentősége lehet, mely egy stressz-adaptációs folyamatként egyrészt túlélési szignál útvonalakat aktivál, másrészt a károsodott sejtalkotókat eliminálja (137).

Petrovski és munkatársai szerint a rezveratrol kardioprotektív prekondicionáló hatása dózis-függő. Alacsonyabb dózistartományban védő hatást fejt ki különböző a sejtek túlélését biztosító proteinek expressziójának fokozásával, az oxido-redukciós egyensúly fenntartásával és a kardiomiociták apoptózisának gátlásával. Magasabb dózisban a rezveratrol rontja a kardiális funkciót, fokozza az apoptotikus proteinek expresszióját valamint növeli az infarktusos terület méretét és az apoptotikus sejtek számát (137).

2. Célkitűzések

Munkám célkitűzései a következők voltak:

1. A rezveratrol protektív hatásának igazolása káros stimulussal szemben, primer sejt kultúrán
 - A rezveratrol preventív hatásának igazolása egyidejűleg alkalmazott szérumbegvonás indukálta kaspáz-3 aktivációval szemben, primer egér embrionális fibroblaszt sejteken.
 - A rezveratrol kaspáz-3 aktivációt csökkentő hatásának igazolása három órás szérumbegvonást követően történő alkalmazással, primer egér embrionális fibroblaszt sejteken.

2. A rezveratrol szérumbegvonás indukálta kaspáz-3 aktivációra gyakorolt hatásának háttérben meghúzódó folyamatok megismerése
 - A p38, JNK, ERK, PI3K és mTOR kináz útvonalak, valamint a SIRT1 enzimet érintő jelátviteli út részvételének vizsgálata.
 - Az aromás szénhidrogén és ösztrogén receptorok szerepének vizsgálata.
 - A rezveratrol antioxidáns tulajdonságának tanulmányozása a kaspáz-3 aktivációra gyakorolt hatásával összefüggésben.
 - A mitokondriális depolarizáció és a reaktív oxigéngyökök szerepének megállapítása.
 - Az autofágia jelentőségének vizsgálata a rezveratrol kaspáz-3 aktivációra gyakorolt hatásában.

3. Módszerek

3.1 Vegyületek és kezelt állatok

A rezveratrol és a kinázok gátlószerei (a PI3K-nak wortmannin, a p38 MAPK-nak SB202190, a JNK-nak SP600125 és az ERK-nek PD184352, az mTOR-nak a rapamycin), a SIRT1 gátlószer (EX-527), a fluorogén kaszpáz-3 szubsztrátot (Ac-DEVD-AMC) tartalmazó kaszpáz-3 aktivitás kit, a puffer összetevők, az N-acetilcisztein, a benzo(a)pirén, a trimetoxiflavon, a fulvesztrant, a klorokin, a tamoxifen, a klorometil-dikloro-dihidrofluorescein-diacetát (DCFDA) és a hidroetidin (HE) valamint a Western Blot reagensek, úgy mint az akrilamid/bisakrilamid 30% oldat, az ammónium-perszulfát, a tetrametilén-diamin (TEMED), a Tris-hidroximetil-aminometán (TRIS), a glicin és a tricin a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől származtak. A JC-1 kationos membrán potenciál festék kitet a ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) szállította, a β -ösztadiol-hemihidrát pedig a Richter Gedeon Nyrt. (Budapest, Magyarország) adománya volt laboratóriumunk részére. A nem-szelektív kaszpáz inhibitor Ac-VAD-CMK az AnaSpec (Fermont, CA, USA) cégtől, míg a CytoTox-One[®] laktát-dehidrogenáz kibocsátás kit a Promega (Fitchburg, WI, USA) cégtől származott.

A sejtkultúra tápoldatát a GE Healthcare (Little Chalfont, UK) valamint a Corning (Tewksbury, MA, USA), míg a főtális borjú szérumot (FBS) és a GlutaMAX[®]-ot (L-alanil-L-glutamin) a ThermoFisher Scientific szállították.

A Western Blot technikához használt polivinilidén-fluorid (PVDF) transzfer membrán és a röntgenfilmek a Santa Cruz (Dallas, TX, USA) cégtől, míg a Pierce ECL Western Blot szubsztrát a ThermoFisher Scientific cégtől származtak.

Az LC3A/B és SQSTM1/p62 primer antitesteket a Cell Signal Technology (Danvers, MA, USA), a GAPDH primer antitesteket az R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), míg a szekunder (anti-nyúl és anti-egér) antitesteket a ThermoFisher Scientific szállították.

A vizsgálatban a vegyületeket dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk és a tápoldattal elegyítettük, hogy végül 0,5%-os DMSO koncentrációt kapjunk. A kontroll sejteket megegyező koncentrációjú DMSO-val kezeltük.

Az egyes tesztvegyületeket irodalmi adatok alapján meghatározott koncentrációban alkalmaztuk a kísérletek során.

A vemhes NMRI egereket a Toxicoop, Gödöllő, Magyarország szállította. Az állatokat a Semmelweis Egyetem Állatkísérletes Etikai Bizottságának jóváhagyásával (22.1/606/001/2010, 2010. február 5.) és az Európai Tanács kísérleti és egyéb tudományos célokra felhasznált állatok védelmére vonatkozó rendelkezésének megfelelően kezeltük (86/609/EEC).

3.2 Sejtkultúra és sejtenyésztés

A vizsgálathoz nem-transzformált, primer embrionális egér fibroblasztokat használtunk melyet a CSH protokollnak megfelelően készítettünk (138). A sejteket 2 mmol/L GlutaMAX[®] oldattal és 0,08 mg/mL gentamicinnel kiegészített, 10%-os FBS tartalmú DMEM tápoldatban tenyésztettük és 37 °C, 5% CO₂ körülmények között tartottuk fenn, majd a kísérletekhez 3-7 passzázs között használtuk őket.

Egy nappal a kezelés előtt a sejteket hat centiméteres petri-csészékbe raktuk ki (3x10⁵ sejt/csésze) és másnap szérum-megvonást alkalmaztunk apoptózis kiváltása érdekében a rezveratrol, illetve a különböző jelátviteli útvonalak gátlószereinek jelenlétében, vagy hiányában. Az N-acetilcisztein, a benzo(a)pirén, a trimetoxiflavon, a tamoxifen, a fulvesztrant, az ösztradiol és a klorokin kezelés a szérum-megvonással és/vagy a rezveratrol kezeléssel egyidejűleg történt.

A “sejtmentő” hatás vizsgálatakor, három órás szérum-megvonást követően egészítettük ki rezveratrollal a sejtkultúra tápoldatot.

3.3 A kaszpáz-3 aktivitás mérése

A kaszpáz aktivitás vizsgálatához, meghatározott (3, 4,5 és 6 órás) kezelési periódusokat követően a sejteket foszfát pufferes sóoldattal (PBS) mostuk és tripszin-EDTA oldattal

szedtük fel. A citoszol kivonatot hipotóniás lízis puffer, majd 0,6% Nonidet P40 alkalmazásával készítettük, Andrews és Faller módszere szerint (139).

A rezveratrol direkt kaszpáz gátló hatásának vizsgálatára, a rezveratrolt a szérumbegvonásban részesült fibroblasztok citoszol kivonatához adtuk hozzá, közvetlenül a kaszpáz-3 aktivitás mérést megelőzően. A vizsgálathoz az Ac-VAD-CMK-t, egy nem-szelektív direkt kaszpáz inhibitor használtuk pozitív kontrollként, 20 μ M koncentrációban.

A kaszpáz-3 aktivitást a kereskedelemben elérhető kittel mértük, a gyártó utasítását követve, Fluoroskan Ascent FL Microplate spektrofluorométert (ThermoFisher Scientific) alkalmazva. A mintákhoz kaszpáz szubsztrátot (Ac-DEVD-AMC) adtunk és a szubsztrát hasítása során felszabaduló AMC fluoreszcenciáját 460 nm-en detektáltuk fluoreszcens tálca leolvasóval, 355 nm-es gerjesztés mellett.

A kaszpáz-3 aktivitást a minta Lowry módszere alapján (140) meghatározott fehérje tartalmára normalizáltuk, nmol hasított szubsztrát/mg protein/három óra egységben fejeztük ki és arányosan a kontroll értékéhez viszonyítva ábrázoltuk.

3.4 A laktát-dehidrogenáz enzim felszabadulásának mérése

A fibroblaszt sejtek életképességét a laktát-dehidrogenáz (LDH) enzim felszabadulásának mérése által, a Promega cégtől vásárolt CytoTox-One[®] kit segítségével vizsgáltuk. A mérést a kit leírásának megfelelően végeztük, a fluoreszcenciát 590 nm-en detektáltuk Fluoroskan Ascent FL Microplate spektrofluorométer segítségével, 530 nm-es gerjesztés mellett. Az adatok kiértékelése a kit leírásában javasolt módon történt.

3.5 A ROS termelődés tanulmányozása valamint a mitokondriális membránpotenciál változásának vizsgálata JC-1 festéssel

A három órás kezelési periódust követően a fibroblaszt sejteket PBS-sel mostuk és tripszin-EDTA oldattal felszedtük, majd 1 μ M HE-t, 2 μ M DCFDA-t vagy 5 μ M JC-1

festéket tartalmazó PBS-ben reszuszpendáltuk. Harminchét °C-on történő 30 perces inkubációt követően a sejtszuszpenziót lecentrifugáltuk (450g, 5 perc, szobahő), PBS-sel mostuk és Fluoroskan Ascent FL Microplate spektrofluorométer segítségével a minták fluoreszcenciáját a következő hullámhosszokon detektáltuk: DCFDA – 485 nm (gerjesztés)/538 nm (emisszió), HE – 530 nm (gerjesztés)/590 nm (emisszió), JC-1 – 485 nm (gerjesztés)/538 nm (emisszió) és 485 nm (gerjesztés)/590 nm (emisszió). A mitokondriális membránpotenciál depolarizációjának mértékét a zöld/piros emisszióintenzitás-arány segítségével adtuk meg.

3.6 A sejtben lévő savas sejtalkotók tanulmányozása akridin-narancs festéssel

A sejteket 24 lyukú szövettenyésztő lemez egy-egy edényébe elhelyezett kerek üveg fedőlemezre növesztettük, majd három órás szérum-megvonást alkalmaztunk 200 µM rezveratrol jelenlétében illetve hiányában. A kezelési idő lejártával a sejteket PBS-sel mostuk és PBS-ben hígított 1 µg/mL koncentrációjú akridin-narancssal festettük 15 percig 37 °C-on. Az inkubációt követően a fedőlemezeket PBS-sel mostuk és a sejtekről fluoreszcens felvételeket készítettünk epifluoreszcens mikroszkóp (Olympus Corporation, Tokio, Japán) segítségével.

3.7 Western Blot analízis

A kezelt és kezeletlen fibroblaszt sejt kultúrákból teljes sejt lizátumot készítettünk, majd a mintákon Western-blot analízist végeztünk. A sejt lizátum készítéséhez radioimmunprecipitációs assay (RIPA) puffert használtunk, aminek az összetétele a következő volt: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% nátrium deoxikolat és 0,1% nátrium-dodecil-szulfát (SDS). A minták teljes fehérjetartalmát Bradford módszer segítségével határoztuk meg (141). A lizátumhoz Lemmli puffert (0,1% 2-merkaptoetanol, 0,0005% brómfenolkék, 10% glicerin, 2% SDS, 63 mM Tris-HCl (pH 6,8)) adtunk és a mintát 5 percen keresztül 95°C-on tartva, denaturáltuk azt, majd 30 µg fehérjét vittünk fel az egyes zsebekbe. A mintákat 15% SDS-

poliakrilamid gélen futtattuk. Az elválasztás után a fehérjéket PVDF membránra vittük át. A membránhoz kötődött fehérjéket 0,1% Tween 20-at tartalmazó TRIS-szel pufferelt sóoldatban (TBST) oldott 2% sovány tejjel vagy 5% BSA-val blokkoltuk egy óráig. A primer antitesteket (1. táblázat) egy éjszakán át hagytuk a membránon (4°C). Másnap a membránokat TBST-vel mostuk háromszor 10 percig, ezt követően tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel (1. táblázat) inkubáltuk egy órán át, szobahőmérsékleten. Az immunreaktív sávokat, vagyis a specifikus fehérjéket kemilumineszcens módon, röntgenfilmen tettük láthatóvá Pierce ECL Western Blot reagenst alkalmazva. A fehérjeexpresszió kvantifikálásához denzitometriás analízist végeztünk az Image J szoftver segítségével (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Az eredmények kiértékelésénél az LC3-II/LC3-I denzitáсарányt alkalmaztuk, illetve a p62-specifikus sávok optikai denzitását mindig ugyanazon minták GAPDH-specifikus sávjaira normalizáltuk.

1. táblázat: Az alkalmazott antitestek tulajdonságai

Elsődleges antitestek

Az antitest specifitása	Az alkalmazott hígítás	Blokkoló anyag (TBST-ben oldva)	A faj, amiben termeltetve lett
LC3 A/B	1:1000	5% BSA oldat	nyúl
p62	1:1000	5% BSA oldat	nyúl
GAPDH	1:10000	2% sovány tejjel	egér

Másodlagos antitestek

Az antitest specifitása	Az alkalmazott hígítás	Blokkoló anyag (TBST-ben oldva)	A faj, amiben termeltetve lett
Nyúl IgG	1:2000	5% BSA oldat	kecske
Egér IgG	1:2000	2% sovány tejjel	kecske

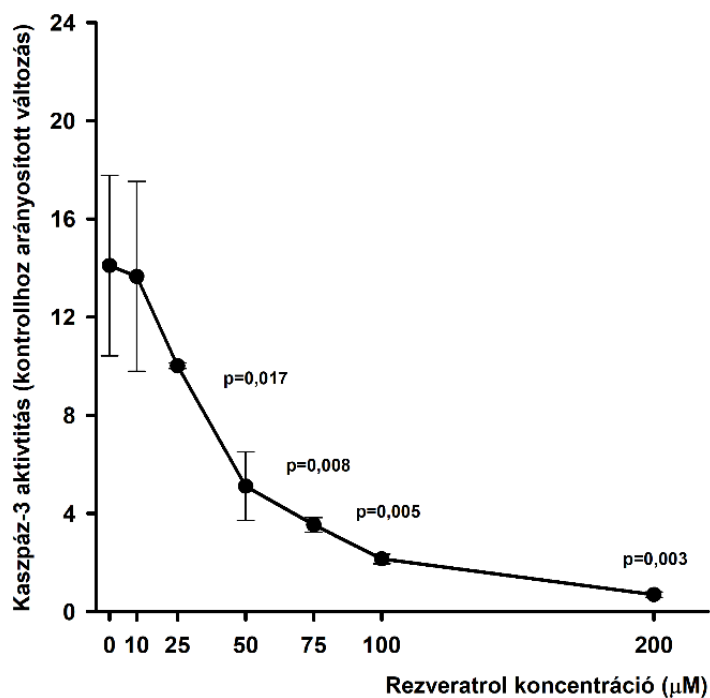
3.8 Statisztikai analízis

Az értekezésben szereplő adatokat rendre átlag \pm szórás formában adtuk meg minimum három párhuzamos mérés eredményei alapján. Az eredményeket a kontrollhoz viszonyított növekedésként ábráztuk. A statisztikai különbségek kiértékeléséhez kétmintás t-próbát vagy többszörös összehasonlítások esetén egyszempontos ANOVA-t alkalmaztunk. ANOVA esetén az egyes csoportok közötti szignifikancia meghatározását Sidac-féle *post hoc* teszt segítségével végeztük. Egy különbséget akkor tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak, ha a p értéke kisebb volt, mint 0,05. A statisztikai analízis a Prism 6.0 szoftver (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) segítségével készült. A számításokhoz és az ábrák készítéséhez a Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), a SigmaPlot 12 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) és az Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) programokat használtuk. Az egyes kísérleteket egyenként legalább háromszor megismételtük. Az ábrák az összes elvégzett kísérlet eredményeinek átlagát reprezentálják.

4. Eredmények

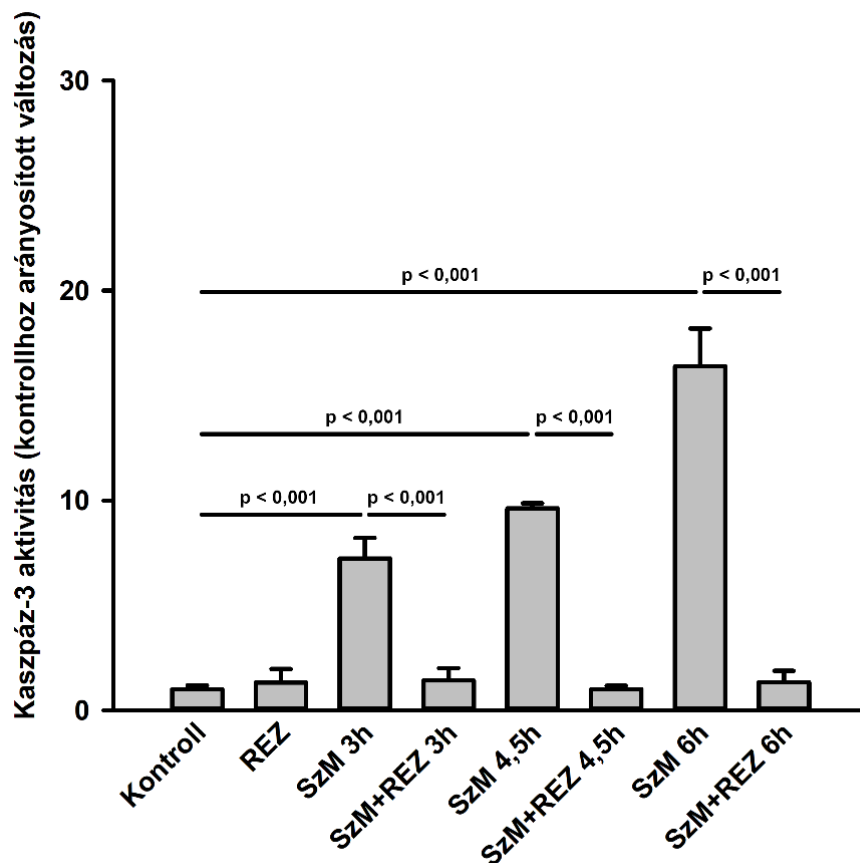
4.1 A rezveratrol hatása a szérum-megvonás indukálta kaszpáz-3 aktivációra

Primer egér fibroblasztokon a szérum-megvonás már három-hat óra alatt nagymértékű kaszpáz-3 aktivációt eredményezett ($P < 0,001$). A rezveratrol védő hatásának értékeléséhez szérum-megvonással egyidejűleg a sejteket a vegyület különböző koncentrációival (10, 25, 50, 75, 100, 200 μM) kezeltük. A rezveratrol dóziszfüggően gátolta a kaszpáz-3 aktivációt $66,3 \pm 13,81 \mu\text{M}$ -os IC_{50} értékkel. Teljes mértékű kaszpáz-3 gátlást három óra szérum-megvonást követően 200 μM -os rezveratrol koncentrációval értünk el, így a további kísérletekhez ezt a koncentrációt használtuk (7. ábra).



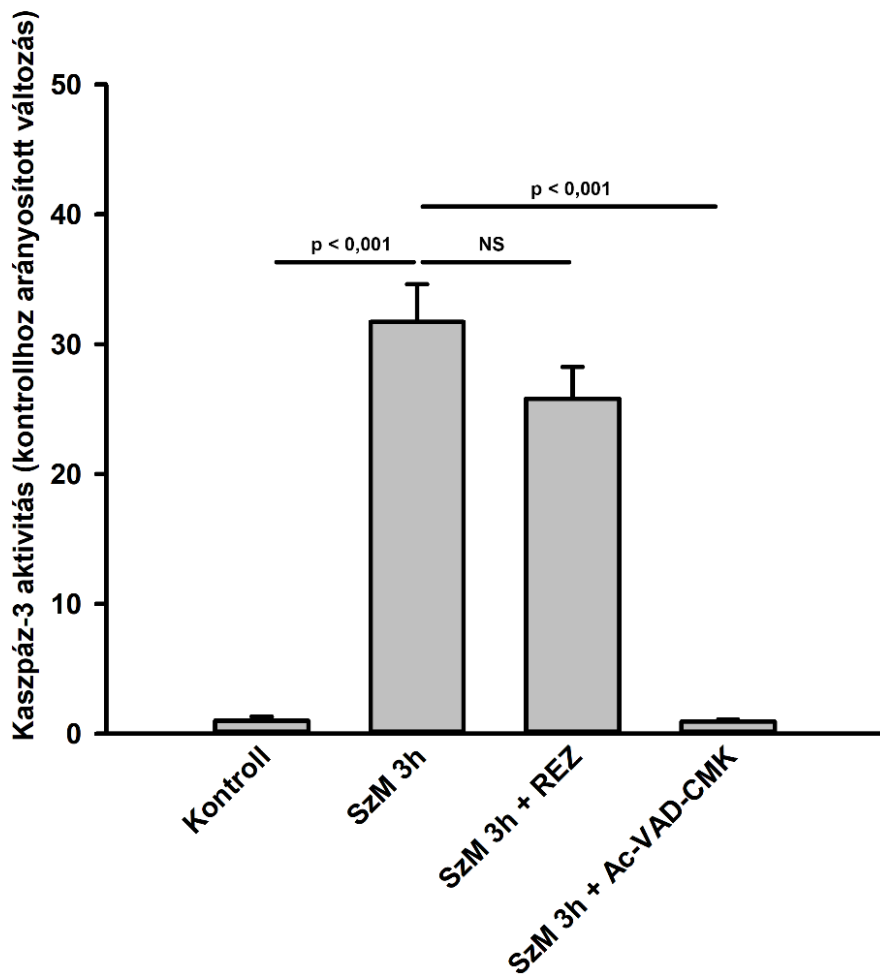
7. ábra: A rezveratrol hatása a szérum-megvonás-indukált kaszpáz-3 aktivációra. A rezveratrol dóziszfüggően gátolta a kaszpáz-3 aktivációt három óra szérum-megvonást követően. A kaszpáz-3 aktivitás kontroll értéke szérum-megvonás nélkül: $1,76 \pm 0,097$ nmol/mg/három óra. A p értékek a rezveratrollal nem kezelt, szérum megvont csoporthoz történt hasonlításra vonatkoznak.

A védő hatás még hat óra szérum-megvonás után is megfigyelhető volt (8. ábra). Mivel a szérum-megvonás által kiváltott kaszpáz-3 aktiváció és a rezveratrol védő hatása már három óra szérum-megvonást követően is szignifikáns volt, a további kísérletek során a három órás megvonást alkalmaztuk a kaszpáz-3 aktiváció kiváltására.



8. ábra: Kétszáz μM rezveratrol (REZ) hatása a kaszpáz-3 aktivációra három, négy és fél és hat óra szérum-megvonást (SzM) követően.

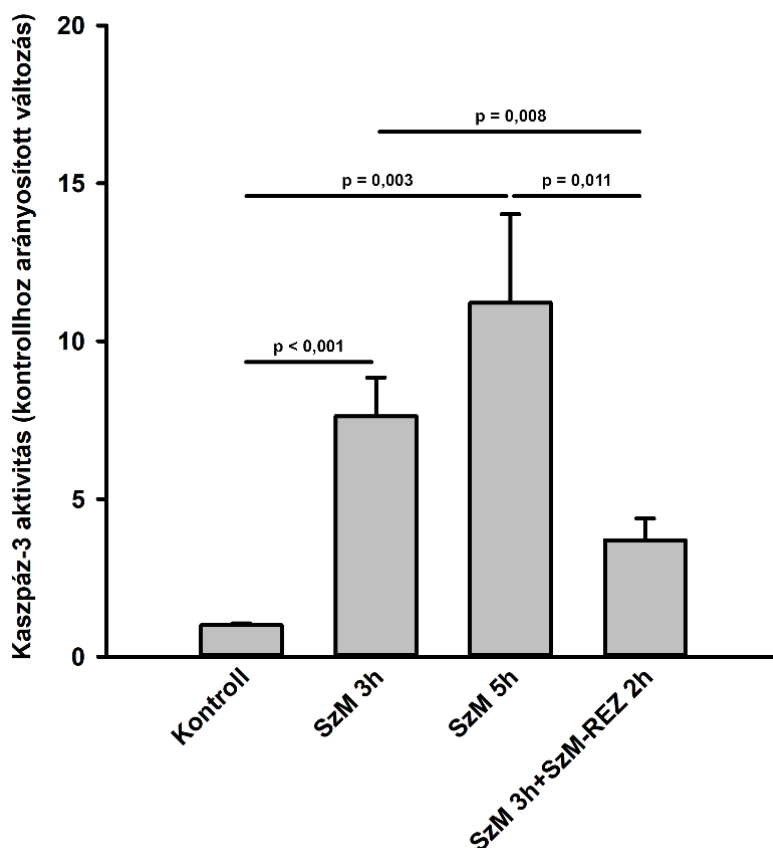
A rezveratrol direkt kaszpáz gátló hatásának vizsgálatára, a rezveratrolt nem a sejt kultúra tápoldathoz adtuk hozzá, hanem közvetlenül a szérumbegvonásban részesült fibroblasztok citoszol kivonatához. A rezveratrol ezen körülmények között direkt kaszpáz gátló hatást nem mutatott, míg a pozitív kontrollként használt nem-szelektív direkt kaszpáz inhibitor Ac-VAD-CMK teljes mértékben gátolta a kaszpáz-3 aktivitást (9. ábra).



9. ábra: A rezveratrol direkt kaszpáz gátló hatásának vizsgálata. Kétszáz μM rezveratrol (REZ) és 20 μM nem-szelektív direkt kaszpáz inhibitor Ac-VAD-CMK hatása a kaszpáz-3 aktivitásra három óra szérumbegvonást (SzM) követően, közvetlenül a szérumbegvonásban részesült fibroblasztok citoszol kivonatához hozzáadva.

4.2 A rezveratrol “sejtmentő” hatása a már aktiválódott kaszpáz-3-ra

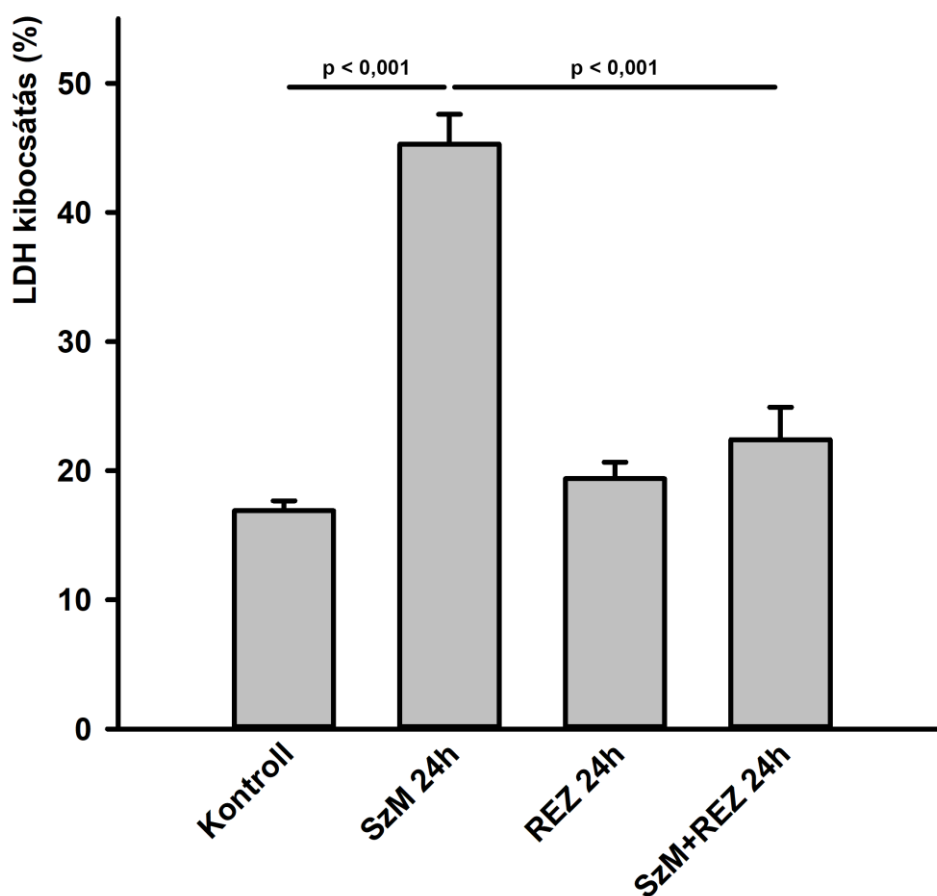
Megvizsgáltuk, hogy a rezveratrol képes-e a már aktiválódott kaszpáz-3 aktivitást csökkenteni. Három órás szérum-megvonást követően a primer fibroblasztok tápoldatát 200 μ M-os rezveratrollal egészítettük ki és további két óra várakozás után megmértük a kaszpáz-3 aktiváció mértékét. A rezveratrol ekkor is jelentősen csökkentette a kaszpáz-3 aktivitást. A vegyület nemcsak a további kaszpáz aktivációt akadályozta meg, de a kezdeti három óra szérum-megvonás után mért kaszpáz-3 aktivitást is tovább csökkentette. A kísérlet eredménye alapján feltételezhetjük, hogy a rezveratrol nem kizárólag védő, hanem sejtmentő hatással is rendelkezhet (10. ábra).



10. ábra: A rezveratrol sejtmentő hatása a kaszpáz-3 aktivációra. Kaszpáz-3 aktivitás három óra szérum-megvonást (SzM) követően történő 200 μ M rezveratrol (REZ) kezelés és további két óra várakozás után.

4.3 A rezveratrol csökkentette a szérum-megvonás hatására megnövekedett laktát-dehidrogenáz enzim felszabadulást

A fibroblasztsejtek életképességének vizsgálatára a laktát-dehidrogenáz enzim kibocsátás mértékének meghatározását alkalmaztuk, hogy megtudjuk a rezveratrol kaszpáz-3 gátló hatása együtt jár-e a sejtek életképességének javulásával. Az eredmények azt mutatták, hogy 24 óra szérum-megvonást követően csökkent a sejtek életképessége, melyet egyidejű 200 μ M rezveratrol kezelés jelentősen mérsékel (11. ábra).



11. ábra: Kétszáz μ M rezveratrol (REZ) hatása a sejtek csökkent életképességére huszonnégy óra szérum-megvonást (SZM) követően.

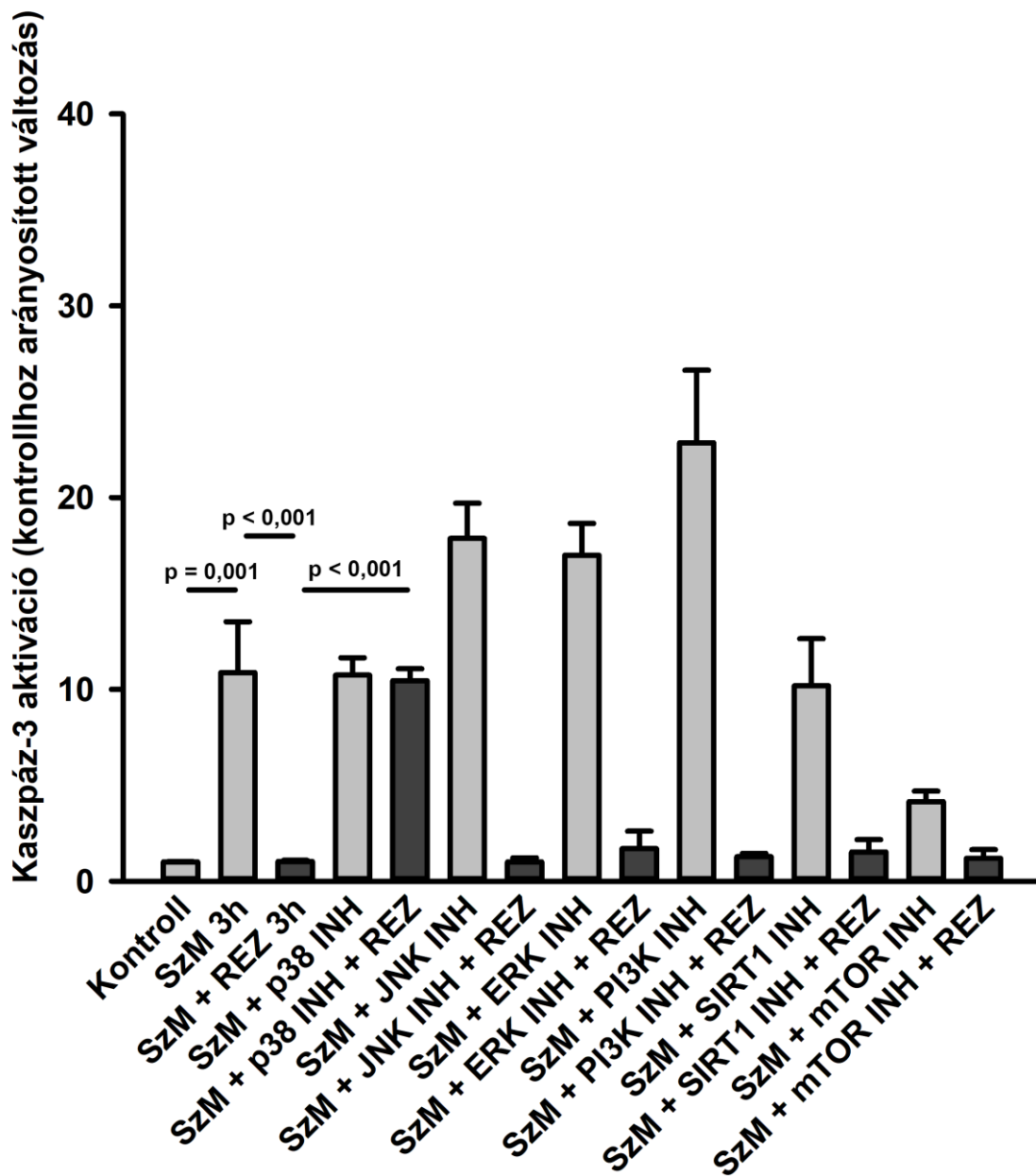
4.4 A rezveratrol kaszpáz-3 aktivációra kifejtett hatásában szerepet játszó jelátviteli útvonalak vizsgálata

Annak érdekében, hogy kiderítsük milyen jelátviteli útvonal játszik fontos szerepet a rezveratrol hatásában, p38, JNK, ERK, PI3K, mTOR kináz útvonalak és SIRT1 gátlószer jelenlétében megvizsgáltuk (2. táblázat), hogy változik-e a rezveratrol hatására a kaszpáz-3 aktiváció mértéke.

2. táblázat: A vizsgált jelátviteli útvonalak specifikus gátlószerei és azok koncentrációi.

Jelátviteli útvonal	Gátlószer	Koncentráció (μM)
p38	SB 202190	50
JNK	SP 600125	50
ERK	PD 184352	50
PI3K	Wortmannin	10
SIRT1	EX-527	5
mTOR	Rapamycin	0,1

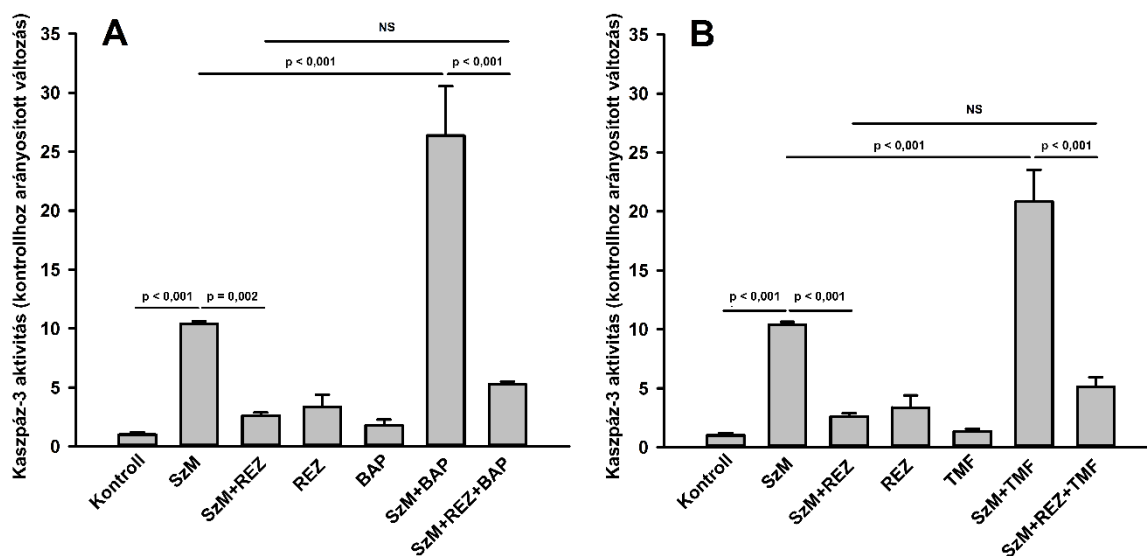
Az eredményeink alapján, az említett gátlószerek közül kizárólag a p38 MAPK gátlószere, a SB 202190 szüntette meg a rezveratrol védő, kaszpáz-3 aktivációt gátló hatását (12. ábra). Az mTOR útvonal gátlószere, a rapamycin nem volt hatással a rezveratrol protektív tulajdonságára, bár önmagában hasonló, de sokkal gyengébb preventív hatást mutatott, mint a rezveratrol, a szérum-megvonás által indukált kaszpáz-3 aktiváció tekintetében.



12. ábra: Kétszáz μM rezveratrol (REZ) hatása a három órás szérum-megvonás (SzM) indukálta kaszpáz-3 aktivációra a p38, JNK, ERK, PI3K, mTOR és SIRT1 útvonalak gátlószereinek jelenlétében.

4.5 Az aromás szénhidrogén receptor útvonal szerepének vizsgálata a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációval szemben jelentkező protektív hatásában

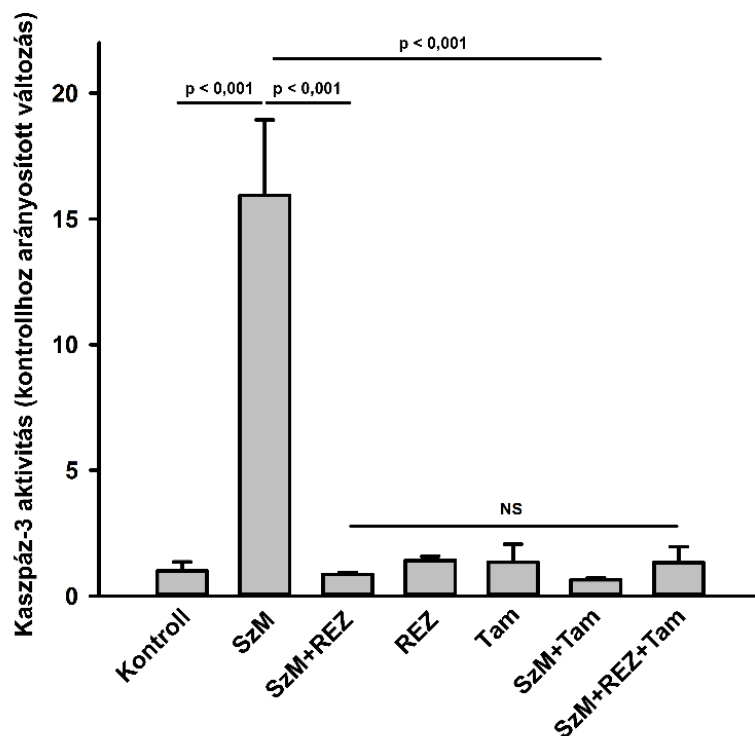
A rezveratrol protektív hatásában feltételezhetően szerepet játszó receptorok felderítése érdekében kísérleteket végeztünk a specifikus AHR agonista benzo(a)pirén és az AHR antagonistá trimetoxiflavon jelenlétében. Bár önmagában sem az AHR agonista, sem az antagonistá vegyület nem okozott releváns változást a kaszpáz-3 aktivációban, szérum-megvonás jelenlétében mindkét vegyület szignifikánsan fokozta a kaszpáz aktiváció mértékét. Mindemellett, az AHR agonista és antagonistá vegyületek a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációra gyakorolt preventív hatását csak elhanyagolható mértékben befolyásolták (13. ábra).



13. ábra: Kétszáz μM rezveratrol (REZ) hatása a három órás szérum-megvonás (SzM) indukálta kaszpáz-3 aktivációra az AHR agonista 1 μM benzo(a)pirén (BAP) [A] és az AHR antagonistá 10 μM trimetoxiflavon (TMF) jelenlétében [B].

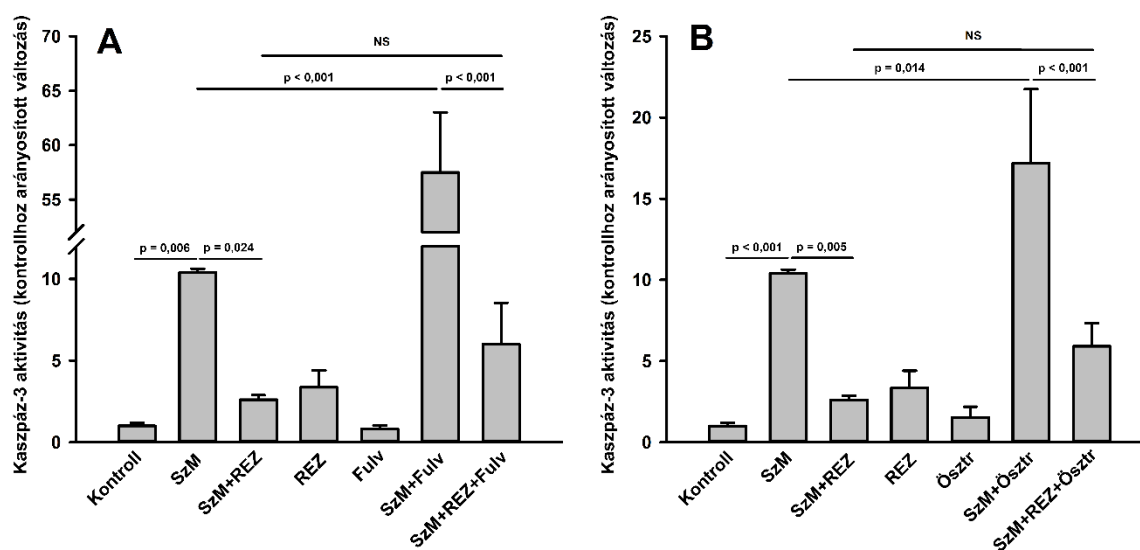
4.6 Az ösztrogén-receptor útvonal szerepének vizsgálata a rezveratrol kaspáz-3 aktivációval szemben jelentkező protektív hatásában

Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy az ösztrogén receptornak szerepe van-e a rezveratrol protektív hatásában, először az egyik leggyakrabban alkalmazott antiösztrogén vegyülettel, a tamoxifennel végeztünk kísérleteket. A mért adatok alapján, a tamoxifen nem befolyásolta a rezveratrol citoprotektív hatását, habár rezveratrol hiányában, a tamoxifen önmagában erőteljes preventív hatást mutatott a szérumbegvonás indukálta kaspáz-3 aktivációval szemben (14. ábra).



14. ábra: Kétszáz μM rezveratrol (REZ) hatása a három órás szérumbegvonás (SzM) indukálta kaspáz-3 aktivációra az antiösztrogén tulajdonságú 200 μM tamoxifen (Tam) jelenlétében.

Tovább vizsgálva az ösztrogén receptor szerepét azt találtuk, hogy a tamoxifennél szelektívebb, tiszta ösztrogén receptor antagonistául viselkedő fulvesztrant és az agonista ösztradiol egymáshoz hasonlóan viselkedtek, nevezetesen mindkét vegyület szignifikáns mértékben potenciózta a szérumbegvonást követő kaszpáz-3 aktivációt, de egyik sem befolyásolta jelentős mértékben a rezveratrol protektív hatását (15. ábra).

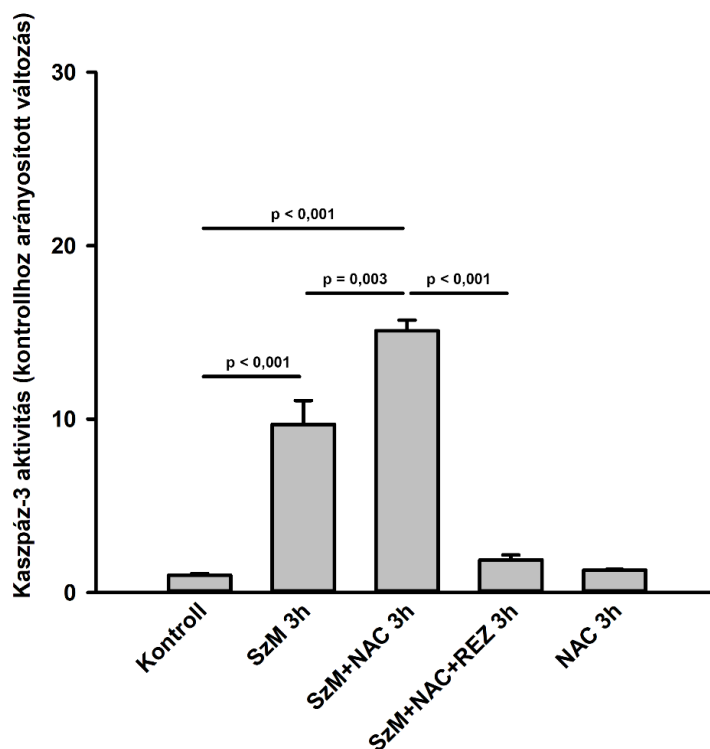


15. ábra: Kétszáz μM rezveratrol (REZ) hatása a három órás szérumbegvonás (SzM) indukálta kaszpáz-3 aktivációra a tiszta ösztrogén receptor antagonistául viselkedő 0,1 μM fulvesztrant (Fulv) [A] és az agonista 0,1 μM ösztradiol (Ösztr) jelenlétében [B].

4.7 Az antioxidáns sajátosság szerepe a rezveratrol preventív hatásában

Tekintve, hogy a p38 kináz útvonal elsősorban intracelluláris stressz hatására aktiválódik (142), és a rezveratrol pro- és antioxidáns tulajdonságát is leírták már (26), úgy gondoltuk, hogy a reaktív oxigén gyökök családjának szerepe lehet a szérum-megvonás-indukált kaszpáz-3 aktivációnak és/vagy a rezveratrol védő hatásának kialakulásában.

Annak tisztázására, hogy a rezveratrol sejtvédő hatása az antioxidáns tulajdonságának köszönhető-e, megvizsgáltuk a jól ismert antioxidáns, az N-acetilcisztein (NAC) hatását a szérum-megvonást követő kaszpáz-3 aktivációban. Várakozásainkkal ellentétben a szérum-megvonás miatt bekövetkező kaszpáz-3 aktiváció az N-acetilcisztein hatására nem csökkent, sőt még növekedett is a mértéke. Ugyanakkor, a rezveratrol képes volt az így megnövekedett kaszpáz-3 aktiváció kivédésére is (16. ábra).



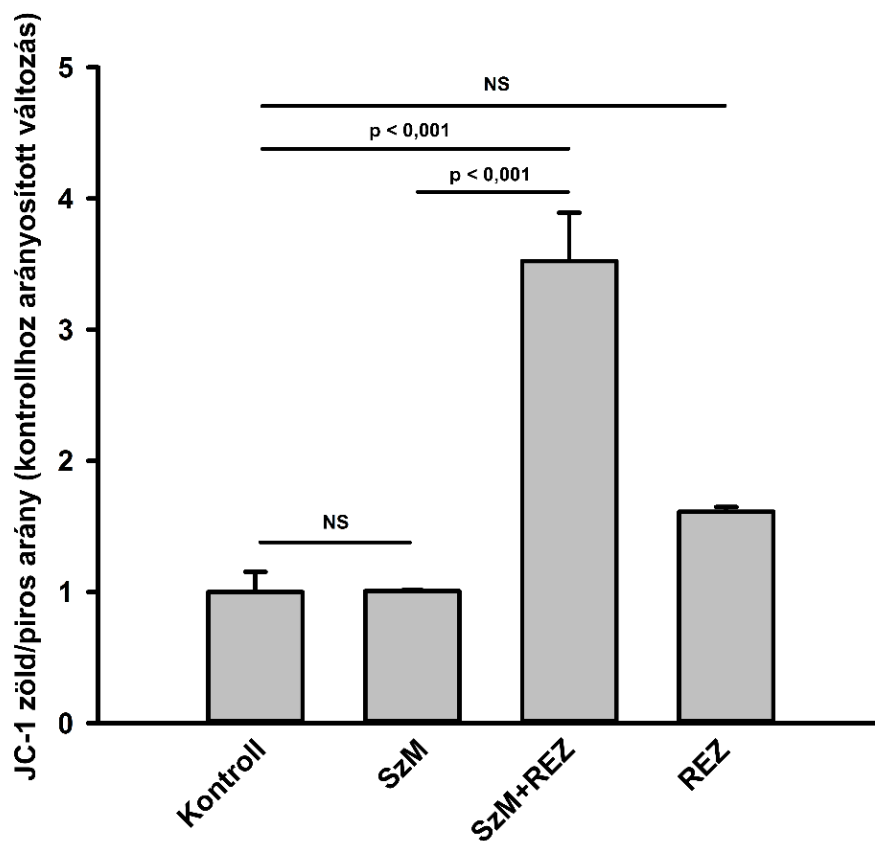
16. ábra: Kétszáz μM rezveratrol (REZ), 5 mM N-acetilcisztein (NAC) és kombinációjuk hatása a kaszpáz-3 aktivációra három óra szérum-megvonást (SzM) követően.

4.8 A mitokondrium szerepének vizsgálata a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációval szemben jelentkező protektív hatásában

A p38 jelátviteli útvonal szerepének igazolása a rezveratrol citoprotektív hatásának háttérében és az antioxidáns NAC eltérő hatása, felvetette az enyhe intracelluláris stressz jelentőségét ezen sejtvédő hatásban. Ezért a továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a mitokondriális membránpotenciál változása és a reaktív oxigén származékok (ROS) termelődése szerepet játszik-e a rezveratrol hatásmechanizmusában.

A mitokondriális membránpotenciál változást a JC-1 festék jelenlétében, fluoreszcens módszerrel mértük. A JC-1 az erősen polarizált, azaz funkcióképes és aktív mitokondriumok belsejében ún. J-aggregátumot képez; a nem funkcióképes vagy nem aktív (azaz depolarizált) mitokondriumokban pedig monomer állapotban van jelen, a festék fluoreszcens tulajdonsága ennek megfelelően változik. A JC-1 molekulák aggregált formája piros színnel jelzi a funkcióját megtartott mitokondriumokat, míg a JC-1 monomerek zöld színűek. A zöld/piros szín aránya jól jellemzi a mitokondriális membránpotenciál változást. A ROS-ok szerepét az elsősorban szuperoxidokra érzékeny HE és a főleg hidrogén-peroxidra érzékeny DCFDA fluoreszcens indikátorok jelenlétében tanulmányoztuk.

Mérési eredményeink alapján a szérumszűrés nem befolyásolta jelentősen a mitokondriális membránpotenciált és önmagában a rezveratrol is csak csekély mértékű membrán depolarizációt okozott a szérummal ellátott sejtekben. Ezzel ellentétben, szérumszűrés jelenlétében a rezveratrol szignifikánsan csökkentette a mitokondriális membránpotenciál mértékét (17. ábra). Sem a szérumszűrés, sem a rezveratrol, sem ezek kombinációja nem módosította jelentős mértékben a ROS termelődés mértékét (az adatokat nem mutatjuk).

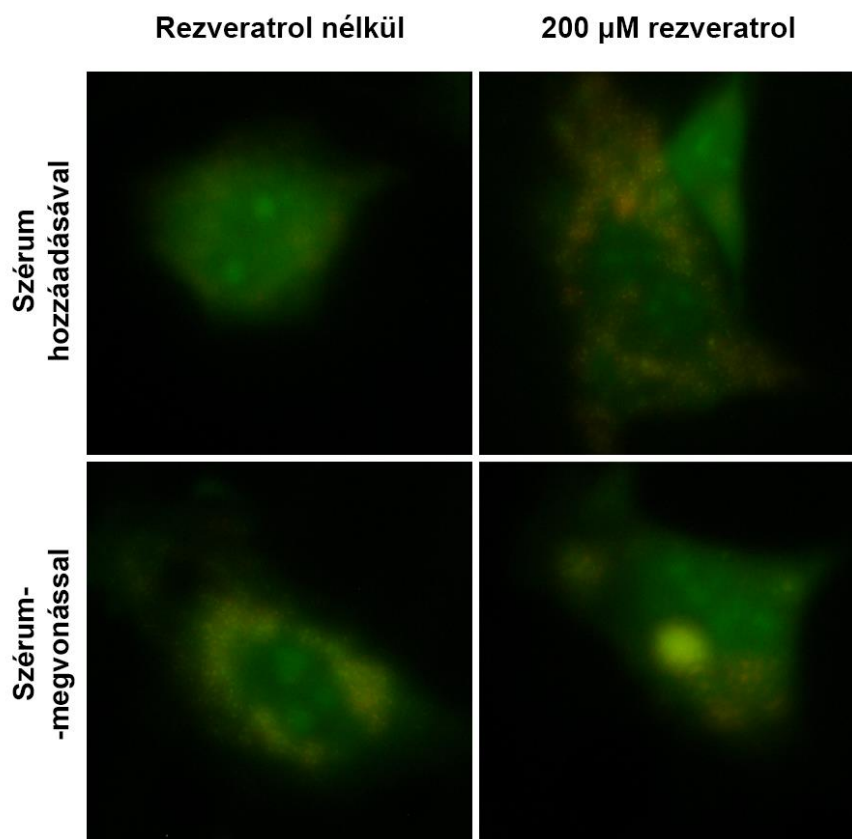


17. ábra: A szérum-megvonás (SzM), a 200 μ M rezveratrol (REZ) és kombinációjuk hatása a mitokondriális membránpotenciál depolarizációra, JC-1 fluoreszcens indikátorral történő meghatározás alapján. A megemelkedett zöld/piros fluoreszcencia arány a mitokondriális membrán depolarizációjára utal.

4.9 Az autofágia szerepének vizsgálata a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációval szemben jelentkező protektív hatásában

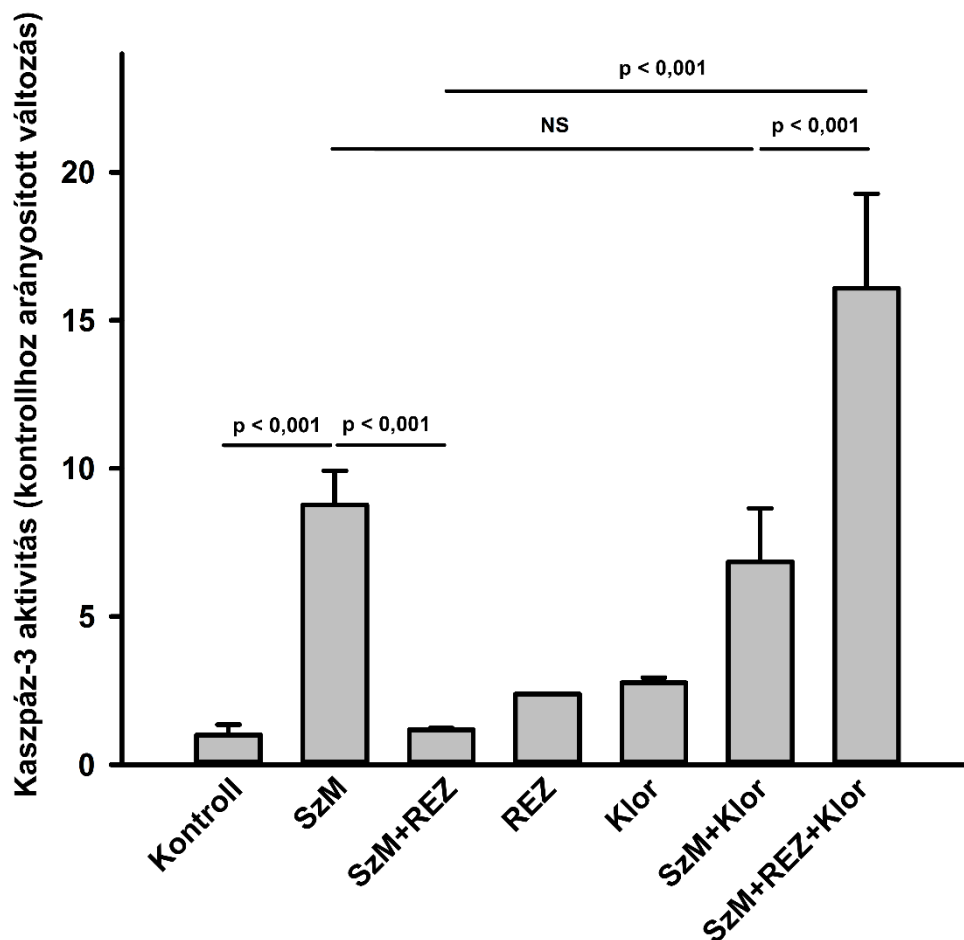
Mivel korábban már összefüggésbe hozták a rezveratrol bizonyos hatásait autofágiát indukáló tulajdonságával, a továbbiakban arra kerestünk választ, hogy a vegyület sejtvédő hatása is összefüggésbe hozható-e ezen tulajdonsággal.

A savas sejtalkotók akridin-narancs festéssel történő tanulmányozása során azt tapasztaltuk, hogy már önmagában a szérum-megvonás és a rezveratrol kezelés, illetve ezek kombinációja is növelte a savas vakuólumok számát, mely az autofagoszómák fokozott képződésére utalt (18. ábra).



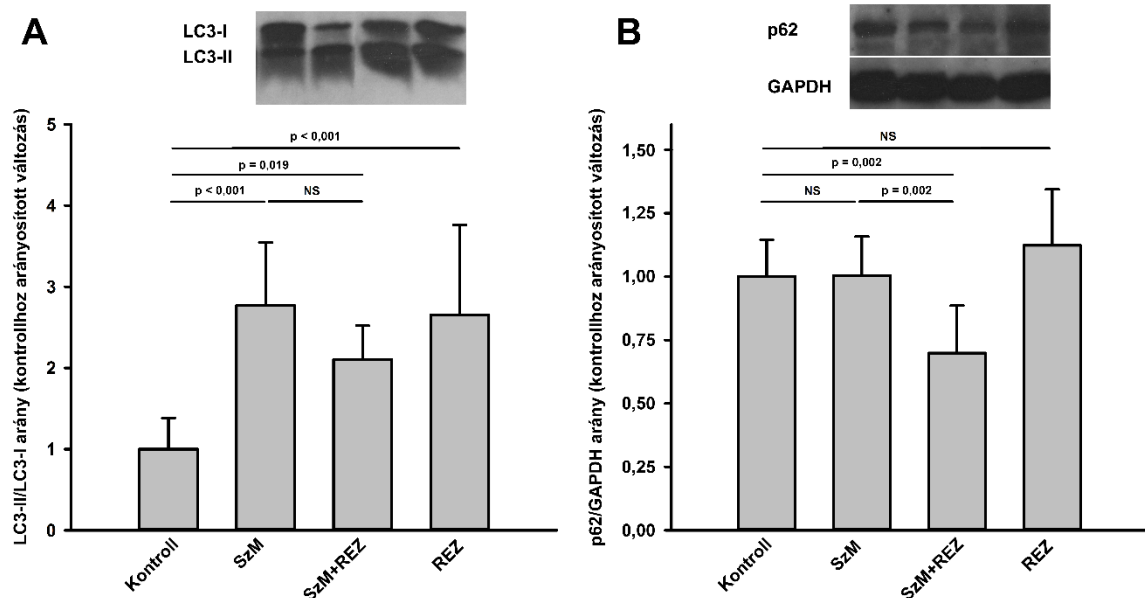
18. ábra: A rezveratrol hatása az autofágiára. A szérum-megvonás, a 200 µM rezveratrol és kombinációjuk hatása a savas vakuólumok képződésére. A sárgás-narancs pöttyök a citoplazmában a savas vakuólumokat reprezentálják.

Az autofágia szerepének további vizsgálatához, a jól ismert autofágia inhibitor vegyületet, a klorokint alkalmaztuk, mely teljes mértékben meggátolta a rezveratrol protektív hatásának megjelenését. Sőt mi több, a szérum-megvonás indukálta kaszpáz-3 aktiváció még tovább fokozódott, mikor a rezveratrolt és a klorokint egyidejűleg alkalmaztuk. A klorokin kezelés önmagában ugyanakkor nem befolyásolta a szérum-megvonás által kiváltott kaszpáz-3 aktivációt (19. ábra).



19. ábra: A rezveratrol hatása az autofágiára. Az autofágia inhibitor, 100 μ M klorokin (Klor) hatása a 200 μ M rezveratrol (REZ) protektív hatására a szérum-megvonás (SzM) indukálta kaszpáz-3 aktivációval szemben.

Ezt követően az LC3 és p62 fehérjék, az autofágia korai és kései markereinek expresszióját tanulmányoztuk Western blot technikával. Azt tapasztaltuk, hogy az LC3-II/LC3-I fehérje expressziós arány szignifikánsan megnőtt a szérum-megvonás hatására, melyet a kiegészítő rezveratrol kezelés már nem változtatott meg jelentősen. A szérum-megvonás önmagában nem befolyásolta a p62 fehérje szintjét, de rezveratrol kezelés hatására nagymértékben fokozódott a p62 fehérje degradáció a szérum-megvonásban részesült sejtekben, mely az autofágiás fluxus növekedésére enged következtetni (20. ábra).



20. ábra: A rezveratrol hatása az autofágiára. Az autofágia marker proteinek expressziója. A szérum-megvonás (SzM), a 200 μ M rezveratrol (REZ) és kombinációjuk hatása az LC3-II/LC3-I arányra [A] és a p62 protein degradációjára [B].

5. Megbeszélés

A rezveratrol apoptózisra kifejtett hatása ellentmondásosnak tűnhet, hiszen számos irodalmi adat beszámolt már antiapoptotikus tulajdonságáról, ugyanakkor citoprotektív hatása is ismert. A kettős hatás háttérében feltehetőleg a rezveratrol kezelés változó dózisa és időtartama, valamint a vizsgálatokban szereplő sejtek különböző típusa áll. A rezveratrol eltérő hatást fejt ki az apoptózisra nem-transzformált és transzformált sejtek esetében (12, 22). Az értekezésben bemutatott munka során célunk a rezveratrol sejtvédő hatásának tanulmányozása volt, ezért primer egér fibroblasztokat használtunk nem-transzformált sejtmodellként. Kimutattuk a rezveratrol védő hatását szérum-megvonás indukálta kaszpáz-3 aktiváció ellen és törekedtünk a vegyület citoprotektív hatásának háttérében meghúzódó folyamatok megismerésére. Megvizsgáltuk, hogy a rezveratrol bizonyos farmakológiai hatásaival leggyakrabban kapcsolatba hozott két receptor, az aromás szénhidrogén és ösztrogén receptorok részt vesznek-e a kaszpáz-3 aktiváció kivédő hatásában, valamint tanulmányoztuk különböző jelátviteli útvonalak (PI3-kináz/Akt/mTOR; p38 MAPK/JNK/ERK; SIRT1) szerepét is a védő hatásban. Az utóbbiak közül a p38 MAPK útvonal jelentőségét igazoltuk. Kimutattuk, hogy a rezveratrol antioxidáns hatása önmagában nem lehet magyarázata sejtvédő hatásának. Igazoltuk, hogy a mitokondriális légzési láncra kifejtett hatása és az autofágia indukció is fontos szerepet játszanak citoprotektív hatásában.

5.1 A rezveratrol hatása a szérum-megvonás indukálta kaszpáz-3 aktivációra és a sejtek életképességére

A rezveratrol hatásosnak bizonyult a szérum-megvonás indukálta kaszpáz-3 aktiváció gátlására primer embrionális egér fibroblaszt sejteken és növelte a sejtek életképességét is. Ezek az eredmények párhuzamba vonhatók korábbi kísérletek eredményeivel, melyek a rezveratrol sejtvédő hatását vizsgálták sejt kultúrában, különböző káros stimulusokkal szemben (11, 12, 20, 143). A jelen kísérletekben 200 μM -os rezveratrol koncentrációval sikerült a legnagyobb mértékű citoprotektív hatást kiváltani. A rendelkezésre álló irodalmi adatok egy részében már alacsonyabb koncentráció is elegendő volt a különböző

káros stimulusok sejtölő hatásának gátlásához. Egy kísérletben PC12 idegsejt vonalon hiperglikémiával idéztek elő glukóz-neurotoxicitást. Tíz μM -os rezveratrol előkezelés az oxidatív stressz mérséklésével gátolta az apoptózist és növelte a sejtek életképességét (71). Egy másik tanulmányban szintén PC12 sejteket vizsgálva, β -amyloid peptidekkel hozták létre a károsodást. A 25 μM -os rezveratrol előkezelés gátolta az apoptózist kiváltó hatást (144). Egy további kísérletben 20 μM rezveratrol sikeresen gátolta a bronchiális epiteliális sejtek apoptózisát 2%-os cigarettafüst kivonattal történő károsítást követően (12), és ugyanezt a hatékony dózist írták le hidrogén-peroxiddal kiváltott apoptózis esetén egér H9C2 kardiomioblasztokban (13). Ezzel szemben más tanulmányokban a jelen eredményekhez hasonlóan a legkifejezettebb citoprotektív hatást 100-200 μM -os rezveratrol koncentrációnál tapasztalták. Nyúl ízületi kondrocitasejtek esetében nitroprusszid-nátrium kezelés hatására jelentősen fokozódott az apoptózis mértéke, amelyet a 100 μM -os rezveratrol előkezelés csökkentett (27). Hasonlóképpen, RAW264.7 makrofágok vizsgálatakor szintén a 100 μM -os rezveratrol koncentráció bizonyult hatékonynak. A vizsgálatban az arterioszklerózis eseményeit modellezve, apoptózist indukáló oxidált-LDL-t adagoltak a sejtek tápoldatához. Az oxidált-LDL a makrofágok fokozott apoptózisát eredményezte és jelentősebbé vált a makrofág-habsejt átalakulás, mely hatásokat a rezveratrol előkezelés szignifikánsan mérsékelte (104). Feltételezhetően, a hatékony dózis a sejtek típusától és a károsodás intenzitásától függ.

A rezveratrol kezelés hatása az apoptózisra nemcsak a vegyület alkalmazott koncentrációjától, de a kezelés időtartamától is függ. A hatásos időtartam szintén a kezelt sejtek típusa és a károsodás mértéke alapján változik. A rezveratrol sejtvédő hatását igazoló fenti kísérletek megegyeznek abban, hogy a rezveratrolt előkezelésként alkalmazták. Mi a kísérleteinkben előkezelés helyett a rezveratrolt a szérum-megvonással egyidejűleg adtuk a sejtek tápoldatához és így igazoltuk a vegyület sejtvédő tulajdonságát. Mindemellett igazoltuk azt is, hogy ha a rezveratrolt utólag, már három óra szérum-megvonást követően adtuk a sejtekhez, a vegyület mintegy utólagos kezelésként is képes volt mérsékelni a már megemelkedett kaszpáz-3 aktivitást. Feltételezhető tehát, hogy a rezveratrol nem kizárólag védő, hanem sejtmentő hatással is rendelkezik a fokozott kaszpáz-3 aktivitás tekintetében, mely tulajdonságát, legjobb tudomásunk szerint, elsőként mi közöltük.

5.2 A rezveratrol kaszpáz-3 aktivációra kifejtett hatása mögött a p38 kináz útvonal szerepe feltételezhető

A rezveratrol különböző farmakológiai hatásai háttérében számos jelátviteli útvonal szerepe valószínűsíthető. A PI3-kináz/Akt (25, 71), a p38 MAPK/JNK/ERK jelátvitel (13, 23, 24, 104), az mTOR (131) és a SIRT1-et (10, 12, 59) érintő útvonalak mind szerepet játszhatnak a rezveratrol citoprotektív hatásában. Kísérleteink eredményei alapján a fenti jelátviteli útvonalak közül a p38 kináz szerepe igazolódott be a rezveratrol szérum-megvonást követő kaszpáz-3 aktiváció kivédésében. Jóllehet az irodalmi adatok alapján a rezveratrol p38 kinázra kifejtett hatásai meglehetősen ellentmondásosak. Leírták ugyanis, hogy a rezveratrol a p38 MAPK útvonal aktiválása által autofágiát indukált és ezáltal citoprotektív hatást mutatott hidrogén-peroxiddal kiváltott apoptózissal szemben H9c2 embrionális patkány szívizomsejteken (13). Ugyanakkor kimutatták azt is, hogy a rezveratrol a p38 útvonal down-regulációja révén volt képes érsimaizom és makrofág sejtek apoptózisának csökkentésére (104, 145). Továbbá az is ismeretes, hogy bizonyos körülmények között a rezveratrol által regulált p38 MAPK sejthalált okozó információkat is közvetíthet. JB6 limfóma sejteken például, a p38 kináz útvonalak aktivációjával a rezveratrol apoptózist indukált (105). Mindezek alapján az a következtetés vonható le, hogy a p38 kettős szereppel bír a sejt sorsát illetően, a sejt túléléséért és haláláért is felelhet. Adams és munkatársai szerint a p38 kinázok apoptózisban betöltött funkciói a vizsgált sejtípustól, a stimulus típusától és a p38 izoformától is függenek (146).

5.3 A rezveratrol lehetséges receptoriális támadáspontjainak vizsgálata citoprotektív hatásával összefüggésben

A rezveratrol bizonyos hatásai kapcsolatba hozhatók az AHR-hoz való kötődésével és sejtvédő hatását kimutatták a dioxin és egyéb AHR ligandumként számon tartott toxikus vegyületekkel szemben is, ezáltal feltételezve a citoprotektív hatás mögött esetlegesen rejlő AHR inhibitor tulajdonságot (47, 147, 148). Bár jelen kísérletben, az AHR agonista és antagonist vegyületek a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációra gyakorolt preventív hatását

csak elhanyagolható mértékben befolyásolták, érdekes módon szérum-megvonás jelenlétében mindkét vegyület szignifikánsan fokozta a kaszpáz-3 aktiváció mértékét. Ezen eredmények és korábbi tanulmányok alapján is feltételezhető, hogy valószínűleg mind az AHR agonista benzo(a)pirén, mind az AHR antagonistá trimetoxiflavon direkt befolyással bírnak a kaszpáz-3 aktivációra (149, 150), a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációt kivédő hatása viszont független az AHR-ok aktivációjától vagy gátlásától.

A rezveratrolt gyakran azonosítják úgy, mint egy ösztrogén-receptor modulátor vegyületet és számos farmakológiai hatást tulajdonítanak ezen sajátosságának, bár az erre vonatkozó irodalmi adatok és elképzelések nem egységesek. A vegyület GH3 prolaktinóma sejtekben például ösztrogén-receptor agonistaként apoptózist indukálva mutatott tumorelles hatást (54), ugyanakkor endometriális karcinómasejtekben kifejtett antiproliferatív hatását, legalábbis részben, antagonistá hatásával magyarázták (53). Molekuladinamikai szimulációkkal rávilágítottak arra, hogy a rezveratrol sokkal inkább egy szelektív ösztrogén-receptor modulátorként viselkedik és a tényleges hatása nagyban függ a celluláris környezettől és egyéb ko-regulátor proteinek jelenlététől (151). Az általunk végzett vizsgálatokban a tamoxifen nem befolyásolta a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációra kifejtett hatását, sőt a rezveratrolhoz hasonlóan képes volt kivédeni a szérum-megvonás indukálta kaszpáz aktivációt. Érdekes azonban megjegyeznünk, hogy a tamoxifen nem tisztán ösztrogén-receptor antagonistá hatású, hanem egy alacsony intrinzik aktivitással rendelkező parciális agonista vegyület, mely a fenti tulajdonságán kívül számos egyéb biológiai hatással is rendelkezik, többek között az autofágiára is befolyással van (152, 153). Az ösztrogén-receptoroknak a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációt kivédő hatásában betöltött lehetséges szerepének tisztázása érdekében a tiszta ösztrogén-receptor antagonistá fulvesztrant és agonista ösztradiol vegyületekkel is vizsgálatokat végeztünk. Az antagonistá fulvesztrant nagymértékben potenciórozta a szérum-megvonás okozta kaszpáz aktivációt, mely alapján feltételezhetjük, hogy az endogén ösztrogén egy erőteljes protektív hatással rendelkezhet a különböző ártalmas inzultusokkal szemben. Mindemellett, a fulvesztrant csupán egy enyhe, nem szignifikáns növekedést okozott a rezveratrol jelenlétében mért szérum-megvonás által indukált kaszpáz-3 aktivációban. Ez az enyhe növekedés valószínűleg azzal magyarázható, hogy a fulvesztrant olyan nagymértékben súlyosbította a szérum-megvonás indukálta kaszpáz-3 aktiváció mértékét, melyet a rezveratrol kezelés már nem volt képes teljesen

ellensúlyozni. A vizsgálat eredményei továbbá azt sugallják, hogy a rezveratrol a kaspáz aktivációt kivédő hatását az ösztrogén-receptoroktól függetlenül fejt ki. Ezt a tényt az is megerősíti, hogy az agonista ösztradiol, érdekes módon, szintén jelentősen fokozta a szérumszivódás által kiváltott kaspáz-3 aktivációt. Strom és munkatársai a fentiekhez hasonló eredményeket írtak le az ösztradiollal kapcsolatban, miszerint a vegyület dózisfüggő módon egyaránt kiválthat neuroprotektív és károsító hatást is (154).

5.4 A rezveratrol nem antioxidáns tulajdonsága révén védi ki a kaspáz-3 aktivációt

A rezveratrol antioxidáns tulajdonságáról, illetve ezzel kapcsolatba hozható citoprotektív hatásáról számos irodalmi adat beszámol (27, 71). Figyelembe kell azonban vennünk, hogy a rezveratrol prooxidáns tulajdonságait is leírták már (26, 155). Egy vizsgálatban az antioxidáns tulajdonságok helyett a rezveratrol prooxidáns tulajdonságait tartották felelősnek az antiapoptotikus hatásáért, melyet azzal magyaráztak, hogy a rezveratrol prooxidáns hatása által a kaspáz aktivációnak nem kedvező sejt-milió kialakítását eredményezi, az apoptózis végrehajtását gátló intracelluláris körülményeket teremtve (155). A szakirodalom felveti annak a lehetőségét, hogy az, hogy a rezveratrol antioxidáns vagy prooxidáns tulajdonsága érvényesül a különböző hatásai kapcsán, nagymértékben függ a rezveratrol dózisától, a kezelés hosszától és a celluláris redox státusztól. Lényegében tehát, a rezveratrol hatása különbözhet attól függően, hogy a celluláris stressz jelen van-e a vizsgálati körülmények között (40).

Jóllehet, számos közlemény számolt be arról, hogy a rezveratrol sejtvédő hatása az antioxidáns tulajdonságának köszönhető, vizsgálatainkban a szintén antioxidáns tulajdonságú N-acetilcisztein nem csökkentette, hanem növelte a szérumszivódás által indukált kaspáz aktivációt és ezt a hatást a rezveratrol kezelés megszüntette. Megállapíthatjuk tehát, hogy az N-acetilcisztein, antioxidáns tulajdonsága ellenére nem rendelkezik protektív hatással a szérumszivódás indukálta kaspáz-3 aktivációval szemben és nem befolyásolja a rezveratrol kedvező hatását. Mindezek alapján pedig az a következtetés vonható le, hogy a rezveratrol antioxidáns tulajdonsága önmagában nem lehet elég a protektív hatáshoz, egymagában nem lehet magyarázata a sejtvédő hatásának.

5.5 A mitokondriális depolarizáció és a reaktív oxigéngyökök szerepe a rezveratrol által kiváltott protektív hatásban

Korábbi vizsgálataink azt igazolták, hogy a rezveratrol szérum-megvonás okozta kaspáz-3 aktivációt kiédő hatásában a p38 MAPK stressz kináz kritikus szerepet játszik. A p38 útvonal szerepe jól ismert a magas ozmolaritás és a reaktív oxigéngyökök által kiváltott stresszválasz közvetítésében, ezért megvizsgáltuk a mitokondriális diszfunkció és a ROS termelődés szerepét, mint a celluláris stressz lehetséges forrásait a rezveratrol citoprotektív hatásában. Azt találtuk, hogy sem önmagában a szérum-megvonás, sem a rezveratrol nem befolyásolták a mitokondriális membránpotenciált, viszont együttes alkalmazásuk esetén a rezveratrol szignifikáns mitokondriális depolarizációt okozott a szérum-megvonásban részesült sejtekben. Eredményeink összhangban állnak azzal a korábban közölt megállapítással, miszerint a rezveratrol a mitokondriális légzési lánc funkciójára is hatással van. Ugyanakkor, mint sok más hatásában, a rezveratrol mitokondriumot befolyásoló tulajdonságában is megjelenik egyfajta kettősség. Egyrészt leírták, hogy a rezveratrol egy összetett mechanizmus által képes fokozni a mitokondriális biogenezist és ezáltal például a diabétesz esetén vagy az öregedés folyamán megfigyelhető mitokondriális funkciókárosodást helyreállítani, ami citoprotektív hatású lehet (11, 19, 20, 61). Másrészt Gueguen és munkatársai viszont azt tapasztalták, hogy *in vitro* a rezveratrol alacsony dózisban stimulálta, míg magasabb dózisban inkább gátolta az I. komplex aktivitását. *In vivo*, fiatal egereket vizsgálva a rezveratrol fokozta az agyi mitokondriumokban az I. komplex működését, a légzési lánc működésének befolyásolása nélkül. Ugyanakkor idősebb, már kisebb antioxidáns védekezőképességgel rendelkező egerek esetében a rezveratrol kezelés aktiválva az I. komplexet, oxidatív stressz kialakulásához vezetett (40). Ezen eredmények megerősítették az alkalmazott koncentráció és életkor jelentőségét a rezveratrol kezelés mitokondriumra kifejtett hatása szempontjából.

Jóllehet, a mitokondriális diszfunkcióra úgy tekintenek, mint a ROS képződés legfőbb forrására, az értekezésben bemutatott kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy sem a szérum-megvonás, sem a rezveratrol kezelés, továbbá a kettő kombinációja sem okozott szignifikáns változást a ROS termelődésben, a kimutatott mitokondriális membrán depolarizáció ellenére sem. Eredményeinket magyarázhatja egy ellensúlyozó

mechanizmus, nevezetesen a vegyület direkt antioxidáns hatása, ami kompenzálja a mitokondriális károsodás által kiváltott ROS képződést. Lehetséges, hogy a kompenzáló mechanizmus révén a rezveratrol által indukált intracelluláris stressz egy olyan alacsony tartományban tartható, ami már képes bizonyos citoprotektív folyamatok aktiválására, mint például az autofágia, anélkül, hogy direkt celluláris károsodást okozna. Ez a folyamat az iszkémiás prekondicionálás hatására emlékeztethet, hiszen a rezveratrol egy enyhe károsodást okozva növeli a sejtek stressztűrő képességét. Ezt az elképzelést látszik alátámasztani az a megfigyelés is, hogy különböző szignál transzdukciós útvonalak, többek között a rezveratrol protektív hatásában vizsgálataink alapján kritikus szerepet játszó p38 kináz útvonal is részt vesz a prekondicionálás molekuláris mechanizmusában (156).

5.6 Az autofágia szerepe a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációt kivédő hatásában

A mitokondriális membrán depolarizációt és a p38 kináz útvonal aktivációját gyakran összefüggésbe hozzák az autofágia jelenségével. Továbbá, mind a kísérleteinkben a rezveratrolhoz hasonlóan viselkedő tamoxifenről, mind magáról a rezveratrolról is számos alkalommal leírták már, hogy befolyásolni képesek az autofágiát. Mindezek alapján megvizsgáltuk, hogy szerepe lehet-e az autofágiának a rezveratrol szérum-megvonás indukálta kaszpáz-3 aktivációt kivédő hatásában (13, 14, 152, 153, 157). Az autofágia alkalmas citoprotektív hatás közvetítésére és a károsodott sejtorganellumok eliminálása révén erősíteni tudja a sejtek stressztűrő képességét. Primer hepatocitákban például a p38 útvonal által aktivált autofágia hozzájárult a sejtek túléléséhez, dasatinib indukálta hepatotoxicitás esetén (158). Özofageális keratinocita sejtekben, gyulladáso stressz helyzetben szintén citoprotektív mechanizmusként funkcionált az autofágia az epiteliális redox egyensúly fenntartása által (159).

Kísérleteinkben az autofágia kései fázisát, az autofagoszóma és a lizoszóma közötti fúziót gátló klorokin (160) jelenlétében teljes mértékben megszűnt a rezveratrol gátló hatása a szérum-megvonás okozta kaszpáz aktivációval szemben, mely az autofágia fontosságára utal a rezveratrol citoprotektív funkciójában. Ráadásul, a klorokin nemcsak hogy megszüntette, de át is fordította a rezveratrol védő hatását a kaszpáz-3 aktivációval

szemben, hiszen a rezveratrollal és szérumszivonással egyidejűleg alkalmazott klorokin kezelés esetén magasabb szintű kaspáz aktiváció volt tapasztalható, mint az önmagában alkalmazott szérumszivonás esetén. Rezveratrol nélkül a klorokin ugyanakkor sem önmagában, sem a szérumszivonással együtt nem befolyásolta jelentősen a kaspáz-3 aktiváció mértékét. Ez arra utal, hogy autofágia hiányában a rezveratrol protektív hatása valószínűleg átfordul egy inkább károsító irányba, ami összhangban áll a feltételezett prekondicionálás-szerű mechanizmussal. A savas sejtalkotók akridin-narancs festéssel történő tanulmányozása során azt találtuk, hogy már önmagában a szérumszivonás és a rezveratrol kezelés, illetve ezek kombinációja is növelte a savas vakuólumok számát, mely szintén alátámasztja az autofagoszómák fokozott képződését a sejtekben.

Az autofágia részvételét a rezveratrol sejtvédő hatásában sikerült megerősítenünk a mikrotubulus-asszociált protein 1 könnyű lánc 3 (LC3) és a sequestosome 1 (SQSTM1, más néven p62) proteinek mennyiségének meghatározása során is, melyek az autofágia korai és késői szakaszának legfőbb markerei. Az autofágia korai szakaszának, az izolációs membrán és az autofagoszóma kialakulásának egyik kritikus lépése az LC3-I átalakulása LC3-II-vé. Az LC3 citoszolikus formája, az LC3-I, kovalensen konjugálódik a foszfatidil-etanolamin lipidhez, ami az LC3-II kialakulásához vezet, mely kapcsolódik az izolációs membránhoz, így az növekedik és magába zárja a degradálandó anyagot, kettős membránnal határolt vezikulát, az autofagoszómát alkotva. A megemelkedett LC3-II fehérjemennyiség vagy LC3-II/LC3-I arány tehát egyértelműen utal az autofagoszómák akkumulációjára, mely következménye lehet fokozott képződésüknek, csökkent lebomlásuknak vagy mindkettőnek egyszerre (161). A p62 fehérje degradációjának vizsgálatával az autofágiás fluxus nyomon követésére nyílik lehetőség, mely a teljes autofágiás folyamat dinamizmusát jellemzi. A p62 fehérje kapocsként funkcionál az autofagoszóma és az ubiquitinált fehérjék között, elősegíti az ubiquitinált szubsztrátok degradációját, miközben ő maga is lebomlik (162). A kísérleti eredményeink azt mutatták, hogy a szérumszivonás önmagában is fokozta az autofagoszóma képződést, de mindezt nem kísérte az autofágiás fluxus növekedése. A rezveratrol szérumszivonás jelenlétében ez utóbbi folyamatot befolyásolta, melyet a p62 megnövekedett degradációja jelzett. Mindez arra utal, hogy a rezveratrol az autofágia kései fázisát fokozza és ez vezethet citoprotektív hatásához. Corcelle és munkatársai

korábban arra a megállapításra jutottak, hogy a p38 kináz gátlása leginkább az autofágia kései, érési szakaszának végbemenetelét akadályozza meg (126). Ez egybevághat megfigyeléseinkkel, miszerint a rezveratrol p38-dependens úton, autofágiát indukálva védi ki a szérum-megvonás okozta kaspáz aktivációt. Hippokampális HT22 neuronsejtek esetében is megfigyelték, hogy a szérum-megvonás indukálta sejthalál során az LC3-II/LC3-I arány szignifikánsan megemelkedett, de az autofágia gátlása sokkal inkább ártalmas, mintsem protektív következményekkel járt (163), hasonlóan a mi megfigyeléseinkhez. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a szérum-megvonás következményeként fokozódó autofágia egy ellenregulációs mechanizmusként funkcionál, melynek célja a károsodások eliminációja, de ez valószínűleg mégsem elegendő ahhoz, hogy az apoptotikus folyamaton felülkerekedjen. Az autofágia további facilitációja tehát feltehetőleg citoprotektív hatást válthat ki, az apoptózis aktiváció ellensúlyozása által. A rezveratrol elképzelhető, hogy ilyen módon, az autofágiás fluxus facilitációja révén képes erősíteni a citoprotektív mechanizmus hatását. Hasonló megállapításra jutottak Lv és Zhou egy másik típusú sejtmodellt alkalmazva, mely további megerősítésként szolgálhat azzal kapcsolatban, hogy az autofágia indukció fontos szerepet tölt be a rezveratrol citoprotektív hatásában. A szerzők arról számoltak be, hogy H9c2 kardiomiocitákban, a rezveratrol protektív hatását az oxidatív stressz okozta károsodással szemben, az autofágiát fokozva és a p38 MAPK útvonal aktivációja által fejtette ki (13).

Korábban feltételezték, hogy a rezveratrol az AMPK foszforilációt elősegítve indukál autofágiát az enyhe mitokondriális károsodás következtében fellépő ATP szint csökkenést követően és az autofágia előidézése által képes kivédeni a sejthalált (164-166). Továbbá az is ismeretes, hogy a p38 MAPK képes fokozni az AMPK aktivációt (167, 168), tehát ezek a megállapítások mind összefüggésbe hozhatók a mi eredményeinkkel és feltételezésünkkel, miszerint a rezveratrol által kiváltott enyhe intracelluláris stressz fokozza az AMPK/p38 útvonal indukálta autofágiát, citoprotektív hatást eredményezve.

Patkány PC12 pheochromocytoma sejtek neurotoxinnal történő károsítása esetén a rezveratrol szintén autofágia indukció által csökkentette a károsodás mértékét. Ebben a kísérleti modellben a SIRT enzimet azonosították, mint az autofágiával összefüggő citoprotektív hatáshoz vezető útvonalát (169). Hasonlóképpen, humán köldökvéna

endotél (HUVEC) és hippokampusz HT22 sejtekben is a SIRT enzim jelentőségét igazolták a rezveratrol által megnövelt autofágiás fluxus és az ennek következtében kiváltott védő hatás hátterében, oxidált LDL és endoplazmatikus retikulum stressz indukálta károsítással szemben (170, 171). Fontos azonban megjegyezni, hogy az általunk végzett vizsgálatok során a SIRT-1 inhibitor nem volt képes megakadályozni a rezveratrol kaszpáz-3 aktivációt kivédő hatását, mely arra enged következtetni, hogy a rezveratrol citoprotektív hatásában szereplő szabályozó útvonal típusa nagymértékben függhet a vizsgált sejtípustól és/vagy a károsító hatás fajtájától.

A rezveratrol citoprotektív hatását mTOR kináz útvonalat befolyásoló hatásával is összefüggésbe hozták már (131), valamint köztudott, hogy az mTOR útvonal kulcsszerepet játszik az autofágia regulációjában (120, 121). Vizsgálataink eredményei alapján, bár a szelektív és potens mTOR inhibitor rapamycin szintén csökkentette a szérum-megvonás indukálta kaszpáz aktivációt, hatása viszont csak részleges volt. Mindezen eredmények további megerősítésként szolgálnak az autofágia indukció protektív hatásával kapcsolatban, viszont arra engednek következtetni, hogy a rezveratrol a preventív hatását egy mTOR-független útvonalon keresztül fejt ki. Fontos azonban ismét megjegyezni, hogy az mTOR útvonalon kívül, a stresszkinázok is bizonyítottan részt vesznek az autofágia indukcióban (172), mely teljes összhangban áll saját eredményeinkkel, ami alapján döntő szerepet tulajdoníthatunk a p38 kináz aktivációnak a rezveratrol kaszpáz aktivációt kivédő hatásában.

6. Következtetések

A jelen munka során célunk volt a rezveratrol protektív hatásának igazolása káros stimulussal egyidejűleg és azt követően alkalmazva, primer sejt kultúrán, valamint a sejtvédő hatás hátterében meghúzódó folyamatok megismerése.

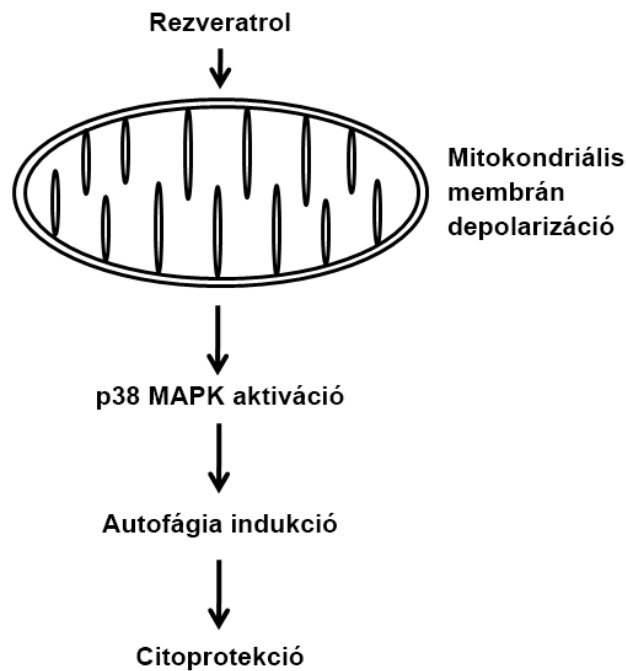
Kísérletünkben igazoltuk a rezveratrol sejtvédő hatását a szérum-megvonás indukálta kaspáz-3 aktivációval szemben primer, nem-transzformált egér embrionális fibroblaszt sejteken. A rezveratrol dózisfüggően gátolta a kaspáz-3 aktivációt és növelte a sejtek életképességét is. Teljes mértékű kaspáz-3 gátlást három óra szérum-megvonást követően 200 μM -os rezveratrol koncentrációval értünk el. Bizonyítottuk, hogy a rezveratrol nemcsak protektív, hanem sejtmentő tulajdonsággal is rendelkezik, hisz a már aktiválódott kaspáz-3 működését is jelentősen mérsékelte.

A rezveratrol kaspáz-3 aktivációt kivédő hatásának hátterében álló folyamatokkal kapcsolatos kísérleteink eredményei alapján az alábbi következtetéseket vontuk le:

- A citoprotektív folyamat hátterében a p38 MAPK aktiválódásának jelentősége igazolt.
- Az AHR és ösztrogén receptorok nem játszanak szerepet a rezveratrol kaspáz-3 aktivációt kivédő hatásában.
- A rezveratrol antioxidáns tulajdonsága önmagában nem lehet elég a protektív hatáshoz.
- A rezveratrol szérum-megvonással történő együttes alkalmazása esetén szignifikáns mitokondriális depolarizációt okozott, melyet azonban nem követett jelentős változás a ROS termelésben. Az eredmények feltehetőleg a rezveratrol direkt antioxidáns hatásával összefüggésbe hozható ellensúlyozó mechanizmussal magyarázhatók, ami kompenzálhatja a mitokondriális károsodás által kiváltott ROS képződést.
- A szérum-megvonás önmagában is fokozta az autofagoszóma képződést, de mindezt nem kísérte az autofágiás fluxus növekedése. A rezveratrol fokozta az autofágia kései fázisát. A szérum-megvonás következményeként fokozódó autofágia feltehetőleg egy ellenregulációs mechanizmusként funkcionál,

melynek célja a károsodások eliminációja, de ez valószínűleg nem elegendő ahhoz, hogy az apoptotikus folyamaton felülkerekedjen. Az autofágia rezveratrol által történő további facilitációja tehát feltehetőleg citoprotektív hatást válthat ki, az apoptózis aktiváció ellensúlyozása által.

Mindez felveti egy, az iszkémiás prekondicionálás hatására emlékeztető folyamat lehetőségét a rezveratrol protektív hatásának hátterében, melynek során a rezveratrol egy enyhe mitokondrium károsodást és ezáltal intracelluláris stresszt okozva növeli a sejtek stressztűrő képességét. A reaktív oxigéngyökök által kiváltott stresszválaszt közvetítő p38 útvonal aktivációja összefüggésbe hozható az autofágia jelenségével. Elképzelhető, hogy a rezveratrol direkt antioxidáns hatása révén, a saját maga által indukált intracelluláris stressz egy olyan alacsony tartományban tartható, ami a p38 MAPK aktiváció révén, már képes bizonyos citoprotektív folyamatok aktiválására, mint például az autofágia, anélkül, hogy direkt celluláris károsodást okozna. A rezveratrol szérumbegvonás indukálta kaspáz-3 aktivációt kivédő hatása mögött feltételezett mechanizmus grafikus összefoglalóját a 21. ábra mutatja be.



21. ábra: A rezveratrol szérum-megvonás indukálta kaszpáz-3 aktivációt kivédő hatása mögött feltételezett mechanizmus összefoglalása. Az elméletünk szerint, a rezveratrol enyhe mitokondrium károsodást és ezáltal intracelluláris stresszt okoz. Ez az intracelluláris stressz azonban feltételezhetően a rezveratrol direkt antioxidáns hatása révén egy olyan alacsony tartományban tartható, ami már képes bizonyos citoprotektív folyamatok aktiválására, mint például az autofágia, anélkül, hogy direkt celluláris károsodást okozna. Feltételezzük, hogy a rezveratrol által kiváltott enyhe intracelluláris stressz hatására a p38 MAPK útvonal aktiválódik, ami képes autofágiát indukálva citoprotektív hatást kiváltani.

7. Összefoglalás

A rezveratrol egy farmakológiailag rendkívül sokszínű vegyület, melynek többek között apoptózist befolyásoló, mind pro-, mind antiapoptotikus hatását is leírták már.

Jelen munkában igazoltuk a rezveratrol preventív hatását a szérum-megvonás indukálta kaszpáz-3 aktivációval szemben, primer, nem-transzformált sejteken. A rezveratrol dózisfüggő citoprotektív hatást mutatott és a sejtek életképességét is növelte. A vegyület sejtmentő hatást is mutatott, hiszen a szérum-megvonást követően, utólag alkalmazva a már megnövekedett kaszpáz aktivitást is képes volt lecsökkenteni. A citoprotektív folyamat hátterében a p38 MAPK aktiválódásának jelentőségét igazoltuk. A receptorális támadáspontok vizsgálata során azt találtuk, hogy védő hatását az AHR és az ösztrogén receptoroktól függetlenül fejti ki. Kísérleti eredményeink alapján, antioxidáns sajátsága önmagában nem magyarázta kaszpáz aktivációt kivédő hatását. Bár szérum-megvonással egyidejűleg alkalmazva a rezveratrol szignifikáns mitokondriális membrán depolarizációt okozott, a ROS termelésben nem tapasztaltunk jelentős változást. Azt találtuk továbbá, hogy a rezveratrol az autofágia kései fázisát fokozta, az autofágiás fluxust növelve.

A hatásmechanizmus vizsgálata alapján tehát feltételezhetjük, hogy a rezveratrol a szérum-megvonásban részesült primer fibroblaszt sejtekben enyhe mitokondriális károsodást és ezáltal intracelluláris stresszt okozva, egy p38-függő útvonalon keresztül autofágiát indukál, mely a károsodott, diszfunkcionális sejtalkotók eliminálása révén megvédi a sejteket az apoptózistól. Ez a hipotézis magyarázatul szolgálhat egyes, a rezveratrol pro- és antiapoptotikus hatásaival kapcsolatos ellentmondásra is. Elképzelhető, hogy a rezveratrol elsődlegesen egy enyhe károsodást okoz a sejtben, ami egyaránt eredményezheti különböző stresszrezisztencia útvonalak potencírozását vagy egy direkt citotoxikus hatást, az aktuális kísérleti körülményektől, így például az alkalmazott dózistól, a vizsgált sejtípustól, a károsító behatás intenzitásától vagy a mitokondriális redox státusztól függően.

Kutatási eredményeink tehát igazolták, hogy a rezveratrol értékes citoprotektív tulajdonságokkal rendelkezik, aminek alapján ígéretes vezér molekula lehet a degeneratív betegségek kezelését célzó új gyógyszer-molekulák kutatásához.

8. Summary

Resveratrol was reported to possess multiple pharmacological properties including both proapoptotic and antiapoptotic effects.

In our present research, we have demonstrated that resveratrol protects primary non-transformed cells against serum deprivation induced caspase 3 activation. Resveratrol dose-dependently prevented caspase activation and improved cell viability. It also reduced the already up-regulated caspase 3 activity when it was added to the cell culture medium after 3 hour serum deprivation, suggesting its rescue effect. Among the major signaling pathways, p38 kinase was critical for the protective effect of resveratrol. We found that neither aromatic hydrocarbon receptors nor estrogen receptors play an important role in the cytoprotective effect of resveratrol. Based on our findings, antioxidant properties of resveratrol alone cannot explain its protective action. In the presence of serum deprivation resveratrol, induced a significant depolarization of the mitochondrial membrane. However, reactive oxygen species production was not significantly altered by either serum deprivation or resveratrol treatment. Resveratrol was found to be able to augment the late phase of autophagy and thus promote the autophagic flux.

Based on our present data we can hypothesize that resveratrol causes a mild mitochondrial damage and intracellular stress in serum deprived primary fibroblasts, which can induce autophagy via p38 dependent pathway and protect cells from apoptosis by removing dysfunctional cell constituents. Our present hypothesis might explain some of the contradictory data regarding the pro- and anti-apoptotic effect of resveratrol. It induces a mild damage *per se* that can result in either potentiation of stress resistance pathways or direct cytotoxicity depending on the actual circumstances e.g. its concentration, the cell type studied, the intensity of damaging insult or mitochondrial redox status.

Our findings may contribute to the research of drugs used for prevention and treatment of age-related degenerative disorders.

9. Irodalomjegyzék

1. Siemann EH, Creasy LL. (1992) Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43: 49-52.
2. Raval AP, Lin HW, Dave KR, Defazio RA, Della Morte D, Kim EJ, Perez-Pinzon MA. (2008) Resveratrol and ischemic preconditioning in the brain. *Curr Med Chem*, 15: 1545-1551.
3. Albani D, Polito L, Signorini A, Forloni G. (2010) Neuroprotective properties of resveratrol in different neurodegenerative disorders. *Biofactors*, 36: 370-376.
4. Neves AR, Lucio M, Lima JL, Reis S. (2012) Resveratrol in medicinal chemistry: a critical review of its pharmacokinetics, drug-delivery, and membrane interactions. *Curr Med Chem*, 19: 1663-1681.
5. Zini R, Morin C, Bertelli A, Bertelli AA, Tillement JP. (1999) Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp Clin Res*, 25: 87-97.
6. Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, Fenwick PS, Leung RH, Ito K, Russell RE, Barnes PJ. (2004) Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287: L774-783.
7. Pinto MC, Garcia-Barrado JA, Macias P. (1999) Resveratrol is a potent inhibitor of the dioxygenase activity of lipoxygenase. *J Agric Food Chem*, 47: 4842-4846.
8. 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: 218-220.
9. Ko JH, Sethi G, Um JY, Shanmugam MK, Arfuso F, Kumar AP, Bishayee A, Ahn KS. (2017) The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*, 18.
10. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425: 191-196.
11. Ungvari Z, Sonntag WE, de Cabo R, Baur JA, Csiszar A. (2011) Mitochondrial protection by resveratrol. *Exerc Sport Sci Rev*, 39: 128-132.
12. Zhang L, Guo X, Xie W, Li Y, Ma M, Yuan T, Luo B. (2015) Resveratrol exerts an anti-apoptotic effect on human bronchial epithelial cells undergoing cigarette smoke exposure. *Mol Med Rep*, 11: 1752-1758.

13. Lv XC, Zhou HY. (2012) Resveratrol protects H9c2 embryonic rat heart derived cells from oxidative stress by inducing autophagy: role of p38 mitogen-activated protein kinase. *Can J Physiol Pharmacol*, 90: 655-662.
14. Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Criollo A, Maiuri MC, Tavernarakis N, Madeo F, Kroemer G. (2009) Autophagy mediates pharmacological lifespan extension by spermidine and resveratrol. *Aging (Albany NY)*, 1: 961-970.
15. 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: 1466-1473.
16. Dorrie J, Gerauer H, Wachter Y, Zunino SJ. (2001) Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res*, 61: 4731-4739.
17. 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: 1613-1615.
18. Azad MB, Chen Y, Gibson SB. (2009) Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. *Antioxid Redox Signal*, 11: 777-790.
19. Csiszar A, Labinsky N, Pinto JT, Ballabh P, Zhang H, Losonczy G, Pearson K, de Cabo R, Pacher P, Zhang C, Ungvari Z. (2009) Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297: H13-20.
20. Csiszar A, Labinsky N, Podlutzky A, Kaminski PM, Wolin MS, Zhang C, Mukhopadhyay P, Pacher P, Hu F, de Cabo R, Ballabh P, Ungvari Z. (2008) Vasoprotective effects of resveratrol and SIRT1: attenuation of cigarette smoke-induced oxidative stress and proinflammatory phenotypic alterations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294: H2721-2735.
21. Li Q, Huyan T, Ye LJ, Li J, Shi JL, Huang QS. (2014) Concentration-dependent biphasic effects of resveratrol on human natural killer cells in vitro. *J Agric Food Chem*, 62: 10928-10935.
22. Trincheri NF, Nicotra G, Follo C, Castino R, Isidoro C. (2007) Resveratrol induces cell death in colorectal cancer cells by a novel pathway involving lysosomal cathepsin D. *Carcinogenesis*, 28: 922-931.
23. Kutuk O, Poli G, Basaga H. (2006) Resveratrol protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by blocking JNK and c-JUN/AP-1 signaling. *Toxicol Sci*, 90: 120-132.

24. Miloso M, Bertelli AA, Nicolini G, Tredici G. (1999) Resveratrol-induced activation of the mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett*, 264: 141-144.
25. Simao F, Matte A, Pagnussat AS, Netto CA, Salbego CG. (2012) Resveratrol prevents CA1 neurons against ischemic injury by parallel modulation of both GSK-3beta and CREB through PI3-K/Akt pathways. *Eur J Neurosci*, 36: 2899-2905.
26. de la Lastra CA, Villegas I. (2007) Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans*, 35: 1156-1160.
27. Liang Q, Wang XP, Chen TS. (2014) Resveratrol protects rabbit articular chondrocyte against sodium nitroprusside-induced apoptosis via scavenging ROS. *Apoptosis*, 19: 1354-1363.
28. de la Lastra CA, Villegas I. (2005) Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. *Mol Nutr Food Res*, 49: 405-430.
29. Saqib U, Kelley TT, Panguluri SK, Liu D, Savai R, Baig MS, Schurer SC. (2018) Polypharmacology or Promiscuity? Structural Interactions of Resveratrol With Its Bandwagon of Targets. *Front Pharmacol*, 9: 1201.
30. Bonechi C, Martini S, Ciani L, Lamponi S, Rebmann H, Rossi C, Ristori S. (2012) Using liposomes as carriers for polyphenolic compounds: the case of trans-resveratrol. *PLoS One*, 7: e41438.
31. Gambini J, Ingles M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, Mas-Bargues C, Abdelaziz KM, Gomez-Cabrera MC, Vina J, Borrás C. (2015) Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid Med Cell Longev*, 2015: 837042.
32. Afaq F, Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H. (2002) Botanical antioxidants for chemoprevention of photocarcinogenesis. *Front Biosci*, 7: d784-792.
33. Aziz MH, Reagan-Shaw S, Wu J, Longley BJ, Ahmad N. (2005) Chemoprevention of skin cancer by grape constituent resveratrol: relevance to human disease? *Faseb j*, 19: 1193-1195.
34. Weiskirchen S, Weiskirchen R. (2016) Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy? *Adv Nutr*, 7: 706-718.
35. Schroder G, Brown JW, Schroder J. (1988) Molecular analysis of resveratrol synthase. cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *Eur J Biochem*, 172: 161-169.

36. Averilla JN, Oh J, Wu Z, Ryu KH, Jang CH, Kim HJ, Kim JS, Kim JS. (2019) Improved extraction of resveratrol and antioxidants from grape peel using heat and enzymatic treatments. *J Sci Food Agric*.
37. Li M, Kildegaard KR, Chen Y, Rodriguez A, Borodina I, Nielsen J. (2015) De novo production of resveratrol from glucose or ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 32: 1-11.
38. Ndiaye M, Kumar R, Ahmad N. (2011) Resveratrol in cancer management: where are we and where we go from here? *Ann N Y Acad Sci*, 1215: 144-149.
39. Renaud S, de Lorgeril M. (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339: 1523-1526.
40. Gueguen N, Desquret-Dumas V, Leman G, Chupin S, Baron S, Nivet-Antoine V, Vessieres E, Ayer A, Henrion D, Lenaers G, Reynier P, Procaccio V. (2015) Resveratrol Directly Binds to Mitochondrial Complex I and Increases Oxidative Stress in Brain Mitochondria of Aged Mice. *PLoS One*, 10: e0144290.
41. Beischlag TV, Luis Morales J, Hollingshead BD, Perdew GH. (2008) The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 18: 207-250.
42. Beischlag TV, Wang S, Rose DW, Torchia J, Reisz-Porszasz S, Muhammad K, Nelson WE, Probst MR, Rosenfeld MG, Hankinson O. (2002) Recruitment of the NCoA/SRC-1/p160 family of transcriptional coactivators by the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator complex. *Mol Cell Biol*, 22: 4319-4333.
43. Kobayashi A, Numayama-Tsuruta K, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. (1997) CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt). *J Biochem*, 122: 703-710.
44. Kollara A, Brown TJ. (2006) Functional interaction of nuclear receptor coactivator 4 with aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 346: 526-534.
45. Kumar MB, Perdew GH. (1999) Nuclear receptor coactivator SRC-1 interacts with the Q-rich subdomain of the AhR and modulates its transactivation potential. *Gene Expr*, 8: 273-286.
46. Perdew GH, Hollingshead BD, Dinatale BC, Morales JL, Labrecque MP, Takhar MK, Tam KJ, Beischlag TV. (2010) Estrogen receptor expression is required for low-dose resveratrol-mediated repression of aryl hydrocarbon receptor activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 335: 273-283.

47. Casper RF, Quesne M, Rogers IM, Shirota T, Jolivet A, Milgrom E, Savouret JF. (1999) Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. *Mol Pharmacol*, 56: 784-790.
48. 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: 14138-14143.
49. 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.
50. Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM. (2000) Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 141: 3657-3667.
51. Lu Y, Lu X, Wang L, Yang W. (2019) Resveratrol attenuates high fat diet-induced mouse cardiomyopathy through upregulation of estrogen related receptor-alpha. *Eur J Pharmacol*, 843: 88-95.
52. Li Y, Huang J, Yan Y, Liang J, Liang Q, Lu Y, Zhao L, Li H. (2018) Preventative effects of resveratrol and estradiol on streptozotocin-induced diabetes in ovariectomized mice and the related mechanisms. *PLoS One*, 13: e0204499.
53. Bhat KP, Pezzuto JM. (2001) Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells. *Cancer Res*, 61: 6137-6144.
54. Wang C, Hu ZQ, Chu M, Wang Z, Zhang WG, Wang LZ, Li CG, Wang JS. (2012) Resveratrol inhibited GH3 cell growth and decreased prolactin level via estrogen receptors. *Clin Neurol Neurosurg*, 114: 241-248.
55. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. (1989) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition*, 5: 155-171; discussion 172.
56. Dang W. (2014) The controversial world of sirtuins. *Drug Discov Today Technol*, 12: e9-e17.
57. Kaeberlein M, McDonagh T, Heltweg B, Hixon J, Westman EA, Caldwell SD, Napper A, Curtis R, DiStefano PS, Fields S, Bedalov A, Kennedy BK. (2005) Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem*, 280: 17038-17045.
58. Pacholec M, Bleasdale JE, Chrnyk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS, Griffith D, Griffor M, Loulakis P, Pabst B, Qiu X, Stockman B, Thanabal V, Varghese A, Ward J, Withka J, Ahn K. (2010) SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem*, 285: 8340-8351.

59. Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D. (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, 430: 686-689.
60. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444: 337-342.
61. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*, 127: 1109-1122.
62. Mayers JR, Iliff BW, Swoap SJ. (2009) Resveratrol treatment in mice does not elicit the bradycardia and hypothermia associated with calorie restriction. *Faseb j*, 23: 1032-1040.
63. Miller RA, Harrison DE, Astle CM, Baur JA, Boyd AR, de Cabo R, Fernandez E, Flurkey K, Javors MA, Nelson JF, Orihuela CJ, Pletcher S, Sharp ZD, Sinclair D, Starnes JW, Wilkinson JE, Nadon NL, Strong R. (2011) Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 66: 191-201.
64. Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E, Jamieson HA, Zhang Y, Dunn SR, Sharma K, Pleshko N, Woollett LA, Csiszar A, Ikeno Y, Le Couteur D, Elliott PJ, Becker KG, Navas P, Ingram DK, Wolf NS, Ungvari Z, Sinclair DA, de Cabo R. (2008) Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab*, 8: 157-168.
65. Cheng PW, Lee HC, Lu PJ, Chen HH, Lai CC, Sun GC, Yeh TC, Hsiao M, Lin YT, Liu CP, Tseng CJ. (2016) Resveratrol Inhibition of Rac1-Derived Reactive Oxygen Species by AMPK Decreases Blood Pressure in a Fructose-Induced Rat Model of Hypertension. *Sci Rep*, 6: 25342.
66. Bonnefont-Rousselot D. (2016) Resveratrol and Cardiovascular Diseases. *Nutrients*, 8.
67. Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Forstermann U. (2002) Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 106: 1652-1658.
68. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. (1995) The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta*, 235: 207-219.

69. Zordoky BN, Robertson IM, Dyck JR. (2015) Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1852: 1155-1177.
70. Betteridge DJ. (2000) What is oxidative stress? *Metabolism*, 49: 3-8.
71. Liu MH, Yuan C, He J, Tan TP, Wu SJ, Fu HY, Liu J, Yu S, Chen YD, Le QF, Tian W, Hu HJ, Zhang Y, Lin XL. (2015) Resveratrol protects PC12 cells from high glucose-induced neurotoxicity via PI3K/Akt/FoxO3a pathway. *Cell Mol Neurobiol*, 35: 513-522.
72. Xia N, Daiber A, Forstermann U, Li H. (2017) Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol*, 174: 1633-1646.
73. Chi TC, Chen WP, Chi TL, Kuo TF, Lee SS, Cheng JT, Su MJ. (2007) Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*, 80: 1713-1720.
74. Mohamad Shahi M, Haidari F, Shiri MR. (2011) Comparison of effect of resveratrol and vanadium on diabetes related dyslipidemia and hyperglycemia in streptozotocin induced diabetic rats. *Adv Pharm Bull*, 1: 81-86.
75. Silan C. (2008) The effects of chronic resveratrol treatment on vascular responsiveness of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull*, 31: 897-902.
76. Szkudelski T, Szkudelska K. (2015) Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. *Biochim Biophys Acta*, 1852: 1145-1154.
77. Pitot HC. (1993) The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*, 72: 962-970.
78. Maier-Salamon A, Bohmdorfer M, Riha J, Thalhammer T, Szekeres T, Jaeger W. (2013) Interplay between metabolism and transport of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*, 1290: 98-106.
79. Storniolo CE, Moreno JJ. (2012) Resveratrol metabolites have an antiproliferative effect on intestinal epithelial cancer cells. *Food Chem*, 134: 1385-1391.
80. Edinger AL, Thompson CB. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*, 16: 663-669.
81. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257.
82. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. (2011) Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*, 351: 41-58.
83. Dorn GW, 2nd. (2013) Molecular mechanisms that differentiate apoptosis from programmed necrosis. *Toxicol Pathol*, 41: 227-234.

84. Jin Z, El-Deiry WS. (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 4: 139-163.
85. Wong RS. (2011) Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, 30: 87.
86. Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K. (2008) Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. *Circ Res*, 103: 343-351.
87. Fink SL, Cookson BT. (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*, 73: 1907-1916.
88. Elmore S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35: 495-516.
89. Igney FH, Krammer PH. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2: 277-288.
90. Julien O, Wells JA. (2017) Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*, 24: 1380-1389.
91. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. (2001) Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*, 276: 7320-7326.
92. Sakahira H, Enari M, Nagata S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391: 96-99.
93. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, 278: 294-298.
94. Reed JC. (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*, 157: 1415-1430.
95. Aziz MH, Nihal M, Fu VX, Jarrard DF, Ahmad N. (2006) Resveratrol-caused apoptosis of human prostate carcinoma LNCaP cells is mediated via modulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. *Mol Cancer Ther*, 5: 1335-1341.
96. Bhardwaj A, Sethi G, Vadhan-Raj S, Bueso-Ramos C, Takada Y, Gaur U, Nair AS, Shishodia S, Aggarwal BB. (2007) Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. *Blood*, 109: 2293-2302.

97. Delmas D, Rebe C, Lacour S, Filomenko R, Athias A, Gambert P, Cherkaoui-Malki M, Jannin B, Dubrez-Daloz L, Latruffe N, Solary E. (2003) Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells. *J Biol Chem*, 278: 41482-41490.
98. Tameda M, Sugimoto K, Shiraki K, Inagaki Y, Ogura S, Kasai C, Yoneda M, Okamoto R, Yamamoto N, Takei Y, Ito M, Nobori T. (2014) Resveratrol sensitizes HepG2 cells to TRAIL-induced apoptosis. *Anticancer Drugs*, 25: 1028-1034.
99. Faber AC, Dufort FJ, Blair D, Wagner D, Roberts MF, Chiles TC. (2006) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated glucose metabolism coincides with resveratrol-induced cell cycle arrest in human diffuse large B-cell lymphomas. *Biochem Pharmacol*, 72: 1246-1256.
100. He X, Wang Y, Zhu J, Orloff M, Eng C. (2011) Resveratrol enhances the anti-tumor activity of the mTOR inhibitor rapamycin in multiple breast cancer cell lines mainly by suppressing rapamycin-induced AKT signaling. *Cancer Lett*, 301: 168-176.
101. Wang Y, Romigh T, He X, Orloff MS, Silverman RH, Heston WD, Eng C. (2010) Resveratrol regulates the PTEN/AKT pathway through androgen receptor-dependent and -independent mechanisms in prostate cancer cell lines. *Hum Mol Genet*, 19: 4319-4329.
102. Banerjee Mustafi S, Chakraborty PK, Raha S. (2010) Modulation of Akt and ERK1/2 pathways by resveratrol in chronic myelogenous leukemia (CML) cells results in the downregulation of Hsp70. *PLoS One*, 5: e8719.
103. Parekh P, Motiwale L, Naik N, Rao KV. (2011) Downregulation of cyclin D1 is associated with decreased levels of p38 MAP kinases, Akt/PKB and Pak1 during chemopreventive effects of resveratrol in liver cancer cells. *Exp Toxicol Pathol*, 63: 167-173.
104. Guo R, Su Y, Liu B, Li S, Zhou S, Xu Y. (2014) Resveratrol suppresses oxidised low-density lipoprotein-induced macrophage apoptosis through inhibition of intracellular reactive oxygen species generation, LOX-1, and the p38 MAPK pathway. *Cell Physiol Biochem*, 34: 603-616.
105. Dong Z. (2003) Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutat Res*, 523-524: 145-150.
106. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, Lam L, George TC, Wright GW, Dave SS, Zhao H, Xu W, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Chan WC, Staudt LM. (2008) Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science*, 319: 1676-1679.
107. Ivanov VN, Partridge MA, Johnson GE, Huang SX, Zhou H, Hei TK. (2008) Resveratrol sensitizes melanomas to TRAIL through modulation of antiapoptotic gene expression. *Exp Cell Res*, 314: 1163-1176.

108. Robb EL, Winkelmoen L, Visanji N, Brotchie J, Stuart JA. (2008) Dietary resveratrol administration increases MnSOD expression and activity in mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 372: 254-259.
109. Martinou JC, Kroemer G. (2009) Autophagy: evolutionary and pathophysiological insights. *Biochim Biophys Acta*, 1793: 1395-1396.
110. Galluzzi L, Vicencio JM, Kepp O, Tasdemir E, Maiuri MC, Kroemer G. (2008) To die or not to die: that is the autophagic question. *Curr Mol Med*, 8: 78-91.
111. Madeo F, Eisenberg T, Kroemer G. (2009) Autophagy for the avoidance of neurodegeneration. *Genes Dev*, 23: 2253-2259.
112. Virgin HW, Levine B. (2009) Autophagy genes in immunity. *Nat Immunol*, 10: 461-470.
113. Ding WX, Yin XM. (2012) Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem*, 393: 547-564.
114. He C, Klionsky DJ. (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, 43: 67-93.
115. Mizushima N, Klionsky DJ. (2007) Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr*, 27: 19-40.
116. Kawamata T, Kamada Y, Kabeya Y, Sekito T, Ohsumi Y. (2008) Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation. *Mol Biol Cell*, 19: 2039-2050.
117. Li W, Yang Q, Mao Z. (2011) Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences. *Cell Mol Life Sci*, 68: 749-763.
118. Tekirdag K, Cuervo AM. (2018) Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Joint by a chaperone. *J Biol Chem*, 293: 5414-5424.
119. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. (2009) Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 458-467.
120. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB. (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 120: 237-248.
121. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. (2005) Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*, 121: 179-193.
122. Poels J, Spasic MR, Callaerts P, Norga KK. (2009) Expanding roles for AMP-activated protein kinase in neuronal survival and autophagy. *Bioessays*, 31: 944-952.

123. Talloczy Z, Jiang W, Virgin HWt, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, Eskelinen EL, Levine B. (2002) Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 190-195.
124. Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. (2008) JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell*, 30: 678-688.
125. He Y, She H, Zhang T, Xu H, Cheng L, Yepes M, Zhao Y, Mao Z. (2018) p38 MAPK inhibits autophagy and promotes microglial inflammatory responses by phosphorylating ULK1. *J Cell Biol*, 217: 315-328.
126. Corcelle E, Djerbi N, Mari M, Nebout M, Fiorini C, Fenichel P, Hofman P, Poujeol P, Mograbi B. (2007) Control of the autophagy maturation step by the MAPK ERK and p38: lessons from environmental carcinogens. *Autophagy*, 3: 57-59.
127. Varoni EM, Lo Faro AF, Sharifi-Rad J, Iriti M. (2016) Anticancer Molecular Mechanisms of Resveratrol. *Front Nutr*, 3: 8.
128. Chang CH, Lee CY, Lu CC, Tsai FJ, Hsu YM, Tsao JW, Juan YN, Chiu HY, Yang JS, Wang CC. (2017) Resveratrol-induced autophagy and apoptosis in cisplatin-resistant human oral cancer CAR cells: A key role of AMPK and Akt/mTOR signaling. *Int J Oncol*, 50: 873-882.
129. Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R. (2008) Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ*, 15: 1318-1329.
130. Lekli I, Ray D, Mukherjee S, Gurusamy N, Ahsan MK, Juhasz B, Bak I, Tosaki A, Gherghiceanu M, Popescu LM, Das DK. (2010) Co-ordinated autophagy with resveratrol and gamma-tocotrienol confers synergetic cardioprotection. *J Cell Mol Med*, 14: 2506-2518.
131. Gurusamy N, Lekli I, Mukherjee S, Ray D, Ahsan MK, Gherghiceanu M, Popescu LM, Das DK. (2010) Cardioprotection by resveratrol: a novel mechanism via autophagy involving the mTORC2 pathway. *Cardiovasc Res*, 86: 103-112.
132. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74: 1124-1136.
133. Liu S, Sun J, Li Y. (2016) The Neuroprotective Effects of Resveratrol Preconditioning in Transient Global Cerebral Ischemia-Reperfusion in Mice. *Turk Neurosurg*, 26: 550-555.
134. Khoury N, Xu J, Stegelmann SD, Jackson CW, Koronowski KB, Dave KR, Young JI, Perez-Pinzon MA. (2018) Resveratrol Preconditioning Induces Genomic and Metabolic Adaptations within the Long-Term Window of Cerebral Ischemic Tolerance Leading to Bioenergetic Efficiency. *Mol Neurobiol*.

135. Chander V, Chopra K. (2005) Role of nitric oxide in resveratrol-induced renal protective effects of ischemic preconditioning. *J Vasc Surg*, 42: 1198-1205.
136. Liu FC, Tsai HI, Yu HP. (2015) Organ-Protective Effects of Red Wine Extract, Resveratrol, in Oxidative Stress-Mediated Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev*, 2015: 568634.
137. Petrovski G, Gurusamy N, Das DK. (2011) Resveratrol in cardiovascular health and disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1215: 22-33.
138. Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. (2006) Preparing mouse embryo fibroblasts. *CSH Protoc*, 2006.
139. Andrews NC, Faller DV. (1991) A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 19: 2499.
140. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.
141. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
142. Zarubin T, Han J. (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*, 15: 11-18.
143. Zhou X, Chen M, Zeng X, Yang J, Deng H, Yi L, Mi MT. (2014) Resveratrol regulates mitochondrial reactive oxygen species homeostasis through Sirt3 signaling pathway in human vascular endothelial cells. *Cell Death Dis*, 5: e1576.
144. Jang JH, Surh YJ. (2003) Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Radic Biol Med*, 34: 1100-1110.
145. Guo R, Li W, Liu B, Li S, Zhang B, Xu Y. (2014) Resveratrol protects vascular smooth muscle cells against high glucose-induced oxidative stress and cell proliferation in vitro. *Med Sci Monit Basic Res*, 20: 82-92.
146. Adams RH, Porras A, Alonso G, Jones M, Vintersten K, Panelli S, Valladares A, Perez L, Klein R, Nebreda AR. (2000) Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell*, 6: 109-116.
147. Beedanagari SR, Bebenek I, Bui P, Hankinson O. (2009) Resveratrol inhibits dioxin-induced expression of human CYP1A1 and CYP1B1 by inhibiting recruitment of the aryl hydrocarbon receptor complex and RNA polymerase II to the regulatory regions of the corresponding genes. *Toxicol Sci*, 110: 61-67.

148. Mohammadi-Bardbori A, Bengtsson J, Rannug U, Rannug A, Wincent E. (2012) Quercetin, resveratrol, and curcumin are indirect activators of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). *Chem Res Toxicol*, 25: 1878-1884.
149. Bolck B, Ibrahim M, Steinritz D, Morguet C, Duhr S, Suhr F, Lu-Hesselmann J, Bloch W. (2014) Detection of key enzymes, free radical reaction products and activated signaling molecules as biomarkers of cell damage induced by benzo[a]pyrene in human keratinocytes. *Toxicol In Vitro*, 28: 875-884.
150. Wudtiwai B, Sripanidkulchai B, Kongtawelert P, Banjerpongchai R. (2011) Methoxyflavone derivatives modulate the effect of TRAIL-induced apoptosis in human leukemic cell lines. *J Hematol Oncol*, 4: 52.
151. Chakraborty S, Levenson AS, Biswas PK. (2013) Structural insights into Resveratrol's antagonist and partial agonist actions on estrogen receptor alpha. *BMC Struct Biol*, 13: 27.
152. Chen YR, Tsou B, Hu S, Ma H, Liu X, Yen Y, Ann DK. (2016) Autophagy induction causes a synthetic lethal sensitization to ribonucleotide reductase inhibition in breast cancer cells. *Oncotarget*, 7: 1984-1999.
153. Cho KS, Yoon YH, Choi JA, Lee SJ, Koh JY. (2012) Induction of autophagy and cell death by tamoxifen in cultured retinal pigment epithelial and photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53: 5344-5353.
154. Strom JO, Theodorsson A, Theodorsson E. (2011) Mechanisms of estrogens' dose-dependent neuroprotective and neurodamaging effects in experimental models of cerebral ischemia. *Int J Mol Sci*, 12: 1533-1562.
155. Ahmad KA, Clement MV, Pervaiz S. (2003) Pro-oxidant activity of low doses of resveratrol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1010: 365-373.
156. Ping P, Murphy E. (2000) Role of p38 mitogen-activated protein kinases in preconditioning: a detrimental factor or a protective kinase? *Circ Res*, 86: 921-922.
157. Liu L, Zou P, Zheng L, Linarelli LE, Amarell S, Passaro A, Liu D, Cheng Z. (2015) Tamoxifen reduces fat mass by boosting reactive oxygen species. *Cell Death Dis*, 6: e1586.
158. Yang X, Wang J, Dai J, Shao J, Ma J, Chen C, Ma S, He Q, Luo P, Yang B. (2015) Autophagy protects against dasatinib-induced hepatotoxicity via p38 signaling. *Oncotarget*, 6: 6203-6217.

159. Whelan KA, Merves JF, Giroux V, Tanaka K, Guo A, Chandramouleeswaran PM, Benitez AJ, Dods K, Que J, Masterson JC, Fernando SD, Godwin BC, Klein-Szanto AJ, Chikwava K, Ruchelli ED, Hamilton KE, Muir AB, Wang ML, Furuta GT, Falk GW, Spergel JM, Nakagawa H. (2017) Autophagy mediates epithelial cytoprotection in eosinophilic oesophagitis. *Gut*, 66: 1197-1207.
160. Ganguli A, Choudhury D, Datta S, Bhattacharya S, Chakrabarti G. (2014) Inhibition of autophagy by chloroquine potentiates synergistically anti-cancer property of artemisinin by promoting ROS dependent apoptosis. *Biochimie*, 107 Pt B: 338-349.
161. Chu CT. (2006) Autophagic stress in neuronal injury and disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65: 423-432.
162. Mizushima N, Yoshimori T. (2007) How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3: 542-545.
163. Steiger-Barraissoul S, Rami A. (2009) Serum deprivation induced autophagy and predominantly an AIF-dependent apoptosis in hippocampal HT22 neurons. *Apoptosis*, 14: 1274-1288.
164. Duan WJ, Li YF, Liu FL, Deng J, Wu YP, Yuan WL, Tsoi B, Chen JL, Wang Q, Cai SH, Kurihara H, He RR. (2016) A SIRT3/AMPK/autophagy network orchestrates the protective effects of trans-resveratrol in stressed peritoneal macrophages and RAW 264.7 macrophages. *Free Radic Biol Med*, 95: 230-242.
165. Gu J, Hu W, Song ZP, Chen YG, Zhang DD, Wang CQ. (2016) Resveratrol-induced autophagy promotes survival and attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Int Immunopharmacol*, 32: 1-7.
166. Hasima N, Ozpolat B. (2014) Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cell Death Dis*, 5: e1509.
167. Lanna A, Henson SM, Escors D, Akbar AN. (2014) The kinase p38 activated by the metabolic regulator AMPK and scaffold TAB1 drives the senescence of human T cells. *Nat Immunol*, 15: 965-972.
168. Li J, Miller EJ, Ninomiya-Tsuji J, Russell RR, 3rd, Young LH. (2005) AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart. *Circ Res*, 97: 872-879.
169. Deng H, Mi MT. (2016) Resveratrol Attenuates Abeta25-35 Caused Neurotoxicity by Inducing Autophagy Through the TyrRS-PARP1-SIRT1 Signaling Pathway. *Neurochem Res*, 41: 2367-2379.
170. Yan WJ, Liu RB, Wang LK, Ma YB, Ding SL, Deng F, Hu ZY, Wang DB. (2018) Sirt3-Mediated Autophagy Contributes to Resveratrol-Induced Protection against ER Stress in HT22 Cells. *Front Neurosci*, 12: 116.

171. Zhang Y, Cao X, Zhu W, Liu Z, Liu H, Zhou Y, Cao Y, Liu C, Xie Y. (2016) Resveratrol Enhances Autophagic Flux and Promotes Ox-LDL Degradation in HUVECs via Upregulation of SIRT1. *Oxid Med Cell Longev*, 2016: 7589813.
172. Sui X, Kong N, Ye L, Han W, Zhou J, Zhang Q, He C, Pan H. (2014) p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett*, 344: 174-179.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

Ulakcsai Z, Bagaméry F, Vincze I, Szökő É, Tábi T.

Protective effect of resveratrol against caspase 3 activation in primary mouse fibroblasts.

CROATIAN MEDICAL JOURNAL. 2015 Apr;56(2):78-84.

Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos

IF: 1,483

Ulakcsai Z, Bagaméry F, Szökő É, Tábi T.

The role of autophagy induction in the mechanism of cytoprotective effect of resveratrol.

EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES. 2018 Oct 15;123:135-142.

Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos

IF: 3,466 (2017)

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Tábi Tamás egyetemi docens Úrnak**, aki folyamatosan támogatott és tanácsaival, gyakorlati útmutatásával irányította és kitartóan segítette kutatói munkámat.

Köszönettel tartozom **Dr. Bagdy György professzor úrnak** a Gyógyszerhatástani Intézet Igazgatójának, hogy az intézetben végzett kutatómunkámat lehetővé tette.

Továbbá köszönettel tartozom **Dr. Szökő Éva professzor asszonynak**, a kutatói munkám során nyújtott szakmai segítségéért, támogatásáért.

Szeretném megköszönni **Dr. Bagaméry Fruzsina kolléganőmnek** a kísérleti munka során nyújtott gyakorlati segítségét, együttműködését.

Szeretnék köszönetet mondani a **Gyógyszerhatástani Intézet munkatársainak** a segítségükért, mely által munkámat színvonalas szakmai környezetben végezhettem.

Köszönettel tartozom továbbá családomnak, akik munkám alatt végig támogattak és biztos háttérrel nyújtottak tudományos munkámhoz és e dolgozat létrejöttéhez.

Protective effect of resveratrol against caspase 3 activation in primary mouse fibroblasts

Zsófia Ulakcsai, Fruzsina Bagaméry, István Vincze, Éva Szökő, Tamás Tábi

Department of Pharmacodynamics, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Aim To study the effect of resveratrol on survival and caspase 3 activation in non-transformed cells after serum deprivation.

Methods Apoptosis was induced by serum deprivation in primary mouse embryonic fibroblasts. Caspase 3 activation and lactate dehydrogenase release were assayed as cell viability measure by using their fluorogenic substrates. The involvement of PI3K, ERK, JNK, p38, and SIRT1 signaling pathways was also examined.

Results Serum deprivation of primary fibroblasts induced significant activation of caspase 3 within 3 hours and reduced cell viability after 24 hours. Resveratrol dose-dependently prevented caspase activation and improved cell viability with 50% inhibitory concentration (IC_{50}) = 66.3 ± 13.81 μ M. It also reduced the already up-regulated caspase 3 activity when it was added to the cell culture medium after 3 hour serum deprivation, suggesting its rescue effect. Among the major signaling pathways, p38 kinase was critical for the protective effect of resveratrol which was abolished completely in the presence of p38 inhibitor.

Conclusion Resveratrol showed protective effect against cell death in a rather high dose. Involvement of p38 kinase in this effect suggests the role of mild stress in its cytoprotective action. Furthermore due to its rescue effect, resveratrol may be used not only for prevention, but also treatment of age-related degenerative diseases, but in the higher dose than consumed in conventional diet.

Received: January 15, 2015

Accepted: March 20, 2015

Correspondence to:

Tamás Tábi

Nagyvárad tér 4

Budapest, H-1089, Hungary

tabi.tamas@pharma.semmelweis-univ.hu

Age-related degenerative diseases pose enormous challenges both for individuals and society in terms of life quality and economic burden. Since age-related neurodegenerative and cardiovascular diseases develop mainly as a result of cell impairments, it is crucial to find agents that prevent and abolish cell damage and death. Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene) is a widely investigated phytoalexin compound, which can be found in numerous plants, mainly in the skin and seeds of red grapes (1). It was reported to possess multiple pharmacological properties including antiaging (2), antioxidative, anti-inflammatory (3), anticarcinogenic (4), and neuro- and cardioprotective effects (5). However, in the literature its rather contradictory properties, ie, cytoprotective and proapoptotic, were reported (6). The cause of opposite effects may lie in different cell types, cell states, and the duration or dosage of treatment used in the various models (7). Characteristically, resveratrol has an opposite impact on apoptosis in non-transformed and transformed cells (8,9). The targets of resveratrol and the mechanisms governing its effects are currently unclear. It was reported to affect different metabolic and signaling pathways, exhibit pro- or antioxidative activities, and modify the functions of several transcription factors and cofactors (10).

Since resveratrol might differently affect apoptotic process of tumorigenic and non-transformed normal cells, the aim of this study was to investigate its effect on the death of non-transformed cells as a potential lead compound for research of cytoprotective medications. We used primary mouse embryonic fibroblasts as an easily available non-transformed cell culture model. In order to evaluate its cytoprotective effect, caspase 3 activation was examined following serum deprivation as a model of insufficient availability of trophic factors. The specific background mechanisms, involvement of the PI3K, ERK, JNK, p38, and SIRT1 signaling pathways were also determined.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and animals

Resveratrol, the inhibitors of kinases (SB202190 for p38 MAPK, SP600125 for JNK, PD184352 for ERK, wortmannin for PI3K) and SIRT1 (EX-527), caspase 3 activity assay kit using fluorogenic caspase 3 substrate (Ac-DEVD-AMC), buffer components and N-acetylcysteine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Non-selective caspase inhibitor (Ac-VAD-CMK) was obtained from AnaSpec (Fermont, CA, USA) and CytoxOne lactate dehydrogenase release kit from Promega (Fitchburg, WI, USA). Cell cul-

ture mediums and fetal bovine serum were supplied by GE Healthcare (Little Chalfont, UK) and Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), respectively. Test compounds were dissolved in DMSO and used in cell culture medium to provide 0.5% final DMSO concentration. Control cells were treated with the same concentration of DMSO.

Pregnant NMRI mice were supplied by Toxicoop, Gödöllő, Hungary. All animal procedures were approved by the ethics committee of the Semmelweis University (22.1/606/001/2010, February 5, 2010) and were in accordance with the EU Council directives on laboratory animals (86/609/EEC).

Cell culture conditions and assay for caspase 3 activity and lactate dehydrogenase release

Mouse embryonic fibroblast culture was established according to CSH protocol (11). Cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and used between passage 3 and 7. One day before the experiment cells were seeded to 6 cm Petri dishes (3×10^5 cells/dish). Twenty-four hours later fetal bovine serum was withdrawn from the cell culture medium to induce cell death. Resveratrol treatment was initiated simultaneously with serum deprivation. When the rescue effect of resveratrol was investigated, resveratrol was added to the cell culture medium after 3-hour serum deprivation. Inhibitors of various signaling pathways were applied simultaneously with serum deprivation and/or resveratrol treatment.

For caspase activity assay after specified treatment periods (3, 4.5, 6 hours), cells were rinsed with PBS and harvested by trypsin-EDTA, and cytosol extract was prepared by hypotonic lysis with 0.6% Nonidet P40 according to Andrews and Faller (12). In order to evaluate direct caspase inhibitory effect of resveratrol, resveratrol was added directly to cytosol extract of serum-deprived fibroblasts immediately before measuring caspase 3 activity. Ac-VAD-CMK, a non-selective direct caspase inhibitor, was used in 20 μ M concentration as positive control. Caspase 3 activity and lactate dehydrogenase release were measured by commercially available kits according to the manufacturer instructions. Caspase 3 activity is shown as nanomol substrate cleaved by milligram protein in 3 hours.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation. Comparisons were made by paired *t* test. $P < 0.05$

was considered statistically significant. Data were analyzed by Microsoft Excel 2010 (Redmond, WA, USA).

RESULTS

Resveratrol dose-dependently prevented serum deprivation-induced caspase 3 activation in primary mouse embryonic fibroblasts

Primary mouse fibroblasts were exposed to serum deprivation, which after 3-6 hours induced significant caspase

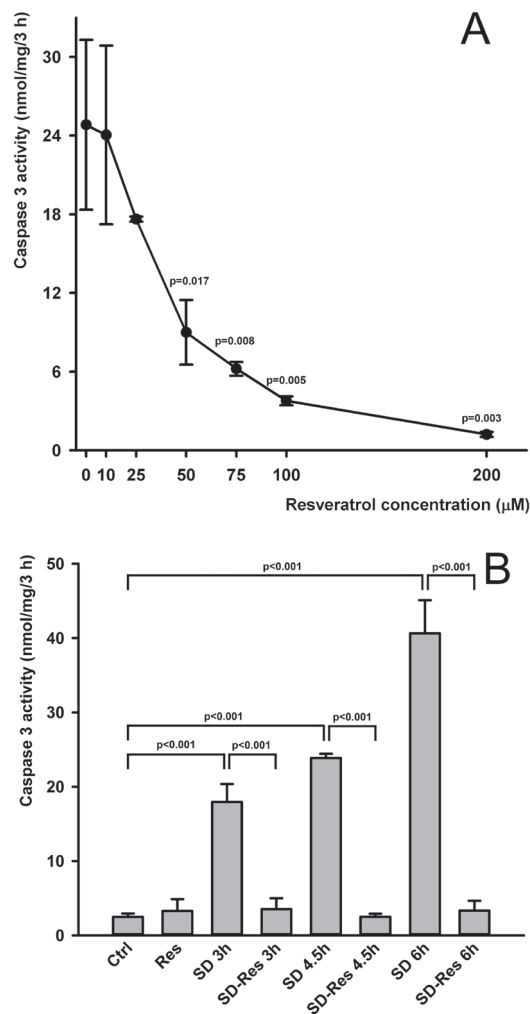


FIGURE 1. Resveratrol dose-dependently prevented caspase 3 activation after 3 h serum deprivation. Control value of caspase 3 activity in serum supported cells: 1.76 ± 0.097 nmol/mg/3 h (A). 200 µM of resveratrol prevented caspase 3 activation after 3, 4.5, and 6 h serum deprivation (B).

3 activation ($P < 0.001$). In order to evaluate the protective effect of resveratrol, the cells were treated with several concentrations (10, 25, 50, 75, 100, 200 µM) of resveratrol simultaneously with serum deprivation. Resveratrol prevented caspase 3 activation in a dose-dependent manner, with 50% inhibitory concentration (IC_{50}) = 66.3 ± 13.81 µM. Caspase 3 activation following 3 hour serum deprivation was completely inhibited at 200 µM resveratrol concentration (Figure 1A), and thus this level was used in the further experiments. This protective effect was also obtained after up to 6 hours of serum deprivation (Figure 1B). To verify whether resveratrol regulates the cellular response or directly interacts with caspase 3, resveratrol was added directly to the cytosol extract rather than to cell culture medium. Resveratrol showed no direct caspase inhibitory effect, although the known direct inhibitor Ac-VAD-CMK, used as positive control, completely blocked caspase 3 activity (Figure 2).

Resveratrol exhibited rescue effect on serum deprivation-induced caspase 3 activation

We further investigated whether resveratrol reduced the already up-regulated caspase 3 activity. Primary fibroblasts were exposed to serum deprivation for 3 hours, after which

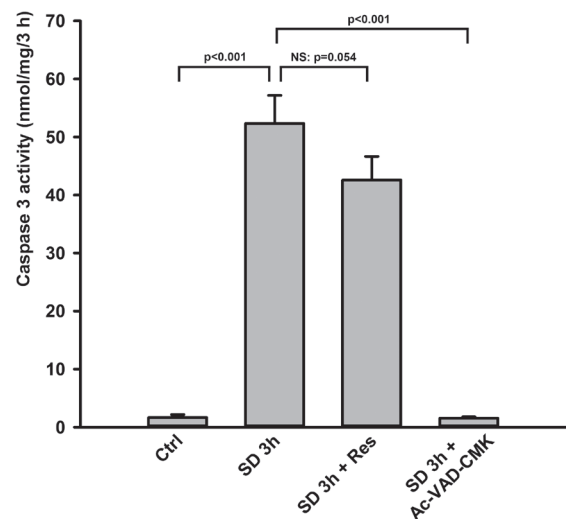


FIGURE 2. Resveratrol showed no direct caspase 3 inhibitory effect. When 200 µM of resveratrol was added to cytosol extract of serum-deprived fibroblast during caspase 3 activity measurement, it did not significantly reduce caspase 3 activity. A known direct caspase inhibitor, Ac-VAD-CMK, was used as positive control in 20 µM concentration.

the culture medium was supplemented with 200 μ M resveratrol for an additional 2 hours. Resveratrol significantly reduced the already activated caspase 3. It prevented not only its further increase but also reduced it to a level below that observed after 3-hour serum deprivation. These experiments indicate that resveratrol may have both protective and rescue effect on cells (Figure 3).

Resveratrol reduced lactate dehydrogenase release induced by serum deprivation

Lactate dehydrogenase release was measured to evaluate whether the inhibition of caspase 3 activation by resveratrol was accompanied by increased cell viability. Cell viability decreased by 24 hour serum deprivation was significantly improved by 200 μ M resveratrol treatment (Figure 4).

The effect of resveratrol on caspase 3 activity involves p38 kinase pathway

In order to investigate the signaling cascades involved in the protective effects of resveratrol, we carried out experiments in the presence of specific inhibitors of p38 (50 μ M SB202190), JNK (50 μ M SP600125), ERK (50 μ M PD184352), PI3K (10 μ M wortmannin) kinase pathways, and SIRT1 (5

μ M EX-527). Among them, only p38 MAPK inhibitor SB 202190 decreased the protective effect of resveratrol on caspase 3 activation (Figure 5).

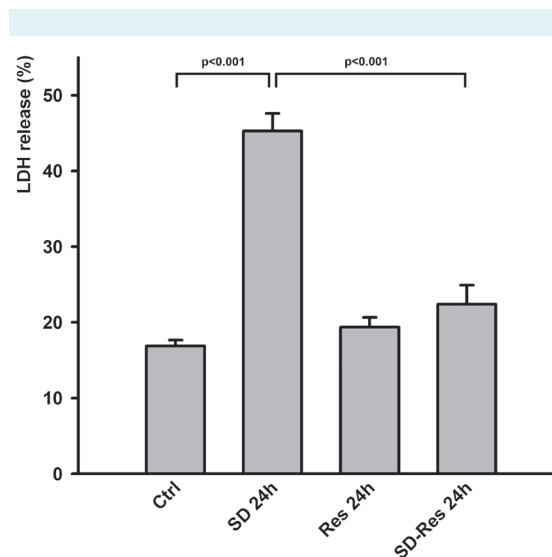


FIGURE 4. 200 μ M of resveratrol reduced lactate dehydrogenase release after 24 h serum deprivation.

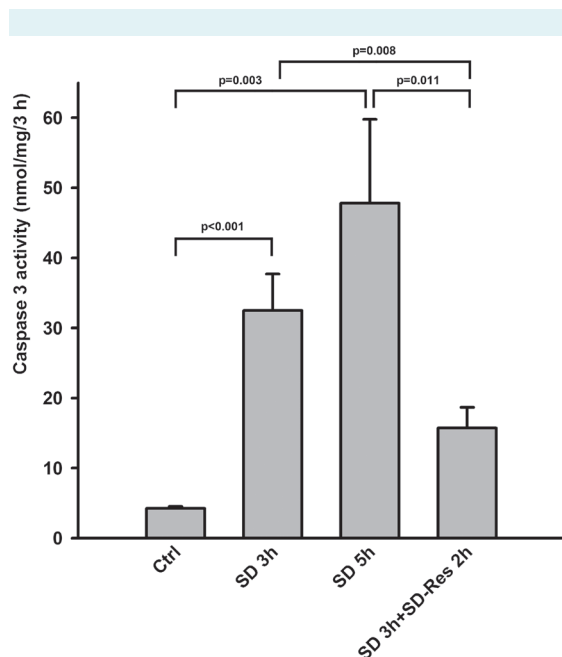


FIGURE 3. Resveratrol showed rescue effect on caspase 3 activation. Following 3 h of serum deprivation, 200 μ M resveratrol was supplemented for an additional 2 h.

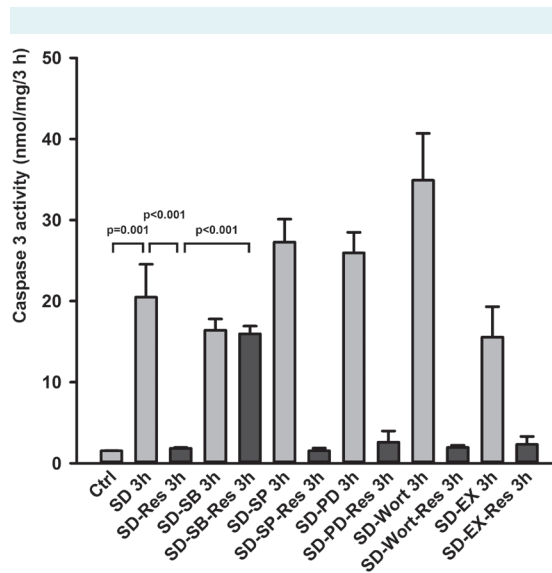


FIGURE 5. The effect of 50 μ M SB202190 (p38 MAPK inhibitor), 50 μ M SP600125 (JNK inhibitor), 50 μ M PD184352 (ERK inhibitor), 10 μ M wortmannin (PI3 kinase inhibitor), and 5 μ M EX-527 (SIRT-1 inhibitor) on 3-h serum deprivation-induced caspase 3 activation and the protective action of 200 μ M resveratrol. Only p38 MAPK inhibitor SB202190 abolished the effect of resveratrol on caspase activation.

The role of oxidative stress in the effect of resveratrol

Considering that p38 kinase pathway is activated by mild intracellular stress (13) and pro- and antioxidant properties of resveratrol had been previously described (14), we hypothesized that reactive oxygen species generation could be involved in caspase 3 activation induced by serum deprivation and/or the protective effect of resveratrol. To clarify if the antioxidant property of resveratrol may play a key role in its cytoprotective effect, we investigated the effect of 5 mM N-acetylcysteine, a well-known antioxidant agent, on caspase 3 activation. Contrary to our expectations, it did not prevent caspase 3 activation but exacerbated it. However, 200 μ M resveratrol abolished the combined effect of serum deprivation and N-acetylcysteine on caspase 3 activation (Figure 6).

DISCUSSION

Cytoprotective effect of resveratrol

Resveratrol prevented serum deprivation-induced caspase 3 activation in primary fibroblasts and increased their viability. These results are in line with those of previous studies

performed on non-transformed cells using various toxic insults (15,16). In this study, cytoprotective effect of resveratrol was considerable, in 100-200 μ M concentration range, which is similar to another study (17). However, some recent studies observed lower concentrations, in the 10-20 μ M range to be efficient as well (9,16). The effective dose probably depends on the cell type and the intensity of the damaging insult used. The concentration found to be effective in the present study is considerably higher than the concentration that can be obtained from dietary sources, suggesting the need for resveratrol supplementation. Furthermore, resveratrol can serve as a lead compound for research of more potent cytoprotective medications.

To the best of our knowledge this is the first report demonstrating that resveratrol abolishes the already elevated caspase 3 activity induced by serum deprivation, suggesting its rescue effect. Resveratrol was found to prevent and improve cardiac function in cardiac fibroblasts (18,19) and to play a neuroprotective role in neurotoxic injury (20). However, our results showed that it is a promising cytoprotective agent which should be explored not only for prevention of age-related degenerative disorders, but also in the early treatment of degeneration following an acute insult.

Probable mechanism of resveratrol action

It has already been suggested that several kinase pathways have a role in the cytoprotective effects of resveratrol. Cytoprotective functions of resveratrol were associated with the activation of PI3-kinase/Akt (21,22), p38 MAPK/JNK/ERK (23,24) signaling, and molecular pathways involving SIRT1 (9), an NAD dependent histone deacetylase. Our present findings indicate that the most critical signaling pathway in the protective effect of resveratrol against serum deprivation-induced caspase 3 activation is the activation of p38. The reports about the effects of resveratrol on p38 kinase pathway are rather contradictory. It was shown that through inhibition of p38 pathway resveratrol suppresses macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis (17,23). On the other hand, it exerted protective effect in H9c2 embryonic rat heart derived cells by up-regulating the p38 MAPK signaling (25). It was also shown to inhibit the proliferation of human primary fibroblasts and enhance their entry to senescence in p38 dependent manner (26). Therefore, p38 kinase seems to have a dual role as a regulator of cell fate, mediating either survival or death. Adams et al (27) reported that the specific function of p38 MAPKs in apoptosis depended on the cell type, stimuli, and/or p38 isoform. In accordance with their findings, we

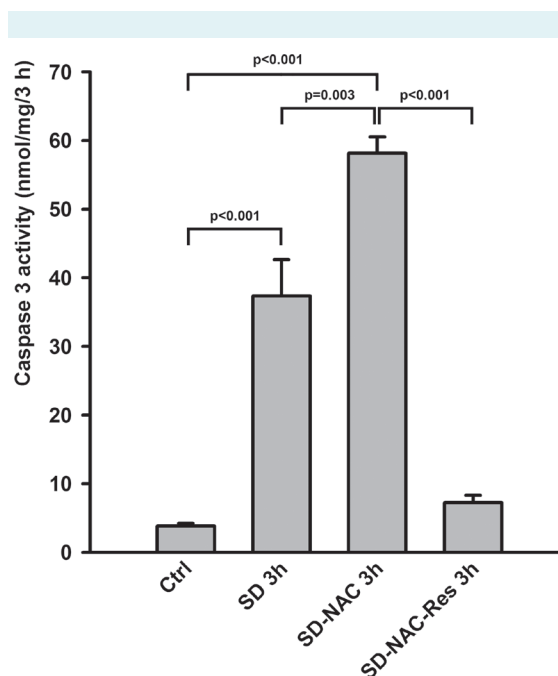


FIGURE 6. Five mM of N-acetylcysteine (NAC) exacerbated serum deprivation-induced caspase 3 activation, but 200 μ M of resveratrol prevented their combined effect.

showed that p38 MAPK had a cytoprotective rather than proapoptotic role.

Several articles discuss antioxidant properties of resveratrol as the cause of its cytoprotective effect (14,16). Considering that N-acetylcysteine exacerbated rather than prevented serum deprivation-induced caspase activation and resveratrol abolished their combined effect, antioxidant properties cannot explain its protective action. Previous articles reported similar effect of N-acetylcysteine, concluding that the elevated glutathione level can inhibit NF- κ B induced transcription of inhibitor of apoptosis protein, which can explain its potentiating effect on caspase activation (28,29). Since several previous reports demonstrated not only antioxidant but prooxidant characteristics of resveratrol (14,30), the latter might be involved in the activation of p38 MAPK and reduction of caspase 3 activation. A previous study suggested that the prooxidant activity of resveratrol was responsible for its inhibitory effect on apoptosis by creating an intracellular milieu non-permissive for caspase activation (30). These findings are in line with our results, which also indicate the role of p38 kinase in the protective effect of resveratrol and activation of this pathway by mild intracellular stress (13). However, the effect of resveratrol on oxidative state of cells requires further research.

Activation of p38 was also connected to increase in autophagic flux. This process is involved in the degradation of misfolded proteins or damaged organelles, such as depolarized mitochondria, which can prevent the release of proapoptotic mediators and the consequent caspase activation (25). Accordingly, two recent papers reported that resveratrol improved autophagic flux and prevented caspase cleavage in H9c2 rat cardiomyoblast cells (25,31). Similarly to our results, the protective effect of resveratrol depended on p38 MAPK activity (25). Based on these data, we can hypothesize that the effect of resveratrol on caspase 3 activation and cell survival might be connected with its prooxidant property, which may enhance autophagic flux via p38 activation.

A major limitation of this study is its *in vitro* nature, which is why further translational experiments are required to analyze the cytoprotective effect of resveratrol. In conclusion, we demonstrated the p38 MAPK signaling pathway-dependent cytoprotective effect of resveratrol against serum deprivation induced caspase 3 activation in primary fibroblasts. Also, resveratrol exhibited a rescue effect and reduced the already up-regulated caspase 3 activity. This

finding may contribute to the research of drugs used for prevention and treatment of age-related disorders.

Funding The research was supported by the RECOOP HST Association.

Ethical approval received from the ethics committee of the Semmelweis University (22.1/606/001/2010, February 5, 2010)

Declaration of authorship ZU, FB, and IV performed the experiments and evaluated the results, and ZU, ES, and TT participated in the planning of experiments, evaluation of results, and manuscript preparation.

Competing interests All authors have completed the Unified Competing Interest form at www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

References

- 1 Fonseca-Kelly Z, Nassrallah M, Uribe J, Khan RS, Dine K, Dutt M, et al. Resveratrol neuroprotection in a chronic mouse model of multiple sclerosis. *Frontiers in Neurology*. 2012;3:84. [Medline:22654783](#) [doi:10.3389/fneur.2012.00084](#)
- 2 Darzynkiewicz Z, Zhao H, Halicka HD, Li J, Lee YS, Hsieh TC, et al. In search of antiaging modalities: evaluation of mTOR- and ROS/DNA damage-signaling by cytometry. *Cytometry A*. 2014;85:386-99. [Medline:24677687](#) [doi:10.1002/cyto.a.22452](#)
- 3 Jang JH, Surh YJ. Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Radic Biol Med*. 2003;34:1100-10. [Medline:12684095](#) [doi:10.1016/S0891-5849\(03\)00062-5](#)
- 4 Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997;275:218-20. [Medline:8985016](#) [doi:10.1126/science.275.5297.218](#)
- 5 Rege SD, Geetha T, Griffin GD, Broderick TL, Babu JR. Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2014;6:218. [Medline:25309423](#) [doi:10.3389/fnagi.2014.00218](#)
- 6 Li Q, Huyen T, Ye LJ, Li J, Shi JL, Huang QS. Concentration-dependent biphasic effects of resveratrol on human natural killer cells *in vitro*. *J Agric Food Chem*. 2014;62:10928-35. [Medline:25360711](#) [doi:10.1021/jf502950u](#)
- 7 Barger JL, Kayo T, Vann JM, Arias EB, Wang J, Hacker TA, et al. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS ONE*. 2008;3:e2264. [Medline:18523577](#) [doi:10.1371/journal.pone.0002264](#)
- 8 Trinchieri NF, Nicotra G, Follo C, Castino R, Isidoro C. Resveratrol induces cell death in colorectal cancer cells by a novel pathway involving lysosomal cathepsin D. *Carcinogenesis*. 2007;28:922-31. [Medline:17116725](#) [doi:10.1093/carcin/bgl123](#)
- 9 Zhang L, Guo X, Xie W, Li Y, Ma M, Yuan T, et al. Resveratrol exerts an anti-apoptotic effect on human bronchial epithelial cells undergoing cigarette smoke exposure. *Molecular Medicine*

- Reports. 2015;11:1752-8. [Medline:25385506](#)
- 10 Khan RS, Fonseca-Kelly Z, Callinan C, Zuo L, Sachdeva MM, Shindler KS. SIRT1 activating compounds reduce oxidative stress and prevent cell death in neuronal cells. *Front Cell Neurosci.* 2012;6:63. [Medline:23293585](#) [doi:10.3389/fncel.2012.00063](#)
 - 11 Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. Preparing mouse embryo fibroblasts. *CSH Protocols.* 2006;2006(1).
 - 12 Andrews NC, Faller DV. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:2499. [Medline:2041787](#) [doi:10.1093/nar/19.9.2499](#)
 - 13 Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 2005;15:11-8. [Medline:15686620](#) [doi:10.1038/sj.cr.7290257](#)
 - 14 de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans.* 2007;35:1156-60. [Medline:17956300](#) [doi:10.1042/BST0351156](#)
 - 15 Liang Q, Wang XP, Chen TS. Resveratrol protects rabbit articular chondrocyte against sodium nitroprusside-induced apoptosis via scavenging ROS. *Apoptosis.* 2014;19:1354-63. [Medline:25001340](#) [doi:10.1007/s10495-014-1012-1](#)
 - 16 Zhou X, Chen M, Zeng X, Yang J, Deng H, Yi L, et al. Resveratrol regulates mitochondrial reactive oxygen species homeostasis through Sirt3 signaling pathway in human vascular endothelial cells. *Cell Death and Disease.* 2014;5:e1576. [Medline:25522270](#) [doi:10.1038/cddis.2014.530](#)
 - 17 Guo R, Su Y, Liu B, Li S, Zhou S, Xu Y. Resveratrol suppresses oxidised low-density lipoprotein-induced macrophage apoptosis through inhibition of intracellular reactive oxygen species generation, LOX-1, and the p38 MAPK pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2014;34:603-16. [Medline:25116358](#) [doi:10.1159/000363026](#)
 - 18 Liu J, Zhuo X, Liu W, Wan Z, Liang X, Gao S, et al. Resveratrol inhibits high glucose induced collagen upregulation in cardiac fibroblasts through regulating TGF-beta1-Smad3 signaling pathway. *Chem Biol Interact.* 2015;227:45-52. [Medline:25559857](#) [doi:10.1016/j.cbi.2014.12.031](#)
 - 19 Chen T, Li J, Liu J, Li N, Wang S, Liu H, et al. Activation of SIRT3 by resveratrol ameliorates cardiac fibrosis and improves cardiac function via the TGF-beta/Smad3 pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;308:H424-34. [Medline:25527776](#) [doi:10.1152/ajpheart.00454.2014](#)
 - 20 Ai Z, Li C, Li L, He G. Resveratrol inhibits beta-amyloid-induced neuronal apoptosis via regulation of p53 acetylation in PC12 cells. *Molecular Medicine Reports.* 2015;11:2429-34. [Medline:25483559](#)
 - 21 Liu MH, Yuan C, He J, Tan TP, Wu SJ, Fu HY, et al. Resveratrol protects PC12 cells from high glucose-induced neurotoxicity via PI3K/Akt/FoxO3a pathway. *Cell Mol Neurobiol.* 2015. [Medline:25471227](#) [doi:10.1007/s10571-014-0147-5](#)
 - 22 Simao F, Matte A, Pagnussat AS, Netto CA, Salbego CG. Resveratrol prevents CA1 neurons against ischemic injury by parallel modulation of both GSK-3beta and CREB through PI3-K/Akt pathways. *Eur J Neurosci.* 2012;36:2899-905. [Medline:22817531](#) [doi:10.1111/j.1460-9568.2012.08229.x](#)
 - 23 Guo R, Li W, Liu B, Li S, Zhang B, Xu Y. Resveratrol protects vascular smooth muscle cells against high glucose-induced oxidative stress and cell proliferation in vitro. *Medical Science Monitor Basic Research.* 2014;20:82-92. [Medline:24971582](#) [doi:10.12659/MSMBR.890858](#)
 - 24 Kutuk O, Poli G, Basaga H. Resveratrol protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by blocking JNK and c-JUN/AP-1 signaling. *Toxicological Sciences.* 2006;90:120-32. [Medline:16322078](#) [doi:10.1093/toxsci/kfj055](#)
 - 25 Lv XC, Zhou HY. Resveratrol protects H9c2 embryonic rat heart derived cells from oxidative stress by inducing autophagy: role of p38 mitogen-activated protein kinase. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012;90:655-62. [Medline:22537597](#) [doi:10.1139/y2012-051](#)
 - 26 Faragher RG, Burton DG, Majecha P, Fong NS, Davis T, Sheerin A, et al. Resveratrol, but not dihydroresveratrol, induces premature senescence in primary human fibroblasts. *Age (Dordr).* 2011;33:555-64. [Medline:21318333](#) [doi:10.1007/s11357-010-9201-5](#)
 - 27 Adams RH, Porras A, Alonso G, Jones M, Vintersten K, Panelli S, et al. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell.* 2000;6:109-16. [Medline:10949032](#) [doi:10.1016/S1097-2765\(05\)00014-6](#)
 - 28 Zhang H, Limphong P, Pieper J, Liu Q, Rodesch CK, Christians E, et al. Glutathione-dependent reductive stress triggers mitochondrial oxidation and cytotoxicity. *FASEB J.* 2012;26:1442-51.
 - 29 Qanungo S, Wang M, Nieminen AL. N-Acetyl-L-cysteine enhances apoptosis through inhibition of nuclear factor-kappaB in hypoxic murine embryonic fibroblasts. *J Biol Chem.* 2004;279:50455-64. [Medline:15375156](#) [doi:10.1074/jbc.M406749200](#)
 - 30 Ahmad KA, Clement MV, Pervaiz S. Pro-oxidant activity of low doses of resveratrol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Ann NY Acad Sci.* 2003;1010:365-73. [Medline:15033754](#) [doi:10.1196/annals.1299.067](#)
 - 31 Wang B, Yang Q, Sun YY, Xing YF, Wang YB, Lu XT, et al. Resveratrol-enhanced autophagic flux ameliorates myocardial oxidative stress injury in diabetic mice. *J Cell Mol Med.* 2014;18:1599-611. [Medline:24889822](#) [doi:10.1111/jcmm.12312](#)



The role of autophagy induction in the mechanism of cytoprotective effect of resveratrol



Zsófia Ulakcsai, Fruzsina Bagaméry, Éva Szökő, Tamás Tábi*

Department of Pharmacodynamics, Semmelweis University, Üllői út 26., Budapest 1085, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords:

Autophagy
Caspase 3 activation
Cytoprotection
Non-transformed cells
Serum deprivation
Resveratrol
Mitochondrial membrane potential

ABSTRACT

We aimed at studying the potential mechanisms in the preventive effect of resveratrol on serum deprivation induced caspase 3 activation on non-transformed cells.

Methods: Apoptosis was induced by serum deprivation in primary mouse embryonic fibroblasts. Caspase 3 activation, reactive oxygen species production and depolarization of the mitochondrial membrane were measured by fluorescence methods. The involvement of intracellular receptors and autophagy in the effect of resveratrol were analyzed by using specific agonists and antagonists. The role of autophagy was further examined by Western Blot analysis of its protein markers, LC3-II and p62 as well as by acridine orange staining of acidic vacuoles.

Results: We found that neither aromatic hydrocarbon receptors nor estrogen receptors play an important role in the cytoprotective effect of resveratrol. Reactive oxygen species production was not significantly altered by either serum deprivation or resveratrol treatment. In the presence of serum deprivation resveratrol however, induced a significant depolarization in mitochondrial membrane potential. The autophagy inhibitor, chloroquine not only eliminated the preventive effect of resveratrol, but also turned it to deleterious suggesting the prominent role of autophagy induction in the cytoprotective effect. Resveratrol did not alter LC3-II expression, but facilitated p62 degradation in serum deprived cells, suggesting its ability to augment the late phase of autophagy and thus promote the autophagic flux.

Conclusion: We have demonstrated that resveratrol can protect primary fibroblasts against serum deprivation induced apoptosis by provoking mild mitochondrial stress and consequent up-regulation of autophagic flux.

1. Introduction

Trans-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) is commonly used as a dietary supplement for prevention or treatment of various health problems, e.g. cardiovascular, neurological diseases and cancer. It was reported to possess multiple pharmacological properties such as cardioprotective, antioxidant (for review see Kovacic and Somanathan, 2010), anti-inflammatory, chemopreventive (for review see Hsieh and Wu, 2010) and anticancer activities (for review see Kalantari and Das, 2010). However, in the literature many of its effects are rather contradictory, i.e. both its cytoprotective and proapoptotic (Baarine et al., 2011; Li et al., 2014) as well as pro- or antioxidant activities were shown (for review see de la Lastra and Villegas, 2007). These conflicting effects can derive from the variety of models using different cell types, treatment duration and dosage (Barger et al., 2008).

We aimed at studying its effects on non-transformed cells since due

to the significantly different survival pathways in normal and cancer cells may be one of the reasons of the contradictory findings in the literature. In our previous studies we showed resveratrol dose-dependently prevented serum deprivation induced caspase activation in primary fibroblasts confirming its cytoprotective properties on non-transformed cells. The mechanism of its effect is only partially understood, crucial role of p38 kinase pathway activation was demonstrated since its inhibition entirely abolished the anti-apoptotic effect of resveratrol (Ulakcsai et al., 2015).

In the literature a plethora of molecular targets of resveratrol among them estrogen receptor, aromatic hydrocarbon (Ah) receptor, mitochondrial respiratory chain and modulation of reactive oxygen species (ROS) generation were suggested, though their contribution to its cytoprotective effect is not fully understood.

Several previous studies showed resveratrol binding to estrogen receptors resulting in either agonist (Gehm et al., 1999) or antagonist

* Corresponding author.

E-mail addresses: bagamery.fruzsina@pharma.semmelweis-univ.hu (F. Bagaméry), szoko.eva@pharma.semmelweis-univ.hu (É. Szökő), tabi.tamas@pharma.semmelweis-univ.hu (T. Tábi).

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.07.039>

Received 20 March 2018; Received in revised form 13 July 2018; Accepted 18 July 2018

Available online 20 July 2018

0928-0987/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

effects (Lu and Serrero, 1999). It was also reported to be a competitive AhR antagonist that prevents the transactivation property of the receptor and inhibits the agonist induced gene expression (Casper et al., 1999). Resveratrol, in high concentration, was evidenced to inhibit the mitochondrial function, decrease cellular ATP levels, and activate AMP-activated protein kinase (AMPK) (Lionaki et al., 2015, Lovelace and Polyak, 2015). Its influence on mitochondrial respiratory chain function and ROS production were proposed to be responsible for some of its pharmacological effects (Q. Zhang et al., 2016). However, its anti- or prooxidant activity was suggested to be dependent on its concentration, the treatment duration and cellular redox status (Gueguen et al., 2015). Recent evidence also indicated that resveratrol can provoke autophagy in many kinds of cells causing either cytoprotective or proapoptotic outcome depending on the cell type and treatment protocol (Gu et al., 2016; Puissant et al., 2010). Mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway plays a central role in the regulation of autophagy (for review Kim and Guan, 2015; Paquette et al., 2018) and cardioprotective effect of resveratrol was reported to be partly mediated by mTOR dependent activation of autophagy (Gurusamy et al., 2010). Resveratrol has also been suggested to inhibit the mTOR pathway potentially serving as a neuroprotective mechanism following injuries (Zhou et al., 2018).

In the present study we aimed at elucidating whether estrogen or Ah receptors, mitochondrial respiratory chain and ROS modulation are involved in the previously reported caspase activation preventing effect of resveratrol. Furthermore, the involvement of autophagy and its regulator mTOR pathway were also investigated. Autophagy inhibitor chloroquine, mTOR inhibitor rapamycin, levels of LC3 and p62, marker proteins of early and late autophagy, respectively and staining for acidic vacuoles were used to characterize the process.

Mouse embryonic fibroblast (MEF) culture is widely used for translational studies because it is a simple model for testing basic pharmacological mechanisms due to its easy accessibility, rapid growth rates, and the lack of transformation. Moreover, its use raises less ethical concerns compared to primary cultures of human origin (Qiu et al., 2016). Primary mouse fibroblasts have previously been determined to express estrogen and Ah receptors and were used as model cultures to investigate various roles of these receptors (Alexander et al., 1997; Harper et al., 1991; Marsh et al., 2017). Based on these attributes MEF cells were used as non-transformed cell model in our experiments.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Animals

Resveratrol, caspase 3 activity assay kit using fluorogenic caspase 3 substrate (Ac-DEVD-AMC), buffer components, benzo(a)pyrene, trimethoxyflavone, fulvestrant, chloroquine, tamoxifen, rapamycin, dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) and hydroethidine (HE) and Western Blot reagents, such as acrylamide/bis-acrylamide 30% solution, ammonium persulfate, tetramethylethylenediamine, Tris, glycine and tricine were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). JC-1 mitochondrial membrane potential detection dye was supplied by ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA), β -estradiol hemihydrate was a kind gift of Gedeon Richter Pharmaceutical Inc. (Budapest, Hungary). Cell culture mediums and fetal bovine serum were supplied by Corning (Tewksbury, MA, USA) and ThermoFisher Scientific, respectively. Polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membrane and autoradiography film were obtained from Santa Cruz (Dallas, TX, USA) and Pierce ECL Western Blotting substrate was purchased from ThermoFisher Scientific.

Primary antibodies against LC3A/B and SQSTM1/p62 were supplied by Cell Signal Technology (Danvers, MA, USA) and that against GAPDH was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Secondary anti-rabbit and anti-mouse antibodies were obtained from ThermoFisher Scientific.

Test compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and used in cell culture medium to provide 0.5% final DMSO concentration. Control cells were treated with the same concentration of DMSO. Resveratrol was used in 200 μ M concentration that could completely prevent caspase activation according to our previous studies (Ulakcsai et al., 2015). Concentration of other test compounds was chosen according to literature data.

Pregnant NMRI mice for cell culture establishment were supplied by Toxicop, Gödöllő, Hungary. All animal procedures were approved by the Ethical Committee of the Semmelweis University (22.1/1375/7/2010) and were in accordance with the EU Council Directives on laboratory animals (86/609/EEC).

2.2. Cell Culture Conditions

Mouse embryonic fibroblast culture was established according to CSH protocol (Nagy et al., 2006). Cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and used between passage 3 and 7.

One day before the experiment cells were seeded to 6 cm Petri dishes (3×10^5 cells/dish). Twenty-four hours later fetal bovine serum was withdrawn from the cell culture medium to induce cell death. Resveratrol treatment was initiated simultaneously with serum deprivation. Benzo(a)pyrene, trimethoxyflavone, tamoxifen, fulvestrant, estradiol, chloroquine and rapamycin were applied simultaneously with serum deprivation and/or resveratrol treatment.

2.3. Caspase 3 Activity

For caspase activity assay after 3-hour treatment period cells were rinsed with PBS and harvested by trypsin-EDTA, and cytosol extract was prepared by hypotonic lysis with 0.6% Nonidet P40 according to Andrews and Faller (Andrews and Faller, 1991). Caspase 3 activity was measured by commercially available kit according to the manufacturer instructions using a Fluoroskan Ascent FL Microplate spectrofluorometer (ThermoFisher Scientific). Caspase 3 activity is normalized to the protein content of the sample measured by Lowry's method (Lowry et al., 1951).

2.4. Analysis of ROS Production and JC-1 Assay for Mitochondrial Membrane Potential

After 3-hour treatment period cells were rinsed with PBS and harvested by trypsin-EDTA. Cells were resuspended in PBS containing 1 μ M HE, 2 μ M DCFDA or 5 μ M JC-1, respectively. After 30 min incubation at 37 °C cells were collected by centrifugation (450g, 5 min, room temperature), washed by PBS and fluorescence was recorded at 485 nm (excitation)/538 nm (emission) for DCFDA, 530 nm (excitation)/590 nm (emission) for HE and both 485 nm (excitation)/538 nm (emission) and 485 nm (excitation)/590 nm (emission) for JC-1 using a Fluoroskan Ascent FL Microplate spectrofluorometer. Depolarization of mitochondrial membrane potential is presented as increase in the green/red fluorescence ratio.

2.5. Staining of Acidic Vacuoles

Cells were cultured on glass coverslips in 24-well tissue culture plates and subjected to 3-hour serum deprivation in the absence or presence of 200 μ M resveratrol. After completion of the treatment period the cells were washed by PBS and stained by acridine orange (1 μ g/mL in PBS) for 15 min at 37 °C. After incubation the coverslips were washed in PBS and the cells were visualized by epifluorescent microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) using fluorescein filter set.

2.6. Western Blot Analysis

Total cell lysates were prepared using Radio-Immunoprecipitation Assay buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS). Total protein concentration was determined by Bradford's method (Bradford, 1976). After denaturation by heating at 95 °C for 5 min in Laemmli buffer (0.1% 2-mercaptoethanol, 0.0005% bromophenol blue, 10% glycerol, 2% SDS, 63 mM Tris-HCl (pH 6.8)) 30 µg protein samples were separated in 15% SDS-polyacrylamide gels and then transferred onto PVDF membranes. Membranes were then blocked with 2% non-fat dry milk or 5% BSA dissolved by Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBST) for 1 h and then probed with 1:1000-diluted primary LC3A/B and p62 antibodies in 5% BSA solution and 1:10000-diluted primary GAPDH antibodies in 2% non-fat dry milk solution overnight at 4 °C. The membranes were washed with TBST three times for 10 min and then incubated with 1:2000-diluted HRP-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. The specific proteins were detected on autoradiography films using ECL reagent. The densitometric analysis was performed using Image J software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Density ratios of LC3-II to LC3-I and p62 to GAPDH were used for calculations.

2.7. Data Presentation and Statistical Analysis

Data are expressed as proportional changes compared to control and are given as mean ± standard deviation of at least 3 parallel measurements. One-way ANOVA was used for data analysis followed by Sidak post-hoc test for multiple comparisons. Corrected $p < 0.05$ was considered statistically significant. Data were analyzed by Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Individual experiments were repeated at least three times. Figures represent the mean of multiple tests.

3. Results

3.1. Role of Ah Receptor Pathway in the Preventive Effect of Resveratrol on Serum Deprivation Induced Caspase Activation

In order to investigate the target receptors involved in the protective effects of resveratrol, we carried out experiments in the presence of specific Ah receptor agonist benzo(a)pyrene or antagonist trimethoxyflavone. None of them induced any relevant changes alone but both of them significantly increased serum deprivation induced caspase

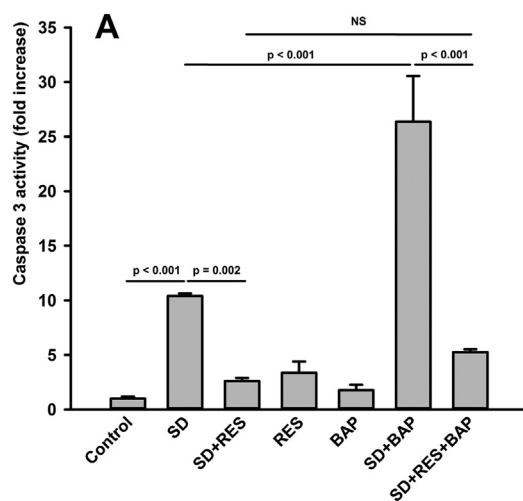


Fig. 1. The effect of the Ah receptor agonist, 1 µM benz(a)pyrene (BAP) (A) and the antagonist, 10 µM trimethoxyflavone (TMF) (B) on the protective action of 200 µM resveratrol (RES) against serum deprivation (SD) induced caspase 3 activation.

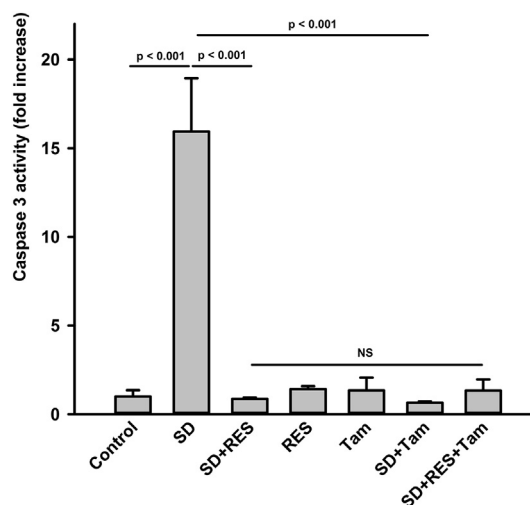
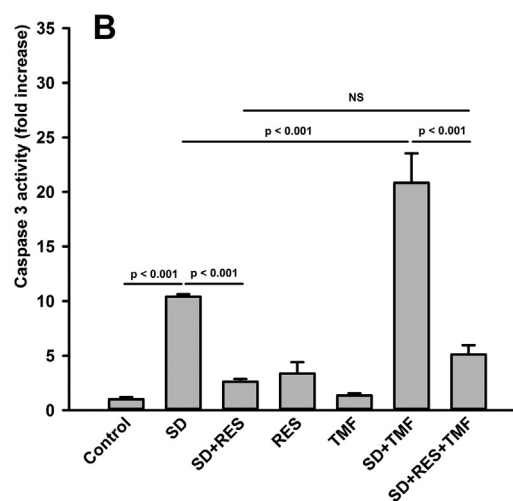


Fig. 2. The effect of the antiestrogen, 200 µM tamoxifen (Tam) on the protective action of 200 µM resveratrol (RES) against serum deprivation (SD) induced caspase 3 activation.

activation. On the other hand their influence on the preventive effect of resveratrol on caspase activation was negligible (Fig. 1).

3.2. Role of Estrogen Receptor Pathway in the Preventive Effect of Resveratrol on Serum Deprivation Induced Caspase Activation

To study the role of estrogen receptors in the effect of resveratrol the most commonly used antiestrogen, tamoxifen was first applied. It did not influence the cytoprotective effect of resveratrol, furthermore in the absence of resveratrol, tamoxifen by itself powerfully prevented serum deprivation induced caspase activation (Fig. 2).

The more selective and pure estrogen receptor antagonist fulvestrant and agonist estradiol interestingly acted alike, namely they significantly potentiated the caspase activation after serum deprivation, but neither treatment affected significantly the protective property of resveratrol (Fig. 3).

3.3. Role of Mitochondria in the Preventive Effect of Resveratrol on Serum Deprivation Induced Caspase Activation

Previously we have demonstrated that the activation of p38 stress kinase pathway is critical in the cytoprotective effect of resveratrol

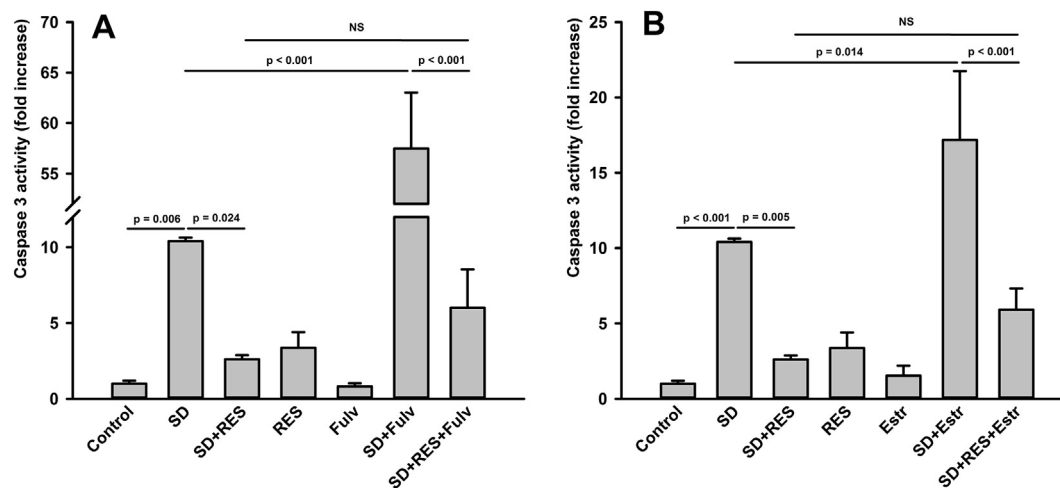


Fig. 3. The effect of the estrogen receptor antagonist, 0.1 μ M fulvestrant (Fulv) (A) and the agonist, 0.1 μ M β -estradiol (Estr) (B) on the protective action of 200 μ M resveratrol (RES) against serum deprivation (SD) induced caspase 3 activation.

raising the role of mild cellular stress in the mechanism of its action. We have thus studied the mitochondrial membrane potential and the generation of ROS as markers of intracellular stress. Fluorescent ROS indicators, HE that measures primarily superoxide radical and DCFDA that mainly assays intracellular hydrogen peroxide were used. Mitochondrial membrane potential was assayed by JC-1 dye that accumulates in the negatively charged compartment of mitochondria resulting in aggregation and a shift its fluorescent property.

The mitochondrial membrane potential was not influenced by serum deprivation and resveratrol showed only a tendency for depolarizing mitochondrial membrane in serum supplemented cells. In the presence of serum deprivation however it induced a significant deterioration in mitochondrial membrane potential (Fig. 4).

Serum deprivation, resveratrol or their combination did not significantly alter the ROS production (data not shown).

3.4. Role of Autophagy in the Preventive Effect of Resveratrol on Serum Deprivation Induced Caspase Activation

As resveratrol was previously reported to induce autophagy the role of the process was also studied in the protective behavior of the compound. Staining the cells by acridine orange showed that both serum

deprivation and resveratrol, as well as their combination increased the number of acidic vacuoles consistent with formation of autophagosomes (Fig. 5A).

The well-known autophagy inhibitor, chloroquine completely eliminated the protective effect of resveratrol. Moreover, caspase activation was exaggerated when both resveratrol and chloroquine were present in the culture medium. Chloroquine alone did not change the serum deprivation induced caspase activation (Fig. 5B).

Expression of proteins LC3 and p62, markers of early and late autophagy, respectively, was detected by Western Blotting to further characterize the effect of serum deprivation and resveratrol on autophagy. Serum deprivation alone significantly increased the ratio of LC3-II/LC3-I which was not further altered by concomitant resveratrol treatment (Fig. 5C). Serum deprivation alone did not influence the level of p62, while resveratrol treatment of serum deprived cells significantly enhanced p62 degradation suggesting the improvement of autophagic flux by the compound (Fig. 5D).

3.5. Role of mTOR Pathway in the Preventive Effect of Resveratrol on Serum Deprivation Induced Caspase Activation

As mTOR pathway is one of the major regulator of autophagy process and was also suggested as possible resveratrol target we tested its involvement in the caspase activation preventing effect of resveratrol. The potent and selective mTOR inhibitor rapamycin did not affect the protection by resveratrol, however alone it showed similar, but much weaker preventive effect against serum deprivation induced caspase 3 activation (Fig. 6).

4. Discussion

Association between the effects of resveratrol and Ah receptors was reported in several studies and its protective effects against dioxin and other Ah receptor ligand toxicity was suggested to be dependent its inhibitory effect on the receptor (Beedanagari et al., 2009; Casper et al., 1999; Mohammadi-Bardbori et al., 2012). In our present experiments compounds known to have direct effect on Ah receptor – its agonist benzo(a)pyrene and antagonist trimethoxyflavone – did not alter the protective effect of resveratrol against serum deprivation induced caspase activation. Interestingly both agents induced similar effect, namely significantly enhanced serum deprivation induced caspase activation that was prevented by concomitant resveratrol treatment. These data suggest that both benzo(a)pyrene and trimethoxyflavone have some direct influence on caspase activation in accordance with some previous reports (Bolck et al., 2014; Wudtiwai et al., 2011), but the protective

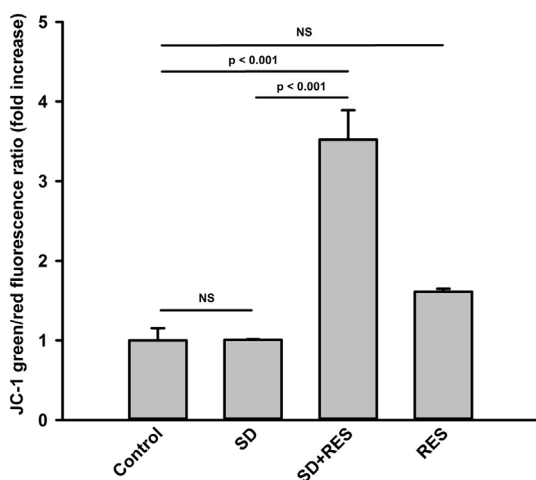


Fig. 4. The effect of serum deprivation, 200 μ M resveratrol (RES) and their combination on the depolarization of mitochondrial membrane potential measured by JC-1 as fluorescent indicator. Increased green/red fluorescence indicate depolarization of mitochondrial membranes.

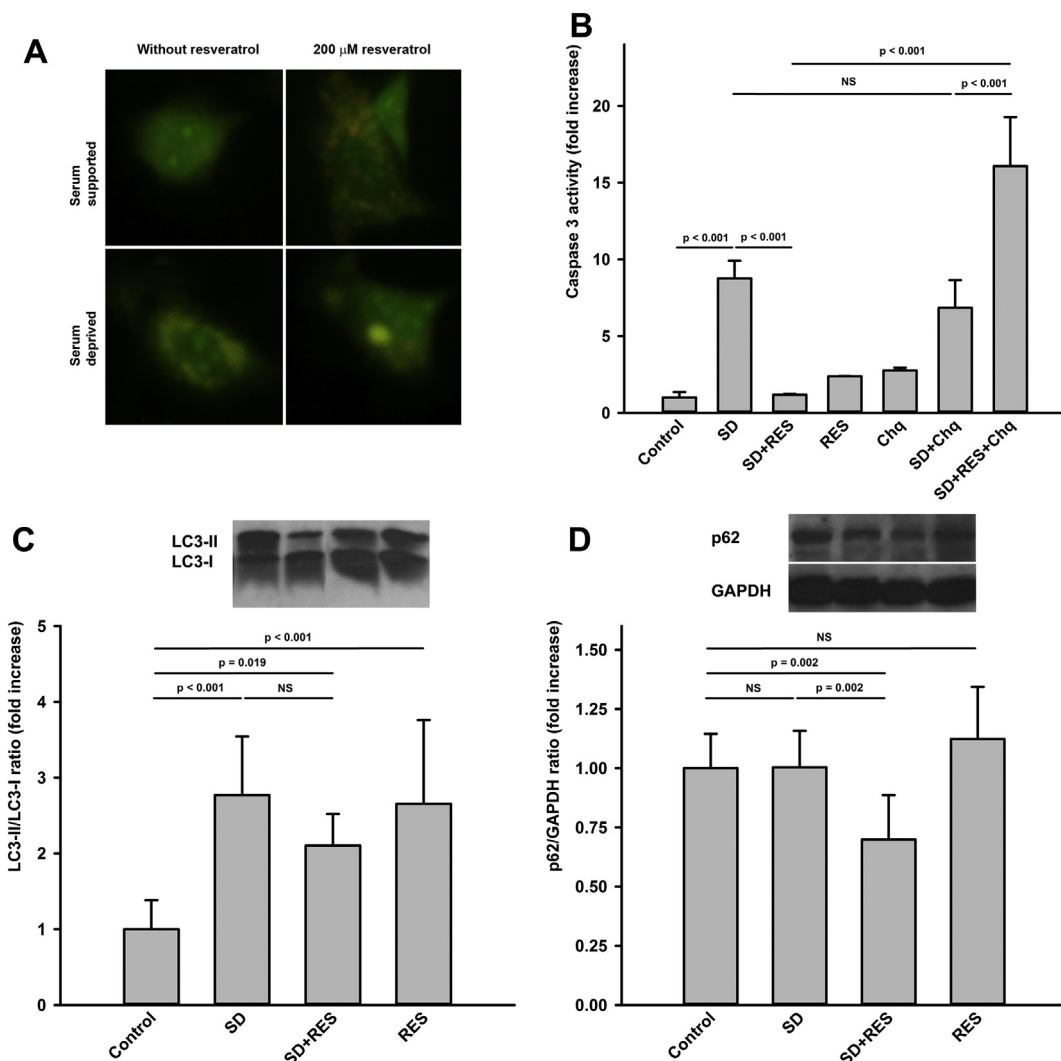


Fig. 5. The effect of resveratrol on autophagy process. **A:** The effect of serum deprivation, 200 μM resveratrol (RES) and their combination on the formation of acidic vacuoles. Yellow to orange dots in the cytoplasm represent acidic vacuoles. Representative images are shown. **B:** The effect of the autophagy inhibitor, 100 μM chloroquine (Chq) on the protective action of 200 μM resveratrol (RES) against serum deprivation (SD) induced caspase 3 activation. **C-D:** Expression of protein markers of autophagy. The effect of serum deprivation, 200 μM resveratrol (RES) and their combination on the ratio of LC3-II/LC3-I (**C**) and degradation of p62 protein (**D**). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

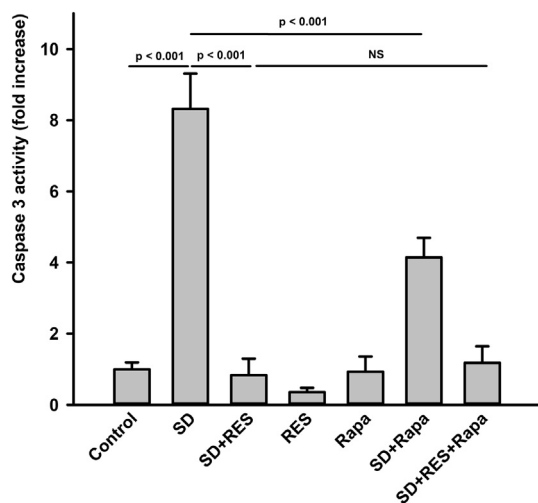


Fig. 6. The effect of mTOR inhibitor, 100 nM rapamycin (Rapa) on the protective action of 200 μM resveratrol (RES) against serum deprivation (SD) induced caspase 3 activation.

effect of resveratrol is independent of inhibition or activation of Ah receptors.

Many reports identified resveratrol as an estrogen receptor modulator and many of its effects are suggested to be based on this activity, however these data are often contradictory. Its antitumor activity was shown to be the consequence of apoptosis induction *via* activating estrogen receptors in GH3 prolactinoma cells (Wang et al., 2012), while its antiproliferative effect in endometrial carcinoma cells was explained at least partly by antagonizing the effect of estrogen (Bhat and Pezzuto, 2001). Molecular dynamic simulations revealed that resveratrol acts rather as a selective estrogen receptor modulator and its actual effect is highly dependent on the cellular environment and presence of co-regulator proteins (Chakraborty et al., 2013). In our present experiments, tamoxifen did not affect the protective influence of resveratrol on caspase activation, moreover similarly to resveratrol it was able to prevent serum deprivation induced caspase activation. However, tamoxifen is not an estrogen receptor antagonist but a partial agonist with low intrinsic activity and is also characterized by numerous other effects including modulation of autophagy (Chen et al., 2015; Cho et al., 2012). To clearly understand the role of estrogen receptors in the caspase activation preventing effect of resveratrol the pure estrogen receptor

antagonist fulvestrant and agonist estradiol were also tested. Fulvestrant highly potentiated caspase activation after serum deprivation suggesting that endogenous estrogen may have a strong protective effect against noxious insults. On the other hand, the estrogen receptor antagonist caused only mild, non-significant increase of serum deprivation induced caspase activity in the presence of resveratrol. This small elevation may be explained by the strongly aggravated caspase activation in the presence of fulvestrant and the results suggest that the present effect of resveratrol is not associated with the activation of estrogen receptors. This is further confirmed by the effect of estradiol that interestingly also exaggerated the caspase activation after serum deprivation. Similar findings have been reported elsewhere, showing that estradiol can exert both neuroprotective and neurodamaging activity in a dose-dependent manner (Strom et al., 2011).

Based on our previous findings, that p38 stress kinase pathway is critical for the cytoprotective effect of resveratrol (Ulakcsai et al., 2015), we investigated the role of mitochondrial dysfunction and ROS generation as possible sources of cellular stress in its protective effect. We found that neither serum deprivation nor resveratrol alone influence mitochondrial membrane potential, but resveratrol caused significant mitochondrial depolarization in serum deprived cells. In line with our results resveratrol was previously reported to regulate mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial complex I was identified as its target. Whether it has anti- or prooxidant effects was suggested depending on its dose, the treatment duration and cellular redox status. Importantly, the effect of resveratrol can differ in the presence or absence of cellular stress (Gueguen et al., 2015).

Although mitochondrial dysfunction is regarded as the major source of ROS (Turrens, 2003), in the present study we found that neither serum deprivation nor resveratrol treatment caused significant alteration in the ROS production. These results might be explained by the direct antioxidant effect of the compound that may compensate the ROS generation induced by the mitochondrial damage. By this way the induced intracellular stress may be kept in a low range that activates the cytoprotective machineries, such as autophagy, instead of direct cellular damage. This process can mimic the effect of ischemic preconditioning by increasing the stress resistance induced by mild damage. Activation of various signal transduction pathways including p38 kinase signaling was reported as molecular mechanisms involved in the preconditioning (Ping and Murphy, 2000) that is in line with our previous findings.

Because mitochondrial membrane depolarization and activation of p38 kinase pathway are commonly associated to autophagy and both tamoxifen and resveratrol were reported to modulate autophagy our interest turned to this latter mechanism (Chen et al., 2015; Cho et al., 2012; Liu et al., 2015). Autophagy can be a protective mechanism and can enhance the stress-resistance by eliminating the damaged cell organelles. Autophagy was e.g. reported promoting survival against dasatinib-induced hepatotoxicity in primary hepatocytes (Yang et al., 2015). In the present study chloroquine an established late phase autophagy inhibitor (Ganguli et al., 2014) entirely eliminated the inhibitory effect of resveratrol on serum deprivation induced caspase activation, which suggests the importance of autophagy in its cytoprotective function. Moreover, chloroquine not only abolished but inverted the effect of resveratrol on caspase activity, which reached even a higher level compared to that in case of serum deprivation alone. As in the absence of resveratrol chloroquine with or without serum deprivation did not affect caspase activation, its aggravation is likely the consequence of turning the effect of resveratrol from protective to harmful direction. Induction of autophagy by both serum deprivation and resveratrol was also confirmed by acridine orange staining indicating increased number of acidic vacuoles in the cells.

The involvement of autophagy in the protective effect of resveratrol was further confirmed by examining the levels of LC3 and p62, marker proteins of early and late autophagy, respectively. Conversion of LC3-I to LC3-II by conjugation to phosphatidylethanolamine is a critical step

of isolation membrane formation of autophagosomes. Their ratio thus is the most well-established marker of autophagy. Increased amount of LC3-II or LC3-II/LC3-I ratio was proposed to reflect solely the accumulation of autophagosomes, which can be the consequence of either their increased generation, a reduction in their turnover or both (Y. Zhang et al., 2016). We can have a better insight about the autophagic flux by assessing the degradation of p62, an adaptor protein involved in targeting of ubiquitinated proteins to the autophagosomes, where it is also degraded (Mizushima and Yoshimori, 2007). Our data suggest that serum deprivation itself upregulated the autophagosome formation, but it was not accompanied by an increase in the autophagic flux. Resveratrol affected this latter process, indicated by increased degradation of p62, thus improving the late phase of autophagy may contribute to its cytoprotective activity. Corcelle et al. previously reported that inhibition of p38 interferes mainly the late, maturation step of autophagy (Corcelle et al., 2007). This is in accordance with our previous and present findings showing that resveratrol prevents caspase activation by induction of autophagy in a p38 MAPK dependent manner.

Serum deprivation induced cell death in HT22-cells was also found accompanied by significant elevation of LC3-II/LC3-I ratio but the inhibition of autophagy was rather deleterious than protective (Steiger-Barraissoul and Rami, 2009), similarly to our present results. We can thus speculate that up-regulation of autophagy secondary to serum deprivation is a counterregulatory process aiming at elimination of damages, but it may not be enough to overcome the apoptotic process. Facilitation of autophagy thus can be supposed to be cytoprotective by counteracting the apoptosis activation. Resveratrol may enhance this cytoprotective mechanism *via* facilitation of autophagic flux.

Similar results were recently reported in other models of cellular damage that further confirm the cytoprotective effect of resveratrol and the role of autophagy induction in the process. Elevated autophagy and involvement of p38 MAPK activation were found during protection of resveratrol against oxidative stress induced damage in H9c2 cardiomyocytes (Lv and Zhou, 2012).

Previously it was suggested that resveratrol induces autophagy *via* promoting AMPK phosphorylation when ATP level decreases because of mild mitochondrial damage and prevents cell death as the consequence of autophagy provocation (Duan et al., 2016; Gu et al., 2016; Hasima and Ozpolat, 2014). It is also known however, that AMPK can promote p38 MAPK activation (Lanna et al., 2014; Li et al., 2005), thus these reports are in line with our results and hypothesis that intracellular stress caused by resveratrol enhances AMPK/p38 pathway-induced autophagy resulting in cytoprotection.

Neurotoxin induced damage of PC12 cells was also attenuated by resveratrol through inducing autophagy. In this model activation of SIRT was identified as upstream pathway of autophagy related cytoprotection (Deng and Mi, 2016). In other studies in HUVEC cells and HT22 cells similarly SIRT dependent increased autophagic flux by resveratrol was found important in reduction of oxidized LDL and endoplasmatic reticulum stress induced damage, respectively (Y. Zhang et al., 2016; Yan et al., 2018). In our previous experiments, however SIRT-1 inhibitor did not interfere with the caspase activation preventing effect of resveratrol (Ulakcsai et al., 2015), raising the possibility of cell or damage type specific regulation pathways.

Since modulation of mTOR pathway has been proposed to be responsible for the cardioprotective effects of resveratrol and mTOR plays a key role in regulation of autophagy (Gurusamy et al., 2010) we aimed at clarifying whether resveratrol prevents caspase activation by altering mTOR activity. Although rapamycin, the selective and potent mTOR inhibitor also reduced the serum deprivation induced caspase activation, its effect was only partial. This finding further confirms the protective effect of autophagy induction but suggests that resveratrol exerts its effect on an mTOR independent pathway. In addition to mTOR, stress kinases also participate in the induction of autophagy (for review Sui et al., 2014.) that is in line with our previous results showing pivotal role of p38 kinase activity in the caspase activation preventing effect of

resveratrol (Ulakcsai et al., 2015.)

Limitations: A major limitation of this study is the use of mouse embryonic fibroblast instead of human cells due to ethical concerns, thus further translational experiments are required to analyze the protective effect of resveratrol in humans.

5. Conclusion

Based on our present data we can hypothesize that resveratrol causes a mild mitochondrial damage in serum deprived primary fibroblasts, which can induce autophagy via p38 dependent pathway and protect cells from apoptosis by removing dysfunctional cell constituents.

Our present hypothesis might explain some of the contradictory data regarding the pro- and anti-apoptotic effect of resveratrol. It induces a mild damage *per se* that can result in either potentiation of stress resistance pathways or direct cytotoxicity depending on the actual circumstances e.g. its concentration, the cell type studied, the intensity of damaging insult or mitochondrial redox status.

References

- Alexander, David L., Eltom, Sakina E., Jefcoate, Colin R., 1997. Ah receptor regulation of CYP1B1 expression in primary mouse embryo-derived cells. *Cancer Res.* 57, 4498–4506.
- Andrews, N.C., Faller, D.V., 1991. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 19, 2499.
- Baarine, M., Thandapilly, S.J., Louis, X.L., Mazue, F., Yu, L., Delmas, D., Neticadan, T., Lizard, G., Latruffe, N., 2011. Pro-apoptotic versus anti-apoptotic properties of dietary resveratrol on tumoral and normal cardiac cells. *Genes Nutr.* 6, 161–169.
- Barger, J.L., Kayo, T., Vann, J.M., Arias, E.B., Wang, J., Hacker, T.A., Wang, Y., Raederstorff, D., Morrow, J.D., Leeuwenburgh, C., Allison, D.B., Saupe, K.W., Cartee, G.D., Weindruch, R., Prolla, T.A., 2008. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS One* 3.
- Beedanagari, S.R., Bebenek, I., Bui, P., Hankinson, O., 2009. Resveratrol inhibits dioxin-induced expression of human CYP1A1 and CYP1B1 by inhibiting recruitment of the aryl hydrocarbon receptor complex and RNA polymerase II to the regulatory regions of the corresponding genes. *Toxicol. Sci.* 110, 61–67.
- Bhat, K.P., Pezzuto, J.M., 2001. Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells. *Cancer Res.* 61, 6137–6144.
- Bolck, B., Ibrahim, M., Steinritz, D., Morguet, C., Duhr, S., Suhr, F., Lu-Hesselmann, J., Bloch, W., 2014. Detection of key enzymes, free radical reaction products and activated signaling molecules as biomarkers of cell damage induced by benzo[a]pyrene in human keratinocytes. *Toxicol. in Vitro* 28, 875–884.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Casper, R.F., Quesne, M., Rogers, I.M., Shirota, T., Jolivet, A., Milgrom, E., Savouret, J.F., 1999. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. *Mol. Pharmacol.* 56, 784–790.
- Chakraborty, S., Levenson, A.S., Biswas, P.K., 2013. Structural insights into Resveratrol's antagonist and partial agonist actions on estrogen receptor alpha. *BMC Struct. Biol.* 13, 27.
- Chen, Y.R., Tsou, B., Hu, S., Ma, H., Liu, X., Yen, Y., Ann, D.K., 2015. Autophagy induction causes a synthetic lethal sensitization to ribonucleotide reductase inhibition in breast cancer cells. *Oncotarget* 7, 1984–1999.
- Cho, K.S., Yoon, Y.H., Choi, J.A., Lee, S.J., Koh, J.Y., 2012. Induction of autophagy and cell death by tamoxifen in cultured retinal pigment epithelial and photoreceptor cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 5344–5353.
- Corcelle, E., Djerbi, N., Mari, M., Nebout, M., Fiorini, C., Fénelon, P., Hofman, P., Poujeol, P., Mograbi, B., 2007. Control of the autophagy maturation step by the MAPK ERK and p38: lessons from environmental carcinogens. *Autophagy* 3, 57–59.
- de la Lastra, C.A., Villegas, I., 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1156–1160.
- Deng, H., Mi, M.T., 2016. Resveratrol attenuates Aβ25–35 caused neurotoxicity by inducing autophagy through the TyrRS-PARP1-SIRT1 signaling pathway. *Neurochem. Res.* 41, 2367–2379.
- Duan, W.J., Li, Y.F., Liu, F.L., Deng, J., Wu, Y.P., Yuan, W.L., Tsoi, B., Chen, J.L., Wang, Q., Cai, S.H., Kurihara, H., He, R.R., 2016. A SIRT3/AMPK/autophagy network orchestrates the protective effects of trans-resveratrol in stressed peritoneal macrophages and RAW 264.7 macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* 95, 230–242.
- Ganguli, A., Choudhury, D., Datta, S., Bhattacharya, S., Chakrabarti, G., 2014. Inhibition of autophagy by chloroquine potentiates synergistically anti-cancer property of artemisinin by promoting ROS dependent apoptosis. *Biochimie* 107 (Pt B), 338–349.
- Gehm, B.D., McAndrews, J.M., Chen, P.Y., Jameson, J.L., 1999. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14138–14143.
- Gu, J., Hu, W., Song, Z.-p., Chen, Y.-g., Zhang, D.-d., Wang, C.-q., 2016. Resveratrol-induced autophagy promotes survival and attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Int. Immunopharmacol.* 32, 1–7.
- Gueguen, N., Desquiere-Dumas, V., Leman, G., Chupin, S., Baron, S., Nivet-Antoine, V., Vessières, E., Ayer, A., Henrion, D., Lenaers, G., Reynier, P., Proccacio, V., 2015. Resveratrol directly binds to mitochondrial complex I and increases oxidative stress in brain mitochondria of aged mice. *PLoS One* 10, 12.
- Gurusamy, N., Lekli, L., Mukherjee, S., Ray, D., Ahsan, M.K., Gherghiceanu, M., Popescu, L.M., Das, D.K., 2010. Cardioprotection by resveratrol: a novel mechanism via autophagy involving the mTORC2 pathway. *Cardiovasc. Res.* 86, 103–112.
- Harper, P.A., Golas, C.L., Okey, A.B., 1991. Ah receptor in mice genetically "non-responsive" for cytochrome P4501A1 induction: cytosolic Ah receptor, transformation to the nuclear binding state, and induction of aryl hydrocarbon hydroxylase by halogenated and nonhalogenated aromatic hydrocarbons in embryonic tissues and cells. *Mol. Pharmacol.* 40, 818–826.
- Hasima, N., Ozpolat, B., 2014. Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cell Death Dis.* 5, e1509.
- Hsieh, T., Wu, J.M., 2010. Resveratrol: biological and pharmaceutical properties as anticancer molecule. *Biofactors* 36, 360–369 (Oxford, England).
- Kalantari, H., Das, D.K., 2010. Physiological effects of resveratrol. *Biofactors* 36, 401–406 (Oxford, England).
- Kim, Y.C., Guan, K.L., 2015. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J. Clin. Investig.* 125, 25–32.
- Kovacic, P., Somanathan, R., 2010. Multifaceted approach to resveratrol bioactivity: focus on antioxidant action, cell signaling and safety. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 3, 86–100.
- Lanna, A., Henson, S.M., Escors, D., 2014. The Kinase p38 Activated by the Metabolic Regulator AMPK and Scaffold TAB1 Drives the Senescence of Human T Cells. *PLoS One* 9, e965–972.
- Li, J., Miller, E.J., Ninomiya-Tsuji, J., Russell 3rd, R.R., Young, L.H., 2005. AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart. *Circ. Res.* 97, 872–879.
- Li, Q., Huan, T., Ye, L.J., Li, J., Shi, J.L., Huang, Q.S., 2014. Concentration-dependent biphasic effects of resveratrol on human natural killer cells in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 62, 10928–10935.
- Lionaki, E., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N., 2015. Mitochondria, autophagy and age-associated neurodegenerative diseases: new insights into a complex interplay. *Biochim. Biophys. Acta* 1847, 1412–1423.
- Liu, L., Zou, P., Zheng, L., Linarelli, L.E., Amarell, S., Passaro, A., Liu, D., Cheng, Z., 2015. Tamoxifen reduces fat mass by boosting reactive oxygen species. *Cell Death Dis.* 8 (6), e1586.
- Lovelace, E.S., Polyak, S.J., 2015. Natural products as tools for defining how cellular metabolism influences cellular immune and inflammatory function during chronic infection. *Virus* 7, 6218–6232.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- 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.
- Lv, X.C., Zhou, H.Y., 2012. Resveratrol protects H9c2 embryonic rat heart derived cells from oxidative stress by inducing autophagy: role of p38 mitogen-activated protein kinase. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 90, 655–662.
- Marsh, K.M., Schipper, D., Ferng, A.S., Johnson, K., Fisher, J., Knapp, S., Dicken, D., Khalpey, Z., 2017. Metabolic impact of rapamycin (sirolimus) and beta-estradiol using mouse embryonic fibroblasts as a model for lymphangioliomyomatosis. *Lung* 195, 425–430.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3, 542–545.
- Mohammadi-Bardbori, A., Bengtsson, J., Rannug, U., Rannug, A., Wincent, E., 2012. Quercetin, resveratrol, and curcumin are indirect activators of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1878–1884.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., Behringer, R., 2006. Preparing mouse embryo fibroblasts. *CSH Protocols* 2006 (1) (pdb.prot 4398).
- Paquette, M., El-Houjeiri, L., Pause, A., 2018. mTOR pathways in cancer and autophagy. *Cancers (Basel)* 10, E18.
- Ping, P., Murphy, E., 2000. Role of p38 mitogen-activated protein kinases in pre-conditioning: a detrimental factor or a protective kinase? *Circ. Res.* 86, 921–922.
- Puissant, A., Robert, G., Fenouille, N., Luciano, F., Cassuto, J.P., Raynaud, S., Auberger, P., 2010. Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer Res.* 70, 1042–1052.
- Qiu, Lian-Qun, Lai, W. S., Stumpo, Deborah J., Blackshear, Perry J., 2016. Mouse embryonic fibroblast cell culture and stimulation. *Bio Protocols* 6, e1859.
- Steiger-Barraisoul, S., Rami, A., 2009. Serum deprivation induced autophagy and predominantly an AIF-dependent apoptosis in hippocampal HT22 neurons. *Apoptosis* 14, 1274–1288.
- Strom, J.O., Theodorsson, A., Theodorsson, E., 2011. Mechanisms of estrogens' dose-dependent neuroprotective and neurodamaging effects in experimental models of cerebral ischemia. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 1533–1562.
- Sui, X., Kong, N., Ye, L., Han, W., Zhou, J., Zhang, Q., He, C., Pan, H., 2014. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett.* 344, 174–179.
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344.
- Ulakcsai, Z., Bagamery, F., Vincze, I., Szoko, E., Tabi, T., 2015. Protective effect of resveratrol against caspase 3 activation in primary mouse fibroblasts. *Croat. Med. J.* 56,

- 78–84.
- Wang, C., Hu, Z.-q., Chu, M., Wang, Z., Zhang, W.-g., Wang, L.-z., Li, C.-g., Wang, J.-S., 2012. Resveratrol inhibited GH3 cell growth and decreased prolactin level via estrogen receptors. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 114, 241–248.
- Wudtiwai, B., Sripanidkulchai, B., Kongtawelert, P., Banjerpongchai, R., 2011. Methoxyflavone derivatives modulate the effect of TRAIL-induced apoptosis in human leukemic cell lines. *J. Hematol. Oncol.* 4, 52.
- Yan, W.J., Liu, R.B., Wang, L.K., Ma, Y.B., Ding, S.L., Deng, F., Hu, Z.Y., Wang, D.B., 2018. Sirt3-mediated autophagy contributes to resveratrol-induced protection against ER stress in HT22 cells. *Front. Neurosci.* 12, 116.
- Yang, X., Wang, J., Dai, J., Shao, J., Ma, J., Chen, C., Ma, S., He, Q., Luo, P., Yang, B., 2015. Autophagy protects against dasatinib-induced hepatotoxicity via p38 signaling. *Oncotarget* 6, 6203–6217.
- Zhang, Q., Wang, Y., Man, L., Zhu, Z., Bai, X., Wei, S., Liu, Y., Liu, M., Wang, X., Gu, X., Wang, Y., 2016. Reactive oxygen species generated from skeletal muscles are required for gecko tail regeneration. *Sci. Rep.* 6, 20752.
- Zhang, Y., Cao, X., Zhu, W., Liu, Z., Liu, H., Zhou, Y., Cao, Y., Liu, C., Xie, Y., 2016. Resveratrol enhances autophagic flux and promotes ox-LDL degradation in HUVECs via upregulation of SIRT1. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2016, 7589813.
- Zhou, J., Huo, X., Botchway, B.O.A., Xu, L., Meng, X., Zhang, S., Liu, X., 2018. Beneficial effects of resveratrol-mediated inhibition of the mTOR pathway in spinal cord injury. *Neural Plast.* 2018, 7513748.