

Univerza v *Ljubljani*
Fakulteta *za farmacijo*



NEŽA VRTAČNIK

**VREDNOTENJE PROTIVNETNEGA IN ANTIOKSIDATIVNEGA
DELOVANJA 1,2,4 – OKSADIAZOLNIH DERIVATOV
RESVERATROLA**

**EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT
ACTIVITY OF 1,2,4-OXADIAZOLE ANALOGS OF RESVERATROL**

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm. in na Katedri za klinično biokemijo pod somentorstvom asist. dr. Martine Gobec, mag. farm.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju, doc. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm., za strokovne nasvete pri opravljanju ter pisanju diplomskega dela in somentorici, asist. dr. Martini Gobec, mag. farm., za vse praktične nasvete, pomoč pri laboratorijskem delu diplomske naloge in zabavne pogovore med pavzicami. Iz srca se zahvaljujem tudi mojemu fantu Luku za vso potrpežljivost in spodbudo, za vse Kinder jajčke, druga mala presenečenja in za vse lepe trenutke med študijem. Največja zahvala gre mojim staršem in celotni družini, ki mi že od nekdaj stoji ob strani in so bili vedno moja opora in zatočišče ob hudih stiskah. Brez vas me danes ne bi bilo tukaj. Ati, mami, Tjaša, Eva in Ana, rada vas imam vse.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm. in somentorice asist. dr. Martine Gobec, mag. farm.

Neža Vrtačnik

Ljubljana, marec 2014

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Darko Černe, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Mojca Lunder, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	III
KAZALO ENAČB.....	IV
SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV.....	VII
1 UVOD	1
1.1 RESVERATROL	1
1.2 VSI UČINKI RESVERATROLA	2
1.3 DELOVANJE NA IMUNSKI SISTEM.....	4
1.3.1 Reaktivne kisikove spojine.....	4
1.3.2 Vnetje	5
1.3.3 LPS	6
1.4 TARČE PROTIVNETNEGA DELOVANJA.....	7
1.4.1 Učinki na arahidonsko kislino.....	7
1.4.2 Učinki na aktivatorski protein 1	8
1.4.3 Učinki na signalno pot NF- κ B.....	8
1.5 ANALOGI RESVERATROLA	11
2 NAMEN DELA	13
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI.....	15
3.1.1 Kemikalije	15
3.1.2 Reagenti.....	16
3.1.3 Kompleti.....	16
3.1.4 Protitelesa.....	17
3.1.5 Pufri in raztopine.....	17
3.1.6 Geli za SDS-PAGE	18
3.1.7 Gojišča.....	19
3.1.8 Laboratorijska oprema.....	20
3.1.9 Celične kulture	22
3.2 METODE DELA S CELICAMI.....	23
3.2.1 Gojenje celic.....	23

3.2.2 Subkultiviranje celičnih linij	23
3.2.3 Odmrzovanje celic.....	23
3.3 ŠTETJE CELIC.....	24
3.4 TEST ZA DOLOČANJE CELIČNE METABOLNE AKTIVNOSTI Z	25
REAGENTOM MTS	25
3.5 MERJENJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA	26
3.6 QUANTI-BLUE™ TEST ZA UGOTAVLJANJE AKTIVNOSTI ALKALNE FOSFATAZE	28
3.7 IZOLACIJA IN MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV.....	29
3.8 PRENOS PO WESTERNU.....	30
3.9 MERJENJE CITOKINOV	32
3.10 STATISTIČNA ANALIZA	33
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	34
4.1. VREDNOTENJE CITOTOKSIČNOSTI 1,2,4-OXSADIAZOLNIH ANALOGOVI RESVERATROLA	36
4.3 PREVERJANJE MODULACIJE POTI NF- κ B PO DODATKU C12-iE- DAP	39
4.4 CITOKINI.....	43
5 SKLEP.....	46
6 LITERATURA	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijski strukturi <i>cis</i> - in <i>trans</i> -resveratrola.....	1
Slika 2: Aktivacija NF- κ B preko klasične poti.....	9
Slika 3: Aktivacija MAPK poti.....	10
Slika 4: Prikaz struktur sulfatnih analogov resveratrola in različno substituiranih analogov resveratrola.....	11
Slika 5: Struktura 3,5,3',4'-tetrahidroksi- <i>trans</i> -stilbena (piceatanola), 3,4,5,3',4',5'-heksahidroksi- <i>trans</i> -stilbena in 4,4'-dihidroksi- <i>trans</i> -stilben (DHS).....	12
Slika 6: Knjižnica 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola.....	14
Slika 7: Shematski prikaz celičnega metabolizma reagenta MTS.....	25
Slika 8: Shematski prikaz celičnega delovanja barvila H ₂ DCFDA.....	27
Slika 9: Shematski prikaz delovanja citokinskega kompleta.....	33
Slika 10: Metabolna aktivnost THP-1 celične linije po 24 h tretiranju z resveratrolom (R) ali 1,2,4-oksadiazolnimi analogi.....	37
Slika 11: Določanje reaktivnih kisikovih zvrsti.....	38
Slika 12: Vpliv analogov na NF- κ B aktivnost.....	39
Slika 13: Analiza zaviralnih molekul NF- κ B (I κ B α) z metodo prenosa po Westernu.....	41
Slika 14: Analiza ERK 1/2 proteinov z metodo prenosa po Westernu.....	41
Slika 15: Določanje koncentracije IL-8, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 in IL-12p70.....	44

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Računanje koncentracije celic s hemocitometrom.....24

Enačba 2: Računanje odstotka metabolne aktivnosti celic.....26

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Prikaz 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola.....34

POVZETEK

Resveratrol je naravni stilben, ki se nahaja v številnih rastlinah. Ima mnoge znane zdravilne učinke, med drugim tudi antioksidativno in protivnetno delovanje, zato je veliko študij usmerjenih v iskanje novih analogov in izboljšanje njegove biološke aktivnosti. V sklopu dela smo vrednotili antioksidativne in protivnetne učinke 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola, ki so bili predhodno sintetizirani na Katedri za farmacevtsko kemijo. Kot testni sistem smo izbrali monocitno celično linijo THP-1 in najprej preverili potencialno citotoksičnost analogov. S testom presnovne aktivnosti smo ugotovili, da resveratrol in analogi pri koncentraciji 25 μM minimalno vplivajo na viabilnost THP-1 celične linije, zato smo druga biološka vrednotenja nadaljevali v tej koncentraciji. V prvem delu smo se osredotočili na določanje antioksidativnega potenciala analogov. Celicam smo dodali *tert*-butil hidroperoksid (TBH), ki poveča prisotnost reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Ugotovili smo, da ima spojina **2** antioksidativno delovanje primerljivo z resveratrolom, saj se je obseg ROS v njeni prisotnosti močno znižal. V drugem delu smo se osredotočili na protivnetno delovanje spojin. Znano je, da transkripcijski faktorji NF- κ B regulirajo prepis številnih genov, kar vključuje tudi citokine. Nadalje smo zato preverili možnost modulacije signalne poti NF- κ B na reporterski celični liniji Ramos Blue in ugotovili, da zaviralno delovanje ob resveratrolu izkazujeta predvsem spojini **2** in **4**, ki za več kot 50 % zmanjšata s C12-iE-DAP povzročeno aktivacijo signalne poti NF- κ B. Nadalje smo želeli preveriti vpliv resveratrola in najbolj perspektivne spojine **2** na signalne poti, ki so vpletene v regulacijo nekaterih vnetnih dejavnikov. Z metodo prenosa po Westernu smo analizirali zaviralne proteine transkripcijskega faktorja NF- κ B. Ugotovili smo, da spojina **2** povzroči zmanjšanje fosforilirane oblike I κ B, medtem ko celokupna oblika ostaja enaka, kar zmanjša signalizacijo NF- κ B poti in lahko vodi do protivnetnega učinka. Ker smo potrdili, da spojina **2** inhibira signalno pot NF- κ B, ki je vpletena v regulacijo številnih vnetnih citokinov, smo nazadnje ugotavljali še vpliv resveratrola in spojine **2** na izločanje različnih citokinov. V THP-1 celični liniji je spojina **2** zmanjšala izločanje z lipopolisaharidom (LPS) induciranih citokinov, in sicer interleukina 1 β (IL-1 β), interleukina 8 (IL-8) ter dejavnika tumorske nekroze α (TNF- α). Spojina **2** tako predstavlja odlično izhodišče za nadaljnji razvoj novih analogov resveratrola s protivnetnim in antioksidativnim delovanjem.

ABSTRACT

Resveratrol is a natural stilbene, located in a number of plants, and has many well-known therapeutic effects, including anti-oxidative and anti-inflammatory activity. Many studies have focused on the search for new analogues of resveratrol with the aim of improving its biological activity. 1,2,4-oxadiazole analogues of resveratrol were previously synthesized in the context of a different diploma thesis. Our research goal was to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory effects of these analogues. First we evaluated the potential cytotoxicity of the compounds towards the monocytic cell line THP-1 using the metabolic activity assay. We found that resveratrol and its analogues at 25 μM concentration have a nonsignificant impact on the viability of the THP-1 cells. Next, we wanted to verify the antioxidant potential of the compounds on *tert*-butyl hydroperoxide-induced reactive oxygen species. Compound **2** has shown a significant antioxidant effect, as it significantly decreased the level of reactive oxygen species when compared to those induced by *tert*-butyl hydroperoxide. In the second part of the thesis we addressed the anti-inflammatory potential of the analogues. Quanti-Blue™ assay was performed to evaluate the compounds' effect on modulation of NF- κ B signaling pathway, which is involved in regulation of several cytokines. Some of the compounds have shown an inhibitory effect on the NF- κ B signalling pathway; in particular compounds **2**, **4** and resveratrol, which have caused more than 50 % reduction in the transcription of NF- κ B induced by C12-iE-DAP, a known activator of the NF- κ B signalling pathway. To shed more light on the influence of resveratrol and the most promising compound **2** on the intracellular signalling pathway we performed Western blot and analysed the inhibitory proteins of the NF- κ B. Compound **2** caused a reduction in phosphorylated forms of I κ B, which indicates reduced activation of the NF- κ B. Since NF- κ B signalling pathway was affected by compound **2**, we assessed its influence on the secretion of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytokines in THP-1 cells compared to that of resveratrols. Compound **2** caused a decreased secretion of several cytokines, namely interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 8 (IL-8) and tumor necrosis factor α (TNF- α). Compound **2** thus represents an excellent starting point for the development of novel resveratrol analogues, possessing improved anti-oxidative and anti-inflammatory activity.

SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV

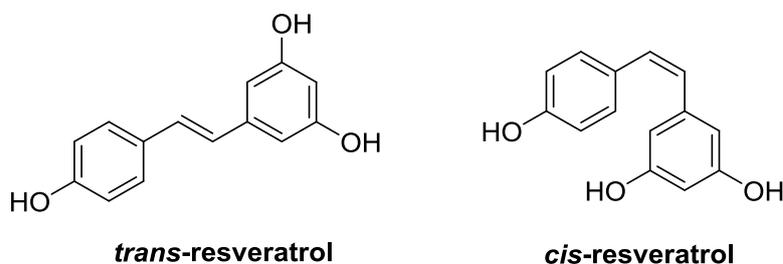
AP-1	aktivatorski protein 1
APS	amonijev persulfat
BFM	bromfenolno modro, indikator
BSA	albumin iz govejega seruma
C12-iE-DAP	agonist receptorja NOD1 in aktivator transkripcije faktorja NF- κ B
DMSO	dimetilsulfoksid
ERK	kinaza uravnana z zunajceličnim signalom (ang. extracellular signal regulated kinase)
H ₂ DCFDA	barvilo 2',7'-diklorodihidrofluorescin diacetat
I κ B α	proteini iz družine zaviralcev aktivacije NF- κ B
IKK	I κ B-kinaza
IL-1 β	interlevkin 1 β
IL-6	interlevkin 6
IL-8	interlevkin 8
IL-10	interlevkin 10
IL-12p70	interlevkin 12p70
IMDM	medij za Ramos Blue celično linijo (ime izhaja iz Iscove's Modified Dulbecco's Media)
LPS	lipopolisaharid
MAPK	z mitogenom aktivirane proteinske kinaze
MTS	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium]
NF- κ B	jedrni faktor κ B, transkripcijski faktor
PBS	raztopina fosfatnega pufra (ang. phosphate buffered saline)
p38	protein iz družine MAPK
RPMI	medij za gojenje levkemičnih celičnih linij (kratica izhaja iz Roswell Park Memorial Institute)
SEAP	izločena alkalna fosfataza
SDS	natrijev dodecilsulfat

TBH	<i>terc</i> -butil hidroperoksid
TBS	raztopina tris(hidroksimetil)aminometana (ang. tris buffered saline)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze α

1 UVOD

1.1 RESVERATROL

Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) spada med naravne stilbene ter polifenole. Ima tri hidroksilne skupine in dva aromatska obroča in se nahaja v številnih rastlinah: grozdju, murvi, ribezu, marelicah, borovnicah, brusnicah, kurkumi, v japonskem dresniku in arašidih (1-5). Čeprav so bile vse te rastline in njihovi izvlečki z različnimi terapevtskimi nameni uporabljeni že v antični zgodovini, pa je bil sam resveratrol prvič opisan šele leta 1940 kot fenolna komponenta zdravilnega belega teloha (*Veratrum grandiflorum*) (6). V rastlinah se pojavlja v dveh izomernih oblikah in sicer kot *cis*- (*Z*) in *trans*-resveratrol (*E*) (slika 1).



Slika 1: Kemijski strukturi *cis*- ((*Z*)-resveratrol, desno) in *trans*-resveratrola ((*E*)-resveratrol, levo).

Trans oblika resveratrola lahko pod vplivom UV svetlobe izomerizira v *cis* obliko, pri tem pa resveratrol delno izgubi svojo aktivnost. Resveratrol je v rastlinah biosintetiziran iz derivata kumaril in malonil-CoA z encimom stilben sintazo (7). Spada med sekundarne metabolite rastlin z nizko molekulsko maso, ki jih rastlina sintetizira kot odziv na različne vrste stresa iz okolja ali kot obrambo pred mikrobi (8). In prav te obrambne lastnosti resveratrola v rastlinah bi lahko bile osnova za njegove zdravilne učinke pri živalih in ljudeh.

Veliko zanimanje za resveratrol je tudi posledica teorije, da naj bi zmanjševal tveganje za nastanek koronarnih bolezni pri pivcih rdečega vina, ki vsebuje resveratrol. Ta teorija je znana kot francoski paradoks ("French paradox") (9) in pravi, da naj bi Francozi kljub uživanju nekoliko bolj mastne in nezdrave hrane manj boleli za najpogostejšimi boleznimi srca in ožilja. Resveratrol je sestavina belih in rdečih sort grozdja in v kožici

grozdnih jagod deluje kot obramba pred grozdno plesnijo. Več se ga nahaja v rdečem vinu, kar izvira iz postopka pridelave, med katero grozdne jagode pustijo v tekočini in jih prepustijo fermentaciji in maceraciji, medtem ko belo vino fermentira šele, ko grozdju odstranijo kožico (10). Naredili so kar nekaj raziskav pri katerih so analizirali količino resveratrola v vinih iz različnih regij. V španskih sortah so določili od 1.5-3.0 mg/L resveratrola (11, 12), medtem ko so v slovenskih rdečih vinih odkrili še višjo količino resveratrola, ki je znašala tudi do 8.7 mg/L. Še vedno pa ni znano ali je za francoski paradoks odgovorna le ena spojina ali mogoče več spojin z različnimi mehanizmi delovanja hkrati. V eni izmed študij so namreč ugotovili, da so poleg resveratrola, za kardioprotektivne učinke, do katerih pride zaradi uživanja vina, odgovorne tudi druge spojine (13). Te spojine, zlasti katehini in epikatehini, so izkazovale enak potencial kot resveratrol in so se nahajale v samem vinu v do 15-krat višjih koncentracijah kot resveratrol (14, 15). Resveratrol, ki ga zaužijemo z različnimi rastlinami se porazdeli v telesu in čeprav so te količine majhne, naj bi bile zadostne za njegove zdravilne učinke na telo in organe. Distribucija resveratrola v človeški krvi je sledeča: plazma 54.8 %, eritrociti 36.0 %, levkociti 4.9 % in trombociti 1.2 % (16).

1.2 VSI UČINKI RESVERATROLA

Odkrili so, da resveratrol lahko podaljša življenjsko dobo nekaterih manj razvitih organizmov, vključno z mušico vrste *Drosophila* (vrsta vinske mušice) in mišmi, kar je še bolj poudarilo njegov pomen in bistveno prispevalo k zanimanju za ta razmeroma preprost naravni polifenol (17, 18). Vendar pa je sposobnost, da zavira staranje, kot tudi s starostjo povezane bolezni (19), le eden od mnogih funkcionalnih vidikov resveratrola in zato so bile izvedene številne študije, ki dokazujejo, da resveratrol kot učinkovina vpliva na različne biološke procese.

Med mnogimi znanimi učinki resveratrola so tudi naslednji:

- Vpliv na metabolizem lipidov:

Ugotovili so, da ima resveratrol pozitivne učinke na metabolizem lipidov, saj pomembno zmanjša znotrajcelične koncentracije apolipoproteina B, ki je primarni lipoprotein LDL (lipoproteini z nizko gostoto) in se pojavi pri naraščajoči koncentraciji resveratrola. Poleg

tega pa je v prisotnosti resveratrola znižana tudi koncentracija estrov holesterola in trigliceridov. Resveratrol prav tako inhibira oksidacijo lipoproteinov z nizko gostoto (LDL in VLDL) in s tem zmanjša njihovo proizvodnjo (20-25).

- Kardioprotektivni učinki:

Resveratrol pomaga pri preprečevanju srčnožilnih boleznih in ščiti pred aritmijami, zmanjša pogostost in trajanje prekatne tahikardije ter ventrikularne fibrilacije pri miših (26). Z zmanjšanjem agregacije trombocitov pa prav tako pomembno prispeva k izboljšanju kardiovaskularnih boleznih (27, 28).

- Nevroprotektivni učinki:

Pri mlajših odraslih miših so s pomočjo sistemske injekcije ekscitotoksične kainske kisline inducirali nevrološke poškodbe. Te poškodbe pa so bile bistveno manjše pri skupini, ki je dolgotrajno jemala resveratrol, v primerjavi s skupino, ki resveratrola ni prejela (29). Ta dokaz delne zaščite nevronov pri kronični uporabi resveratrola *in vivo*, nakazuje, da je za oceno njegovega potenciala potrebno preiskati še druge modele nevrodegenerativnih poškodb. Čeprav natančni mehanizmi njegovih učinkov za izboljšanje nevrodegenerativnih boleznih niso čisto jasni, pa mnoge raziskave kažejo na pozitivne učinke pri nevroloških motnjah, kot so Alzheimerjeva bolezen, Parkinsonova bolezen in Huntingtonova bolezen (30, 31).

- Antidiabetični učinki:

Študije so pokazale, da ima resveratrol hipoglikemične in hipolipidemične učinke pri podganah s sladkorno boleznijo povzročeno s streptozotocinom in pri sladkorni bolezni povzročeni s streptozotocin-nikotinamidom. Resveratrol izboljša nekatere simptome sladkorne bolezni, kot so polifagija, polidipsija in izguba telesne teže (32, 33).

- Protitumorni učinki:

Zadnje čase se raziskave vse bolj usmerjajo k preiskovanju protitumornega učinka, ki naj bi ga resveratrol imel. Povezujejo ga predvsem z zmanjšanjem tveganja za razvoj raka na debelem črevesju in danki ter pri terapiji kožnega raka. Resveratrol zavira celične procese, povezane z iniciacijo, promocijo in progresijo tumorja *in vivo* ter prepreči razvoj preneoplastičnih lezij v mlečnih žlezah miši *in vitro* in pojavnost rakotvornih kožnih tumorjev pri miših (34). V drugih študijah so dokazali, da resveratrol časovno- in koncentracijsko-odvisno zavira proliferacijo rakavih celičnih linij dojke, prostate in debelega črevesja (35-38). Tudi novejša študija so pokazale, da zavira angiogenezo in metastaze pri različnih vrstah raka (39-43).

1.3 DELOVANJE NA IMUNSKI SISTEM

1.3.1 Reaktivne kisikove spojine

Reaktivne kisikove zvrsti (ang. reactive oxygen species; ROS) so visoko reaktivne spojine v obliki radikalov, ionov ali peroksidov in so stranski produkt normalne presnove kisika. Med okoljskim stresom (npr. izpostavljenost ultravijoličnim žarkom (UV) ali toploti) ali preko zunanjih virov, kot je ionizirajoče sevanje, količina teh spojin naraste, to pa povzroči obsežne poškodbe bližnjih celičnih struktur, kar imenujemo oksidativni stres.

Pomembne so predvsem tri spojine: vodikov peroksid (H_2O_2), superoksid ($\text{O}_2^{\bullet-}$) in hidroksilni radikal ($\text{OH}\bullet$).

Najbolj pogosta škoda, ki jo povzročijo radikali, je lipidna peroksidacija in onemogoča funkcionalnost membran ter homeostazo organizma. Lipidna peroksidacija se lahko hitro razširi, saj maščobe hitro reagirajo z radikali (predvsem s hidroksilnim). Posledica je smrt celice zaradi poškodovane celične membrane in nezmožnosti uvažanja hranil in kisika iz krvi in izvažanja odpadnih snovi in ogljikovega dioksida v kri. Celica tudi ni zmožna prepoznati sosednjih celic, zaradi česar se lahko začne nenadzorovano deliti, kar lahko pripomore k nastanku tumorja. Poškodbe celic lahko zaradi delovanja radikalov vodijo do razvoja raznih kroničnih bolezni, kot so na primer rak, kardiovaskularne bolezni in staranje (44).

Tekom evolucije so se razvili številni zaščitni mehanizmi pred škodljivimi vplivi ROS. Tako lahko njihove učinke zmanjšajo nekateri endogeni encimi, antioksidanti, ki so prisotni v celici (npr. glutation) in antioksidanti, ki jih pridobimo s hrano ter se nato kopičijo v celicah (npr. askorbinska kislina, β -karoten, α -tokoferol, resveratrol).

Antioksidanti so snovi, ki lahko upočasnijo ali preprečijo oksidacijo drugih molekul. Antioksidanti prekinejo širjenje reaktivnih reakcij, saj reagirajo z radikali in jih tako nevtralizirajo (odstranijo intermedie z radikali), s tem pa preprečijo oksidacijo drugih molekul. V večini primerov so antioksidanti reducenti, kot so tioli ali polifenoli. Tako tudi resveratrol lovi uničujoče radikale, s čimer ščiti celice in zavira njihovo staranje. Antioksidativno delovanje resveratrola pri preprečevanju oksidacije LDL je celo bolj učinkovito od vitamina E (45).

1.3.2 Vnetje

Vnetje je biološki odziv vaskularnih tkiv na škodljive dražljaje kot so patogeni, poškodovane (odmrle) celice ali dražeče snovi. Pride do otekline, rdečine, bolečine, povišanja lokalne (in sistemske) telesne temperature in začasne izgube funkcije tkiva. Pomen vnetne reakcije je poskus zaščite organizma, odstranitev vnetnega agensa ter obnovitev prizadetega tkiva. Na začetku je značilno povečano prehajanje plazme in belih krvničk iz krvnega obtoka v intersticij poškodovanega tkiva. Pri vnetnem odgovor sodelujejo imunski sistem, lokalno žilje ter tkivne celice (46).

V hujših primerih lahko vnetje preide v kronično obliko, kar zahteva zdravljenje celo življenje. Vnetni odgovor lahko sprožijo različni dražljaji:

Fizični dražljaji: - mehanski (tujek, mehanska poškodba),
 - toplotni (izpostavljenost vročini, mrazu),
 - sevalni (UV, infrardeče in radioaktivno sevanje),

kemični dražljaji (kislina, lugi), toksini, mikrobi (bakterije, virusi, glive, zajedavci) in alergeni.

Bele krvničke po izpostavljenosti vnetnemu agensu izločajo vnetne mediatorje, ki nato sprožijo vnetne procese. Med najpomembnejše vnetne mediatorje spadajo histamin, lizosomske proteinaze, prostaglandini, levkotrieni, citokini in dušikov oksid. Ti povzročijo vrsto bioloških reakcij. Sprva se arteriole zožijo, poveča se prepustnost sten kapilar in venul, kot posledica pa pričnejo plazma in levkociti prehajati v vnetišče (46). Do sedaj je bilo narejenih že mnogo raziskav, ki potrjujejo protivnetno delovanje resveratrola, kar priča o njegovem potencialu za zdravljenje vnetnih in avtoimunih bolezni. Čeprav študije na ljudeh niso bile številčne, pa je bilo narejenih kar nekaj raziskav na živalskih modelih, ki med drugim kažejo na učinkovitost resveratrola pri izboljšanju eksperimentalno inducirane vnetne artritisa (47), inducirane avtoimune miokarditisa (EAM) (48) in celo inducirane avtoimunskega encefalomielitisa (EAE) (49).

1.3.3 LPS

Lipopolisaharid (ang. lipopolysaccharide; LPS) je glavna sestavina zunanje membrane Gram-negativnih bakterij, ki jo mnogokrat uporabljajo pri preučevanju eksperimentalno povzročene vnetja ali poškodbe tkiva, kot tudi za preučevanje vnetnih odzivov. V študijah so ugotovili, da izpostavljenost celic sesalcev z LPS, lahko povzroči sproščanje vnetnih citokinov in posledično aktivacijo druge ravni vnetne poti, vključno s citokini, lipidnimi mediatorji in adhezijskimi molekulami, kot so dušikov oksid (NO), prostaglandin E2 (PGE2), dejavnik tumorske nekroze- α (TNF- α), interlevkin-1 β (IL-1 β), reaktivne kisikove zvrsti (ROS), inducibilna NO sintaza (iNOS) in ciklooksigenaza-2 (COX-2) (50).

1.4 TARČE PROTIVNETNEGA DELOVANJA

Za protivnetno delovanje resveratrola so pomembne predvsem tri poti delovanja: preko arahidonske kisline (ang. arachidonic acid; AA), preko jedrnega faktorja κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NF- κ B) in preko aktivatorskega proteina 1 (ang. activator protein 1; AP-1).

1.4.1 Učinki na arahidonsko kislino

Aktivacija arahidonske kisline lahko vključuje citokine, hormone in stresne signale, ki povzročijo sprostitvev AA iz fosfolipidov celične membrane, predvsem preko delovanja fosfolipaze A2. Spoščena AA se lahko pretvori v različne bioaktivne prostaglandine s pomočjo ciklooksigenaze (COX) in lipoksigenaze (LOX). Dva najbolj znana COX encima, COX-1 (konstitutivni) in COX-2 (inducirani), katalizirata pretvorbo do prostaglandina H₂ (PGH₂), ki se kasneje preko celične prostaglandin sintaze lahko pretvori v biološko aktivne derivate. Tako COX-1 kot tudi COX-2 katalizirata prve korake v biosintezi vseh prostaglandinov. Pretvorba AA do PGH₂ poteka v dveh stopnjah in na različnih aktivnih mestih na encimu. Prva reakcija vključuje deoksigenacijo AA do PGG₂, to je ciklooksigenazni korak, v nadaljnjem, peroksidaznem koraku, pa se PGG₂ s peroksidativno cepitvijo pretvori v PGH₂ (51-53).

Dokazali so, da resveratrol lahko zavira s COX-2 posredovane učinke na različnih ravneh. Izkazalo se je, da resveratrol zniža s forbol miristat acetatom (ang. phorbol myristate acetate; PMA) povzročeno transkripcijo COX-2 v človeških epitelijskih celicah z zaviranjem prenosa signalov proteinske kinaze C (ang. protein kinase C; PKC) na več nivojih (54). Resveratrol lahko blokira s PMA povzročeno translokacijo PKC iz citosola do membrane. Poleg tega resveratrol prepreči indukcijo promotorske aktivnosti COX-2, ki jo posreduje kinaza uravnana z zunajceličnim signalom (ang. extracellular signal-regulated kinases; ERK-1) in C-Jun (del AP-1). Resveratrol pa lahko tudi neposredno blokira aktivnost COX-2, kar je bilo dokazano tako v *in vitro* kot v *ex vivo* raziskavah (54).

1.4.2 Učinki na aktivatorski protein 1

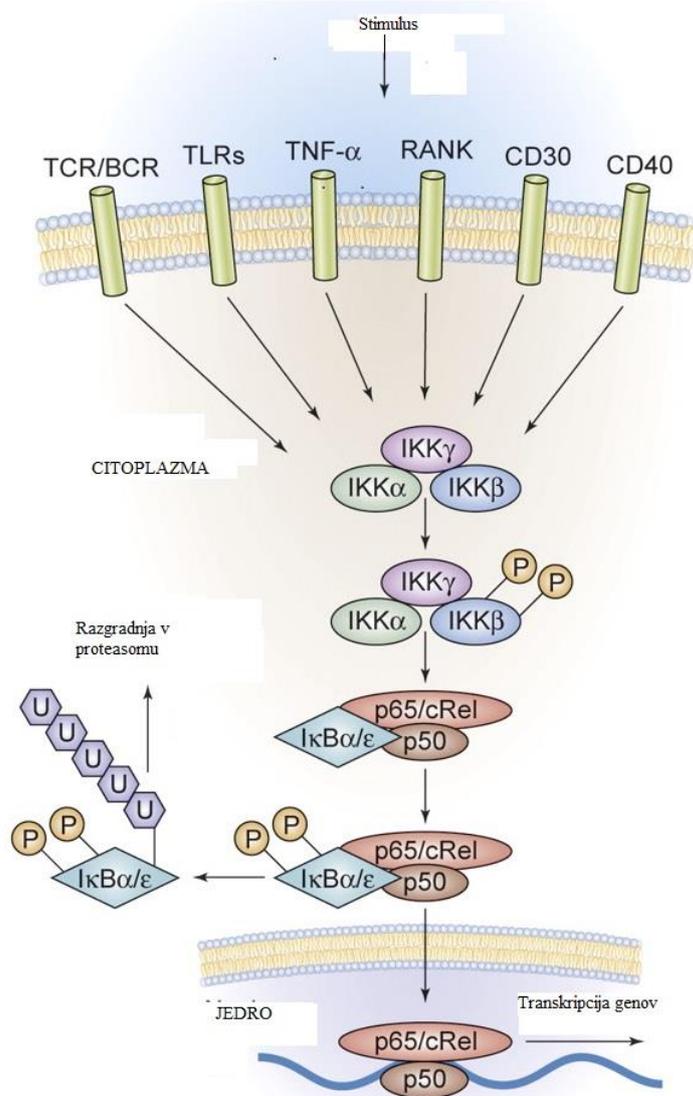
AP-1 je transkripcijski faktor in dimerni kompleks, ki vključuje JUN, FOS, aktivatorski transkripcijski faktor (ang. activating transcription factor; ATF) in aktivatorski faktor makrofagov (ang. macrophage activating factor; MAF) proteinske družine. V različnih eksperimentalnih modelih so do sedaj pokazali, da resveratrol sodeluje v AP-1 poti, prvič pred približno desetimi leti, ko je poglobljena raziskava nakazovala na vpletenost tako NF- κ B kot tudi AP-1 poti (55). Dokazali so, da resveratrol posredno inhibira izražanje COX-2 preko inhibicije AP-1 (55). Številne študije na imunskih celičnih linijah so pokazale pomembne protivnetne učinke resveratrola. Vnetni citokini, kot so TNF- α , so glavni akterji v začetku imunsko posredovanih patoloških stanj, kot so avtoimunske bolezni in kronična vnetja. TNF- α aktivira številne signalne poti in je tudi aktivator AP-1 (56). Resveratrol močno zavira s TNF- α -inducirano aktivacijo AP-1 v monocitni celični liniji U-937 že pri nanomolarnih koncentracijah (57).

1.4.3 Učinki na signalno pot NF- κ B

Proteini družine jedrskega faktorja κ B spadajo v skupino sorodnih transkripcijskih faktorjev, ki jo sestavlja pet članov, vključno Rel (ali c-Rel), RelA (ali p65), RelB, NF- κ B1 (ali p50) in NF- κ B2. Vsi proteini vsebujejo homologno domeno Rel, ki služi njihovi dimerizaciji, vezavi na DNA in predstavlja glavno regulativno domeno (58).

Aktivacija večine NF- κ B proteinov, zlasti najpogostejšega dimera RelA-p50, je odvisna od fosforilacije in posledične ubikvitinacije I κ B proteinov, ki zadržujejo neaktivno NF- κ B v citoplazmi. Če celice tretiramo z različnimi vnetnimi citokini, kot sta TNF- α in interleukin 1 β (ang. interleukin 1 β ; IL-1 β), ali z mikrobiološkimi signali, kot sta bakterijski LPS ali virusna RNA, to vodi do aktivacije I κ B-kinaze (ang. inhibitor of kappa B kinase; IKK). IKK je kompleks, ki fosforilira I κ B in ga s tem označi za nadaljnjo ubikvitinacijo in degradacijo, ki jo izvede proteasom. Po aktiviranju in degradaciji beljakovin I κ B, sproščene beljakovine NF- κ B potujejo iz citoplazme v jedro, kjer se vežejo in aktivirajo številne ciljne gene, ki so neposredno povezani s celično proliferacijo, preživetjem in vnetnim odzivom (slika 2) (59, 60). Če upoštevamo pravilno delovanje imunskega sistema ali imunske homeostaze se zdi, da igra aktivacija faktorja NF- κ B ključno vlogo tako pri

akutnih, kot tudi pri kroničnih vnetnih boleznih in prav odstopanja v tej funkciji, bi lahko bila glavni vzrok za nastanek avtoimunih boleznih in raka (61).



Slika 2: Aktivacija NF-κB preko klasične poti (povzeto po 62).

Za nekatere učinke resveratrola (protivnetno delovanje, modulacija celične rasti in protitumorno delovanje) se je že dolgo predvidevalo, da so povezani z modulacijo aktivacije NF-κB. Pred približno 10 leti se je izkazalo, da resveratrol modulira pot NF-κB s prekinitvijo njegove aktivacije v različnih vrstah celic, tako mieloičnega in limfatičnega izvora, kot tudi v epitelijskih celicah (57). V tej študiji so dokazali, da resveratrol blokira s TNF-α povzročeno aktivacijo NF-κB, odvisno od odmerka in časovne točke. To je bilo

opaziti v več celičnih linijah, kot so U-937, Jurkat, HeLa in H4 celične linije. Izkazalo se je, da resveratrol lahko prepreči aktivacijo NF- κ B, tudi ko uporabimo druge dražljaje (LPS, PMA, H₂O₂, okadaično kislino, ceramid) in vnetne citokine, kot je IL-1 β (63).

Glede na mehanizme zaviranja NF- κ B z resveratrolom so številne študije pokazale možnosti povezovanja resveratrola s celičnimi kinazami. Izkazalo se je, da resveratrol blokira z LPS povzročeni nastanek NO in izražanje citosolnih iNOS beljakovin v makrofagih RAW 264.7. Resveratrol blokira fosforilacijo in degradacijo I κ B α in tako vpliva na jedrno translokacijo in vezavo podenote NF- κ B na DNA (64, 65). V drugi študiji, opravljeni na monocitni celični liniji THP-1, so dokazali, da resveratrol zavira izražanje tkivnega faktorja po izpostavitvi LPS in zniža fosforilacijo in transaktivacije podenote p65 NF- κ B (66).

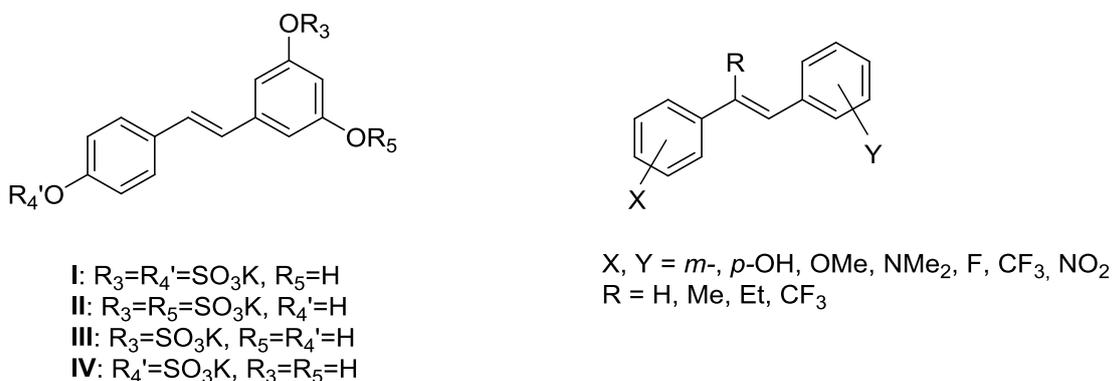
V eni izmed študij so raziskovali zaviralni učinek resveratrola na z LPS inducirano proizvodnjo citokina interleukina 8 (ang. interleukin 8; IL-8) v THP-1 celični liniji. Preverjali so njegovo inhibicijo z mitogenom aktivirane proteinske kinase (ang. mitogen-activated protein kinase; MAPK) kot tudi degradacijo I κ B α in nadaljnji razkroj signalne poti NF- κ B. Ugotovili so, da z LPS inducirane THP-1 celice sprožijo izločanje IL-8 preko fosforilacije ERK 1/2 in p38 MAPK (slika 3). Dokazali so, da je predhodno tretiranje z resveratrolom povzročilo inhibicijo fosforilacije ERK 1/2 in p38 MAPK v THP-1 celični liniji inducirani z LPS, kar je vodilo do inhibicije degradacije I κ B α in aktivacije NF- κ B ter s tem inhibicije izražanja IL-8 (67).



Slika 3: Aktivacija MAPK poti (povzeto po 68).

1.5 ANALOGI RESVERATROLA

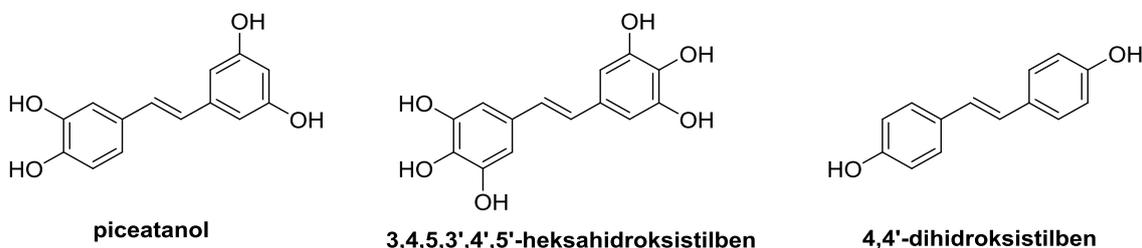
Resveratrol naj bi bil učinkovit pri preprečevanju in zdravljenju različnih kroničnih bolezni, zato se večja število raziskav, ki preučujejo razmerje med strukturo in aktivnostjo za resveratrol in njegove analoge. Med drugim so proučevali več halogeniranih analogov resveratrola (69) in različno substituiranih derivatov resveratrola (slika 4) kot potencialnih antioksidantov (70). Prav tako so raziskovali glikozilirane derivate resveratrola (71) in sposobnost naravnih fenolnih spojin iz *Vitis vinifera* (vinska trta) in na celičnih kulturah ugotovili, da delujejo kot lovilci radikalov (72). Med drugim so sintetizirali in preučevali tudi sulfatne analoge resveratrola, kjer sta se dva derivata, 3'-sulfat (**III**) in 4'-sulfat (**IV**), izkazala za učinkovita pri zaviranju nastanka NO v Raw 264.7 celicah (slika 4) (73).



Slika 4: Prikaz struktur sulfatnih analogov resveratrola (povzeto po 73) in različno substituiranih analogov resveratrola (povzeto po 70).

V eni izmed študij so primerjali stopnjo inhibicije COX in ugotovili, da hidroksilirani analogi resveratrola izkazujejo visoko stopnjo inhibicije COX, medtem ko metoksilirani analogi te učinkovitosti nimajo. Najmočnejše zaviralne učinke imata tako piceatanol (3,5,3',4'-tetrahidroksi-*trans*-stilben) in heksahidroksistilben (slika 5), ker izkazujeta zaviralne učinke COX encimov pri zelo nizkih koncentracijah in sta zelo selektivna zaviralca COX-2 (74, 75). V drugi študiji so dokazali, da so hidroksilne skupine v stilbenih odgovorne za znižanje aktivacije faktorja NF- κ B, ki je inducirana z različnimi vnetnimi posredniki (76). Med vsemi hidroksilnimi skupinami pa naj bi se OH skupina na položaju 4' veliko lažje oksidirala kot druge hidroksilne skupine in tako odločilno prispevala k antioksidativnem delovanju in zaviranju celične rasti (77). Zaradi teh ugotovitev so nato

sintetizirali 4,4'-dihidroksi-*trans*-stilben (DHS) (slika 5) in ugotovili, da ima ta analog resveratrola močno antiproliferativno delovanje, ki je drugačno od samega resveratrola (78). Poleg tega ima ta derivat tudi močno antioksidativno in antiestrogeno delovanje (79, 80).



Slika 5: Struktura 3,5,3',4'-tetrahidroksi-*trans*-stilbena (piceatanola), 3,4,5,3',4',5'-heksahidroksi-*trans*-stilbena in 4,4'-dihidroksi-*trans*-stilbena (DHS).

Prav tako so preučevali imino analoge resveratrola in ugotovili kar nekaj prednosti v primeru uvedbe imino skupine, ki se bolje prilega estrogenskemu receptorju α . Imino skupina naj bi tako okrepila antiestrogeno delovanje v rakavih celičnih linijah dojke (81). Mnogo je potencialnih analogov, ki bi lahko še izboljšali pozitivno delovanje resveratrola in prispevali k našemu zdravju.

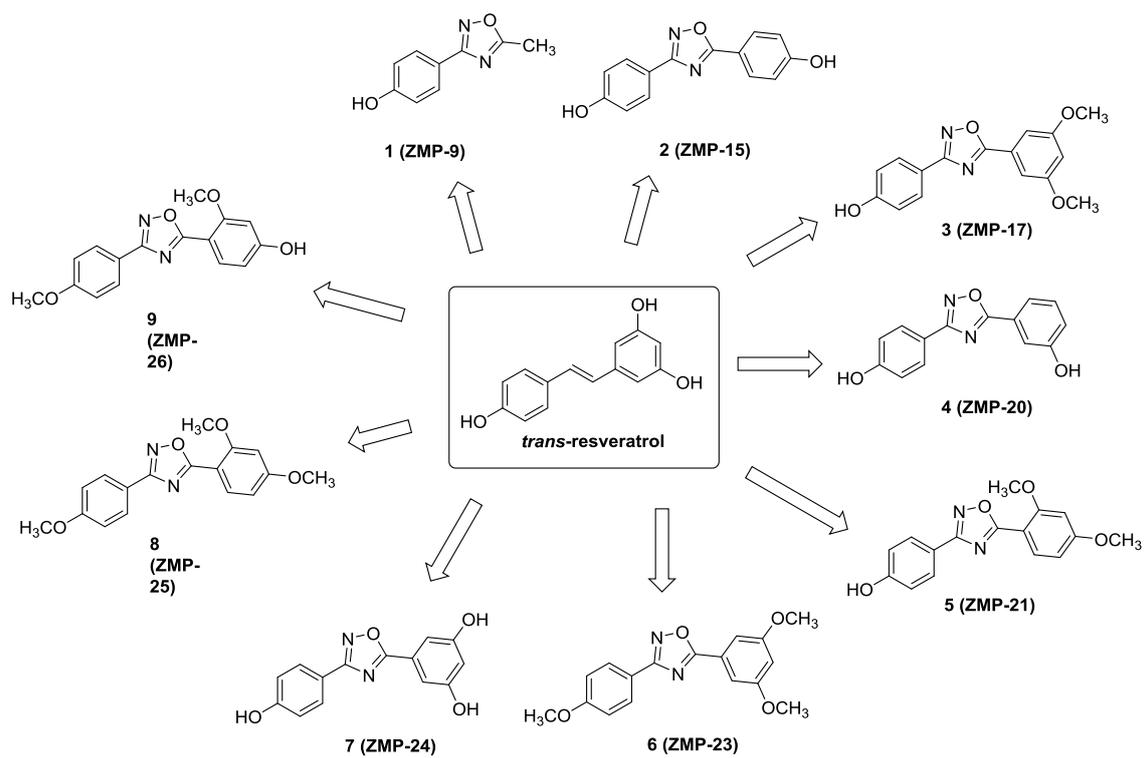
V raziskavi smo se osredotočili na 1,2,4-oksadiazolne derivate resveratrola, ki so jih v okviru druge diplomske naloge sintetizirali na Katedri za farmacevtsko kemijo. Sintetizirali so majhno knjižnico 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola, ki smo jih vključili v raziskavo in skušali odkriti kateri izmed analogov najboljše posnema delovanje resveratrola.

2 NAMEN DELA

Že dolgo je znano, da ima resveratrol protivnetne in antioksidativne učinke na celice, a je njegova slabost da pri izomerizaciji iz *trans* v *cis* obliko delno izgubi svojo aktivnost. Na Katedri za farmacevtsko kemijo so sintetizirali (v okviru druge diplomske naloge) devet različnih 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola (prikazani na sliki 6). V sklopu te naloge nas zanima ali imajo tudi ti novi sintezni analogi resveratrola podobne ali mogoče celo boljše učinke. Namen našega dela je torej ovrednotiti protivnetno in antioksidativno delovanje teh spojin.

Pri delu želimo uporabljati za celice netoksične koncentracije, zato bomo morebitno citotoksičnost spojin za celično linijo THP-1 določili s testom metabolne aktivnosti. Delo bomo nato nadaljevali s prvo določeno netoksično koncentracijo spojin in nadalje najprej preverili potencialno antioksidativno delovanje omenjenih analogov. Celično linijo THP-1 bomo aktivirali s *tert*-butil hidroperoksidom (ang. *tert*-butyl hydroperoxide; TBH) in nato ugotavljali, če spojine res zmanjšajo procent induciranih reaktivnih kisikovih zvrsti. V drugem delu se bomo osredotočili na protivnetno delovanje. S Quanti-Blue™ testom bomo ovrednotili sposobnost analogov, da inhibirajo signalno pot NF- κ B, ki je vpletena v regulacijo številnih vnetnih citokinov. Spojino, ki bo kazala najbolj obetavne učinke, bomo še nadalje vrednotili. In sicer bomo poizkušali osvetliti molekulske mehanizme signalizacije ter določiti vpliv na izločanje izbranih citokinov. To bomo naredili z metodo prenosa po Westernu in s pomočjo citokinskega kompleta.

Predpostavili smo, da bodo zaradi podobne kemijske strukture 1,2,4-oksadiazolni analogi, tako kot resveratrol, delovali protivnetno in antioksidativno. Zato pričakujemo podobne ali boljše rezultate, ki jih je že izkazal resveratrol. Prav tako sklepamo, da so derivati tudi boljše topni kot resveratrol, saj so bolj polarni kot resveratrol.



Slika 6: Knjižnica 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Kemikalija	Proizvajalec
2-merkaptetanol	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
absolutni etanol (99 %)	KEFO, Ljubljana, Slovenija
akrilamid in N,N'-metilen bisakrilamid	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
antibiotik (streptomycin, penicilin) in antimikotik (amfotericin B), raztopina	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
APS	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
BFM (bromfenol modro)	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
C12-iE-DAP	InVivo Gen, San Diego, CA, ZDA
DMSO (dimetilsulfoksid)	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija
etanol 70 %	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija
goveji serumski albumin (BSA)	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
izopropranolol	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
LPS	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
medij RPMI 1640	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
raztopina tripanskega modrila (ang. Trypan Blue solution)	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
Quanti-Blue™	InVivo Gen, San Diego, CA, ZDA
natrijev dodecil sulfat	Promega, Madison, WI, ZDA
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, CA, ZDA

SuperSignal® West Femto	Thermo Fisher Scientific, IL, ZDA
<i>tert</i> -butil hidroperoksid	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
TEMED	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA
Tween 20	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA

3.1.2 Reagenti

Reagent	Proizvajalec
Cell Titer 96® AQueous One Solution Reagent (reagent za test celične metabolne aktivnosti)	Promega, Madison, WI, ZDA

3.1.3 Kompleti

Komplet	Proizvajalec
Human Inflammatory Cytokine Kit	BD Biosciences, SJ, CA, ZDA

3.1.4 Protitelesa

Protitelo	Proizvajalec
Primarna kunčja monoklonska protitelesa proti I κ B α	Cell Signaling, Danvers, MA, ZDA
Primarna kunčja monoklonska protitelesa proti p-I κ B α	Cell Signaling, Danvers, MA, ZDA
Primarna kunčja monoklonska protitelesa proti ERK 1/2	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, ZDA
Primarna kunčja monoklonska protitelesa proti p-ERK 1/2	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, ZDA
Primarna kunčja monoklonska protitelesa proti β -aktinu	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
Sekundarna kozja anti- kunčja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo	Milipore, MA, ZDA
Sekundarna kozja anti-mišja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo	Milipore, MA, ZDA

3.1.5 Pufri in raztopine

- 10 % amonijev persulfat v dH₂O (APS)
- 1 M fosfatni puffer (pH 6,0): 2,14 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 12,0 g KHPO₄, 0,37 g EDTA, 5,84 g NaCl in dH₂O do 1000mL
- kaspazni lizatni pufer: 0,1 % Triton X-100, fosfatni pufer (100 mM, pH 6,0), EDTA (1,3 mM) in NaCl (100 mM)
- kaspazni reakcijski pufer : PIPES pH 7,2 (20 mM), 10 % saharoza, 0,1 % CHAPS, EDTA (1 mM), NaCl (100mM) in dH₂O
- 10x PBS (pH 7,4): 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄ in dH₂O do 1000 mL

- pufer za barvanje (celični cikel): Tris (100 mM, pH 7,4), NaCl (150 mM), CaCl₂ (1 mM), MgCl₂ (0,5 mM), 0,1 % Nonidet P40
- RIPA pufer: 1 % Nonidet P40, 0,5 % Na-deoksiholat, 0,1 % SDS, 0,004 % NaN₃
- lizatni RIPA pufer: 1600 µL RIPA, 1,6 µL aprotinin, 8 µL PMSF, 16 µL Halt-fosfataza
- 3x SLB (ang. sample loading buffer): 30 % glicerol, 0,3 % BFM, 9 % SDS, Tris/HCl (195 mM, pH 6,8) in dH₂O
- nanašalni pufer: 13,33 µL 3x SLB, 1,6 µL BFM, 2,4 µL 2-merkaptetanol (za 1 vzorec)
- ločevalni pufer (ang. separating buffer): Tris (1,5 M, pH 8,8), 0,4 g SDS in dH₂O
- koncentracijski pufer (ang. stacking buffer): Tris (0,5 M, pH 6,8), 0,4 g SDS in dH₂O
- 5x elektroforezni pufer Tris-glicin: Tris (25 mM), glicin (250 mM), 0,1 % SDS in dH₂O
- 10 % SDS (pH 7,2): 10 g SDS in 90 mL dH₂O
- 10x TBS (pH 7,4): Tris (250 mM), NaCl (1370 mM), KCl (30 mM) in dH₂O do 1000 mL
- TTBS: 0,02 % Tween 20 v 1x TBS
- 5 % raztopina mleka: 5 g mleka v prahu in 50 mL TTBS
- pufer za odstranjevanje vezanih protiteles (ang. stripping buffer): 2 % SDS, Tris (62,5 mM, pH 6,8), 2-merkaptetanol (100mM)

3.1.6 Geli za SDS-PAGE

8 % ločevalni gel:

30 % akrilamid	2,7 mL
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 mL
H ₂ O	4,6 mL
10 % SDS	100 µL
10 % APS	100 µL
TEMED	6 µL

3.1.7 Gojišča

Gojišče	Sestava
za celice Ramos Blue	IMDM 2-4 mM L-glutamin 10% (v/v) fetalni goveji serum 50 U/mL penicilin 50 µg/mL streptomycin 100 µg/mL Normocin™ (protimikrobno sredstvo)
za THP-1 celice	500 mL RPMI-1640 50 mL FBS 5,5 mL 200 mM L-glutamin 5,5 mL antibiotik/antimikotik 100x 0,5 mL 50 mM 2-merkaptetanol

3.1.8 Laboratorijska oprema

avtoklav	A-21, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
avtomatski števec za štetje celic (Countess™)	Invitrogen, Carlsbad, ZDA
centrifuge	Tehtnica CENTRIC 322A, Železniki, SLO Tehtnica CENTRIC 150, Železniki, SLO Eppendorf centrifuge 5415 R, Hamburg, Nemčija
centrifugirke (15 in 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
G-box in programska oprema SynGene	SynGene, Cambridge, VB in SynGene, Frederick, MD, ZDA
hemocitometer	Brand Neubauer (BNlau Brand)
hladilnik/zamrzovalnik	Gorenje, Velenje, Slovenija
inkubator	Heraus Holding GmbH, Hanau Nemčija
invertni svetlobni mikroskop (Olympus CK40)	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Nemčija
kadička za vertikalno elektroforezo	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA
komora z laminarnim pretokom zraka (LAF)	Waldner Electronics FAZ 3, Wangen, Nemčija
krioviale	TPP, Trasadingen, Švica
krovna stekla	Assistent, Sondheim, Nemčija

mikrocentrifugirke (0,5, 1,5 in 2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
mikrotitrne ploščice za gojenje celičnih kultur (z 12, 24 ali 96 vdolbinami)	TPP, Trasadingen Švica
mikrotitrski čitalec (Safire2™ Genios)	Tecan, Genios, Zürich, Švica
naprava iBlot® za prenos po Westernu in komplet za prenos po Westernu	Invitrogen, CA, ZDA
nastavki za pipete (do 10, 200, 300 ali 1000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
pipete (100 – 1000 µl, 20 – 200 µL, 2 – 20 µL, 0,5 – 10 µL, 0,1 – 2,5 µL)	Eppendorf Research Plus, Nemčija
precizna tehtnica	Europe60 Gibertini
pretočni citometer FACScalibur	BD Biosciences, SJ, CA, ZDA
programska oprema za Tecan	Magellan V3.X IVD
serološke pipete za enkratno uporabo (5, 10 in 50 mL)	TPP, Trasadingen, Švica
spektrofotometer Nanodrop	Thermo Scientific, DE, ZDA
spektrofotometer BioTek	BioTek Instruments, Germany
stresalnik	Vibromix, 314 EVT Tehnica
termični stresalnik Apollo HP50	CLP Tools, San Diego, ZDA
ultrasonični homogenizator 4710	Call-Rarner Instrument Co., IL, ZDA

vibracijski mešalnik	Vortex GENIE 2, Scientific Industries, Orlando, Florida, ZDA Combi-Spin, Biosan, ZDA
vir napetosti za elektroforezno kadičko	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA
vsebniki (T-flask) za gojenje celičnih kultur (s 25, 75 in 150 cm ² rastne površine)	TPP, Trasadingen, Švica
vodna kopel	Memmert, Schwabach, Nemčija
zamrzovalnik -80°C	Forma Scientific, ON, Kanada

3.1.9 Celične kulture

Humane celične linije izvirajo iz malignega človeškega tkiva. So nesmrtni, kar pomeni, da so pridobile sposobnost neskončne delitve. To je tudi njihova glavna prednost v primerjavi s primarnimi celičnimi kulturami, katerih število delitev in s tem življenjska doba sta omejeni. Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali celične linije Ramos Blue ter THP-1 celične linije.

Ramos Blue celična linija

Celice Ramos Blue so celične linije limfocitov B, ki stabilno izražajo NF- κ B/AP-1 reporterski gen izločene alkalne fosfataze (ang. secreted alkaline phosphatase; SEAP). Izhajajo iz človeškega Burkittovega limfoma, ki ne vsebuje virusa Epstein-Barr. Imajo lastnosti B limfocitov in se redno uporabljajo kot model limfocitov B in za študije apoptoze. Raven SEAP je mogoče spremljati z uporabo medija Quanti-Blue™, ki spremeni barvo v prisotnosti SEAP.

THP-1 celična linija

THP-1 je monocitna humana celična linija pridobljena iz periferne krvi enoletnih bolnikov z akutno monocitno levkemijo. Celice so velike, okrogle in enocelične. Povprečni podvojevalni čas je od 35 do 50 ur.

3.2 METODE DELA S CELICAMI

Pri delu s celicami moramo vedno zagotavljati sterilne pogoje. V ta namen delo opravljamo v komori z laminarnim pretokom zraka (komora LAF), ki je nameščena v prostorih, kjer velja poseben režim čistoče (uporaba zaščitne halje, obutve in rokavic iz lateksa). LAF komora zagotavlja sterilne pogoje z omejenim dostopom ter stalnim pretokom preko HEPA filtrov filtriranega zraka na delovno površino (zrak onemogoča dostop kontaminantom in prahu). Komoro pred uporabo razkužimo s polurnim obsevanjem z ultravijolično svetlobo, tik pred pričetkom dela pa površine komore očistimo s 70 % etanolom. Pred vnosom v komoro s 70 % etanolom razkužimo tudi ves material in pripomočke, ter zaščitne rokavice (slednje večkrat razkužimo tudi med samim delom).

3.2.1 Gojenje celic

Celične linije Ramos Blue in THP-1 smo gojili in redčili v vsebnikih za gojenje celičnih kultur ali ploščicah za celične kulture v inkubatorju, ki zagotavlja ustrezne pogoje za rast celic (temperatura 37 °C, 100 % vlažnost ter atmosfera s 5 % CO₂).

3.2.2 Subkultiviranje celičnih linij

Za doseganje ustreznega števila in optimalne rasti celic smo jih morali subkultivirati vsake dva do tri dni, tako da smo jih redčili z ustreznim medijem, segretim na 37 °C.

3.2.3 Odmrzovanje celic

Celične kulture shranjujemo v kriovialah pri -80 °C v zamrzovalniku ali pri -180 °C v Dewarjevi posodi s tekočim dušikom. Celice so shranjene v 10 % DMSO, ki je citotoksičen, zato se mora postopek odmrzovanja izvesti na hitro. Kriovialo s celicami smo

takoj prenesli iz zamrzovalnika oz. tekočega dušika v vodno kopel, segreto na 37 °C in jo rahlo stresali, da smo pospešili odmrzovanje. Odmrznjeno vsebino smo prenesli v 15 mL centrifugirko, v katero smo predhodno odpipetirali 10 mL medija RPMI 1640 oziroma IMDM, segretega na 37 °C. Suspenzijo smo centrifugirali 5 min pri 1200 obr./min. Nastali supernatant smo odpipetirali in celice resuspendirali v ustreznem volumnu medija RPMI 1640 oziroma IMDM, segretega na 37 °C. Celično suspenzijo smo prenesli v vsebnik za gojenje celičnih kultur in jo inkubirali v CO₂ inkubatorju.

3.3 ŠTETJE CELIC

Ročno štetje celic

Celice smo šteli s pomočjo hemocitometra pod invertnim mikroskopom. Pri tej metodi preštujemo celice v znanem volumnu in s pomočjo tega podatka izračunamo koncentracijo celic v suspenziji (št. celic/mL). Pod sterilnimi pogoji smo celično suspenzijo najprej resuspendirali, nato pa odpipetirali 10 µL celične suspenzije in jo prenesli v mikrocentrifugirko. Dodali smo 10 µL tripanškega modrila, ki obarva poškodovane in mrtve celice modro ter dobro premešali s pipeto. 10 µL pripravljene mešanice smo nanegli na hemocitometer. Nato smo pod mikroskopom prešteli število živih celic v štirih velikih kvadratih ter izračunali koncentracijo po spodnji enačbi:

$$\text{Št. celic/mL} = \frac{A+B+C+D}{4} \times f \times 10^4$$

A, B, C, D – št. živih celic v posameznem polju hemocitometra

f – faktor redčenja zaradi redčitve z gojiščem in mešanja s tripan modrim

10⁴ – volumen celične suspenzije nad kvadratom (1/mL)

Enačba 1: Računanje koncentracije celic s hemocitometrom.

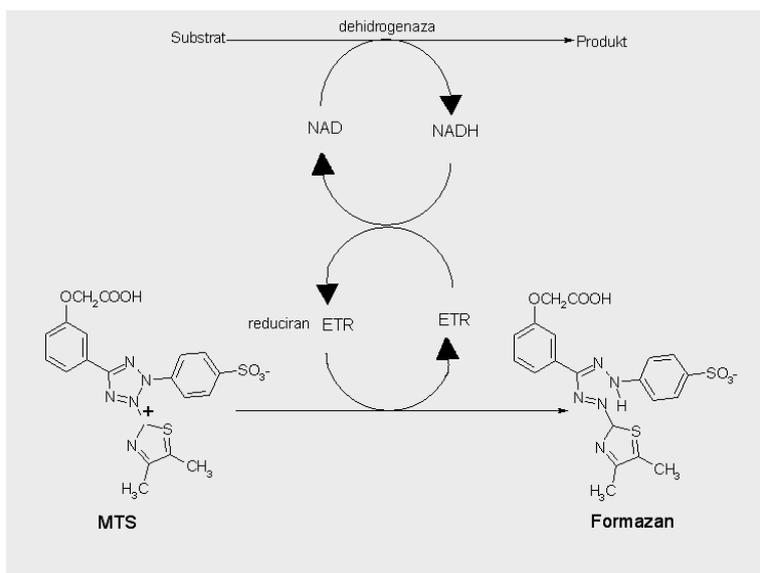
Avtomatsko štetje celic

Za avtomatsko štetje celic smo uporabili avtomatski števec CountessTM. Mešanico smo pripravili na enak način kot pri ročnem štetju celic, nato pa smo 10 µL nanegli na ploščico, ki je sestavljena iz dveh merilnih celic. Ploščico smo vstavili v instrument in v 30

sekundah smo dobili naslednje rezultate: celokupno število celic, število živih celic in število mrtvih celic.

3.4 TEST ZA DOLOČANJE CELIČNE METABOLNE AKTIVNOSTI Z REAGENTOM MTS

Test MTS je kolorimetrična metoda za določanje števila preživelih celic v testu proliferacije, citotoksičnosti ali kemosenzitivnosti. Reagent je sestavljen iz MTS-reagenta [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium], v obliki soli in fenazin etosulfata (ang. phenazine ethosulfate; PES), ki je reagent za prenos elektronov. PES ima okrepljeno kemijsko stabilnost, ki mu omogoča, da z MTS-reagentom tvori stabilno raztopino. Ta tetrazolijeva sol prehaja v celice, kjer se pod vplivom reducirajočih reagentov v mitohondrijih reducira do vijoličnega formazana (slika 7). Količina nastalega formazana je sorazmerna številu živih metabolno aktivnih celic in jo lahko merimo spektrofotometrično pri 490 nm (82).



Slika 7: Shematski prikaz celičnega metabolizma reagenta MTS. Redukcija MTS v formazan v metabolno aktivnih celicah je posledica delovanja dehidrogenaz, ki tvorijo reducirajoče reagente, npr. NADH ali NADPH. NADH prenese svoj elektron na reagent za prenos elektronov (angl. electron transfer reagent; ETR), kot npr. PES v našem primeru in ga tako reducira. Ta reduciran reagent za prenos elektronov lahko direktno reagira z MTS, ga reducira in nastane močno obarvan formazan (povzeto po 82).

Postopek:

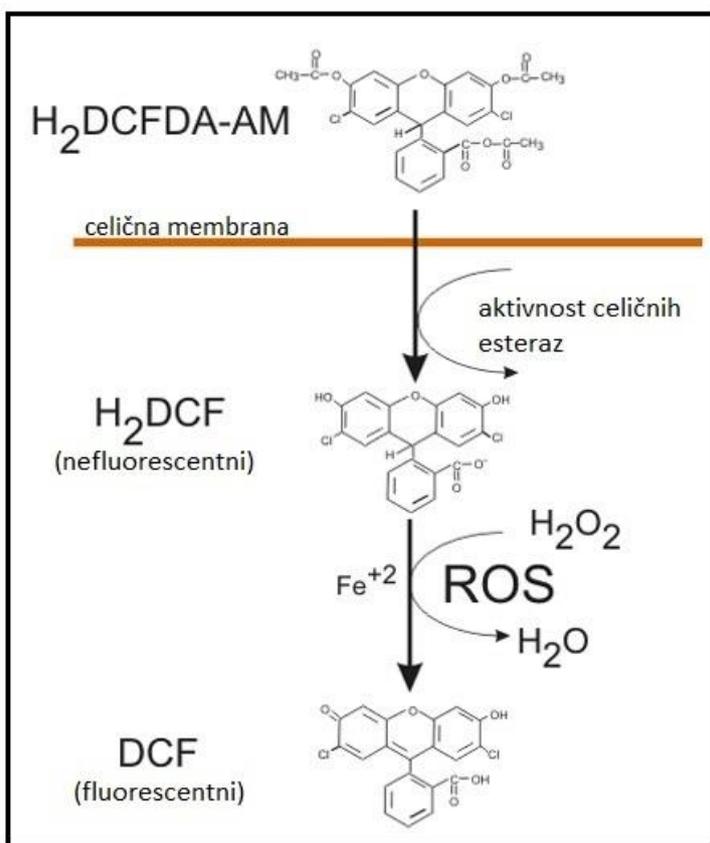
Najprej smo si pripravili suspenzijo izbrane celične kulture v koncentraciji $3,3 \times 10^5$ celic/mL v mediju RPMI 1640. Suspenzijo celic smo alikvotirali po 1000 μ L na ustrezno mikrotitrsko ploščico. THP-1 celične linije smo nato tretirali z analogi v koncentraciji 25 μ M (razen spojino **6** z 10 μ M) in z resveratrolom različnih koncentracij. Kot kontrolo smo uporabili netretirano celično kulturo oz. celično kulturo, ki smo ji dodali le DMSO. Po tretiranju smo celice v triplikatu po 100 μ L prenesli na mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami. Inkubacija je potekala v inkubatorju za gojenje celic (37 °C, 5 % CO₂). Po 24 urah smo v vsako vdolbinico dodali 10 μ L reagenta MTS in inkubirali še 2-3 ure v inkubatorju. Po končani inkubaciji smo z mikrotitrskim čitalcem Tecan Safire² izmerili absorbanco nastalega formazana pri 492 nm. Večja kot je bila izmerjena absorbanca, večja je bila metabolna aktivnost celic. Istočasno smo test izvedli tudi z medijem RPMI 1640 (brez celic) in 10 μ L MTS, s čimer smo določili absorbanco ozadja (slepa kontrola) in jo odšteli od absorbance vzorcev.

$$\% \text{ metabolne aktivnosti} = \frac{c(\text{vzorca}) - c(\text{slepe})}{c(\text{kontrola}) - c(\text{slepe})} \times 100$$

Enačba 2: Računanje odstotka metabolne aktivnosti celic.

3.5 MERJENJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA

Radikali lahko povzročijo poškodbe celic in njihovih sestavin, kar lahko vodi v nastanek in razvoj kroničnih degenerativnih bolezni. TBH (*tert*-butil hidroperoksid) je organski peroksid, ki se pogosto uporablja v različnih oksidacijskih procesih. Uporablja se kot iniciator za radikalno polimerizacijo. Ko ga dodamo celicam, sprožimo radikalno polimerizacijo in po dodatku antioksidativnih spojin, se nivo reaktivnih oksidativnih spojin zmanjša. Celicam dodamo barvilo H₂DCFDA (2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat). To barvilo je kemično reducirana oblika fluoresceina in je indikator reaktivnih kisikovih zvrsti (ang. reactive oxygen species; ROS) v celicah. Po cepitvi acetatnih skupin z znotrajceličnimi esterazami in po oksidaciji, se nefluorescentni H₂DCFDA pretvori v visoko fluorescenten 2',7'-diklorofluorescein (DCF), ki ga nato merimo s pretočnim citometrom (slika 8).



Slika 8: Shematski prikaz celičnega delovanja barvila H_2DCFDA (povzeto po 83).

Postopek:

Najprej smo si pripravili suspenzijo THP-1 celične kulture v koncentraciji 8×10^5 celic/mL v mediju RPMI 1640. Suspenzijo celic smo alikvotirali po 1000 μ L na ustrezno mikrotitrsko ploščico. THP-1 celice smo nato tretirali z analogi v koncentraciji 25 μ M (razen spojino **6** z 10 μ M) in z resveratrolom enake koncentracije. Kot kontrolo smo uporabili netretirano celično kulturo. Nato je sledila enurna inkubacija (37 °C, 5 % CO_2). Potem smo vsak alikvot prenesli v vsebnik in centrifugirali 5 min pri 1500 obr./min. Odpipetirali smo supernatant in dodali po 1 mL sterilne raztopine fosfatnega pufra (ang. phosphate buffered saline; PBS) in 1 μ L 10 μ M barvila H_2DCFDA . Za slepo kontrolo smo vzeli celice brez dodanega barvila. Vse vzorce smo tretirali 15 min pri 37° C in 5 % CO_2 . Potem smo centrifugirali 5 min pri 1500 obr./min in odpipetirali supernatant. Dodali smo 500 μ L svežega medija RPMI 1640 ter nato dodali še spojine ali resveratrol s koncentracijo 25 μ M (razen spojine **6** z 10 μ M) in 100 μ M TBH. Vse skupaj smo tretirali še eno uro pri 37 °C in 5 % CO_2 ter nato pomerili na pretočnem citometru.

3.6 QUANTI-BLUE™ TEST ZA UGOTAVLJANJE AKTIVNOSTI ALKALNE FOSFATAZE

Quanti-Blue™ je kolorimetrično encimski test za določanje aktivnosti alkalne fosfataze (ang. alkaline phosphatase; AP) v biološkem vzorcu. Test omogoča enostavno in hitro detekcijo in količinsko zaznavo izločene alkalne fosfataze (SEAP). Test delamo v celicah Ramos Blue, katerim je dodan plazmid, sestavljen iz promoterja in reporterskega gena. Promotor je faktor vnetja NF- κ B, reporterski gen pa je alkalna fosfataza. Celicam dodamo C12-iE-DAP, ki je agonist receptorja NOD1 in hkrati aktivator transkripcije faktorja NF- κ B. Aktivacija signalne poti NF- κ B (npr. s C12-iE-DAP) povzroči povečan prepis reporterskega gena in se tem povečan nastanek SEAP, ki se izloča v celični medij, kjer ga določamo.

Alkalna fosfataza je izraz, ki označuje skupino encimov, ki v alkalnem pH katalizirajo hidrolizo organskih monofosfatnih estrov, pri čemer poteče defosforilacija, to je odzemanje fosfatne skupine z mest 3- in 5-. Poznamo več izoencimov, saj se alkalna fosfataza nahaja v več različnih celicah.

V prisotnosti alkalne fosfataze se obarvanje Quanti-Blue™ barvila spremeni iz rožnate do vijolično-modre. Intenzivnost vijolično-modre barve kaže na aktivnost alkalne fosfataze. Raven AP se lahko določi kvalitativno s prostim očesom ali količinsko z uporabo spektrofotometra, z merjenjem absorbance pri 620-655 nm.

Postopek:

Najprej smo si pripravili suspenzijo izbrane celične kulture (Ramos Blue celice) v koncentraciji 8×10^5 celic/mL v mediju IMDM. Suspenzijo celic smo alikvotirali po 1000 μ L na ustrezno mikrotitrsko ploščico. Ramos Blue celično linijo smo nato tretirali z analogi ali resveratrolom v koncentraciji 25 μ M (razen spojine **6**, ki smo jo uporabili v koncentraciji 10 μ M) za 1 h in nato dodali C12-iE-DAP v koncentraciji 5 μ M. Kot kontrolo smo uporabili netretirano celično kulturo oz. celično kulturo, ki smo ji dodali C12-iE-DAP s koncentracijo 5 μ M. Inkubacija je potekala v inkubatorju za gojenje celic (37 °C, 5 % CO₂). Po 24 h inkubaciji smo v mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami dodali 180 μ L barvila Quanti-Blue™ in 20 μ L supernatanta posameznega vzorca ter po 2 h izmerili absorbanco nastalega obarvanja pri 630 nm. Večja kot je bila izmerjena

absorbanca, večja je bila prisotnost alkalne fosfataze in s tem aktivnost faktorja NF- κ B. Istočasno smo test izvedli tudi z medijem IMDM (brez celic) in 180 μ L barvila Quanti-Blue™, s čimer smo določili absorbanco ozadja (slepa kontrola) in jo odšteli od absorbance vzorcev.

3.7 IZOLACIJA IN MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV

Za preučevanje signalnih poti smo morali najprej iz celic izolirati proteine. To smo naredili s pomočjo RIPA lizatnega pufra. Najprej smo si pripravili suspenzijo celic z želeno koncentracijo. Po 4 mL pripravljene suspenzije smo odpipetirali v vdolbinice mikrotitrne ploščice. Ena vdolbinica je predstavljala kontrolo, v ostale pa smo dodali spojino **2** ali spojino resveratrol. Po enourni predinkubaciji smo dodali še LPS (1 μ g/mL). V različnih časovnih točkah (5, 30 in 60 min) smo odvzeli vzorce in jih centrifugirali 5 min pri 2000 obr./min. Nato smo jih sprali z 1 mL PBS in centrifugirali 5 min pri 2400 obr./min, odstranili supernatant ter resuspendirali v lizatnem pufu in zamrznili na -80 °C.

Po odmrznitvi naslednji dan je sledilo soniciranje in 30-minutno stresanje na stresalniku. Ves ta čas smo vzorce hranili na ledu. Po stresanju smo vzorce centrifugirali 15 min pri 4 °C in 13200 obr./min. Supernatant s proteini smo obdržali in dali nazaj na led, usedlino pa zavrgli.

Za merjenje koncentracije proteinov smo uporabili komplet, ki temelji na DC-metodi. To je posodobljena Lowryjeva metoda za določanje proteinov. Metoda temelji na uporabi treh reagentov, s katerimi izzovemo barvno reakcijo: reagent A je bazična raztopina bakrovega (II) tartrata, reagent S je površinsko aktivna snov (surfaktant) in reagent B, ki je 1,2-naftokinon-4-sulfonat oziroma Folinov reagent. Surfaktant omogoči solubilizacijo proteinov, ki v bazičnem okolju reagirajo z raztopino bakrovega tartrata. Ta produkt v naslednji stopnji reducira Folinov reagent, čemur sledi značilno modro obarvanje z maksimumom absorbance pri 750 nm (84).

Iz vsakega vzorca smo odpipetirali po 4 μ L supernatanta v nove epice in jim dodali 8 μ L ustreznega lizatnega pufra. V duplikatih po 5 μ L smo tako pripravljene vzorce nanesti v vdolbinice na mikrotitrski plošči. Potem smo nanesti še predhodno pripravljene standarde proteinov. Standard smo pripravili iz govejega serumskega albumina (ang. bovine serum albumin; BSA), ki smo ga razredčili z ustreznim lizatnim puffrom tako, da smo dobili

koncentracije 0,2, 0,5, 0,8, 1,0 in 1,5 mg/mL. nanесли smo jih v triplikatih po 5 μ L in na koncu nanесли še sam lizatni pufer v triplikatu po 5 μ L. Ta je služil kot slepa vrednost. Absorbanco pufra smo pri računanju odšteli od absorbanco standardov in vzorcev. Po nanosu vzorcev in standardov na ploščico smo v vsako vdolbinico začeli dodajati reagente DC-metode. Najprej reagent A', ki smo ga tik pred nanosom pripravili iz reagentov A in S (na vsak mL reagenta A smo dodali 20 μ L reagent S). Dodali smo 25 μ L reagenta A' v vsako vdolbinico, nato pa še 200 μ L reagenta B (Folinovega reagenta). Ploščico smo pustili stati 15 min na sobni temperaturi, da je potekla reakcija in nato pomerili absorbanco. Iz absorbanco standardov smo, s pomočjo linearne regresije, dobili enačbo premice, iz katere smo izračunali koncentracijo proteinov v vzorcih.

3.8 PRENOS PO WESTERNU

Prenos po Westernu (ang. Western blotting ali imunoblotting) je kvalitativna in semikvalitativna metoda za določanje proteinov. Postopek poteka v več korakih. Prvi korak je ločba proteinov v vzorcih s pomočjo gelske elektroforeze. Elektroforeza je separacijska tehnika, ki omogoča ločevanje makromolekul zaradi razlik v njihovih fizikalnih lastnostih, kot sta velikost in naboj. Za ločevanje proteinov se najpogosteje uporablja poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE). Gelski matriks je sestavljen iz akrilamida in bisakrilamida, ki ob dodatku katalizatorjev polimerizirata. Matriks pripravimo iz dveh gelov. Koncentracijski gel je manj zamrežen in služi temu, da se vsi proteini iz vzorcev skoncentrirajo na bazni liniji in istočasno vstopijo v ločevalni gel, ki je bolj zamrežen in in na katerem poteka dejanska ločba proteinov po velikosti. Elektroforeza poteka v sistemu pod električno napetostjo, približno 120 min pri 100 V in 400 mA. Zaradi vezave natrijevega dodecilsulfata, ki je negativno nabit, na proteine, le-ti v električnem polju potujejo proti pozitivno nabiti anodi. Naslednji korak je prenos proteinov iz gela na sekundarni matriks. To je pogosto nitrocelulozna membrana z visoko afiniteto za vezavo proteinov. Prenos lahko poteka na različne načine, pogosto se zaradi hitrosti in enostavnosti uporablja kar elektroforezni pristop, kjer poliakrilamidni gel položimo na membrano, vse skupaj položimo med anodo in katodo ter priklopimo na napetost. Proteini potujejo iz gela na membrano. Po prenosu moramo blokirati preostala mesta na membrani, kamor se niso vezali protein. To storimo z inkubacijo membrane v raztopini BSA ali raztopini 5 % mleka v prahu. Blokiranje prostih

mest je pomembno, da preprečimo morebitno nespecifično vezavo protiteles, s katerimi v naslednjih korakih detektiramo protein. Sledi vezava protiteles z vmesnim spiranjem. Uporabljamo specifična protitelesa, ki se vežejo na točno določen protein, detekcija pa največkrat poteka posredno, preko sekundarnih protiteles. Membrano najprej inkubiramo v razredčeni raztopini primarnih protiteles, ki se vežejo na želene proteine. Nato jo večkrat speremo s TTBS in inkubiramo še v razredčeni raztopini sekundarnih protiteles, ki se vežejo na primarna. Sekundarna protitelesa so označena z encimom. Po dodatku kromogenega, fluorogenega ali kemiluminescenčnega substrata poteče reakcija, katere produkt omogoča detekcijo. Najbolj občutljivo detekcijo omogočajo kemiluminescenčni substrati, saj se med reakcijo z encimom sprošča svetloba, ki jo lahko merimo z uporabo posebne kamere (85, 86). V našem primeru je detekcija potekala v napravi G-box, obdelava rezultatov pa s priloženo programsko opremo GeneSnap.

Postopek:

Potem, ko smo sestavili aparaturo za SDS-PAGE, smo pripravili mešanici za oba gela (ločevalni in koncentracijski). Najprej smo vlili ločevalni gel in po vrhu pokapali izopropanol, da smo dobili ravno bazno linijo, ko se je gel strdil. Po približno 15 min, ko se je gel strdil, smo odlili izopropanol in gel sprali z deionizirano vodo in po vrhu vlili še koncentracijski gel, v katerega smo vstavili glavniček, da so se med strjevanjem gela naredili žepki za nanašanje vzorcev. Vzorce proteinov smo razredčili tako, da je bila masa proteinov povsod enaka (25 µg). V vsak vzorec smo dodali še 18 µL nanašalnega pufru, jih vorteksirali in centrifugirali ter denaturirali 5 min v vreli vodi. Po segrevanju smo dali vzorce takoj na led. Ko so se ohladili, smo jih začeli nanašati na gel. V prvi žepki smo nanesli 4 µL označevalca velikosti proteinov (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard), v ostale žepke pa po 25 µL vzorcev. Elektroforeza je potekala v tris-glicinskem pufru pri napetosti 100 V in toku 400 mA približno dve uri oziroma toliko časa, da je bazna linija pripotovala skoraj do konca gela. Sledil je prenos na nitrocelulozno membrano v posebni napravi iBlot®, skladno z navodili proizvajalca. Po prenosu smo membrano sprali v TTBS pufru in jo na sobni temperaturi eno uro tretirali v 5 % raztopini mleka ob rahlem stresanju. Nato smo membrano ponovno sprali s TTBS (3x 5 min) in jo dali inkubirati čez noč na 4 °C v raztopino primarnih protiteles. Raztopine primarnih protiteles smo pripravili v 3 % BSA, skladno z navodili proizvajalca. Naslednji dan smo delo nadaljevali s ponovnim

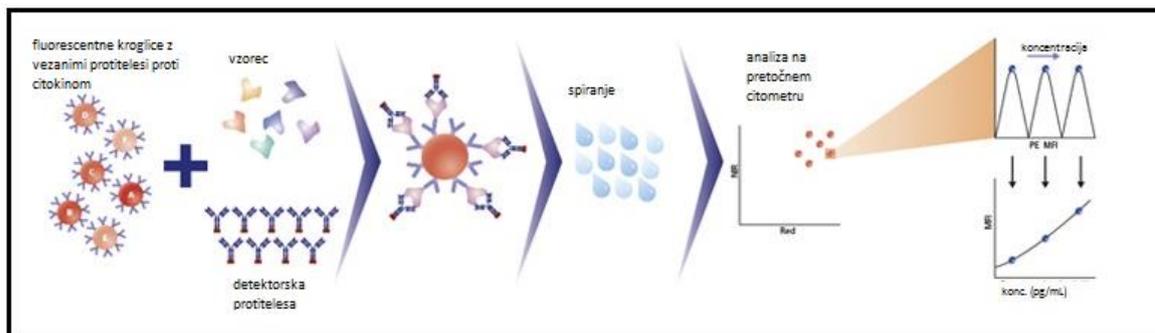
spiranjem membrane v TTBS (3x po 5 min) in enurno inkubacijo v raztopini sekundarnih protiteles na sobni temperaturi in ob rahlem stresanju. Po inkubaciji smo membrano sprali 6x po 5 min s TTBS, nato pa smo jo prenesli na parafilm s substratom (SuperSignal® West Femto chemiluminescent Substrate). Uporabljena sekundarna protitelesa so bila konjugirana z encimom hrenova peroksidaza. Po 5 min smo pomerili luminescenco, ki se je razvila pri reakciji med encimom in substratom, v G-boxu. Dobljene rezultate smo shranili, membrano sprali s TTBS in jo dali v pufer za odstranjevanje vezanih protiteles (ang. stripping buffer). V tem pufru smo jo tretirali eno uro pri 60 °C. Nato smo jo ponovno sprali v TTBS, tokrat 2x po 5 min in 1x 20 min. Tako smo membrano pripravili na ponovno označevanje z drugimi protitelesi.

3.9 MERJENJE CITOKINOV

Citokini so raznolika skupina majhnih proteinov (od 5 do 20 kDa), ki ima pomembno vlogo pri regulaciji imunskega odziva. Vsak citokin ima na celični membrani ujemajoč receptor, ki po vezavi sproži kaskado reakcij in vpliva na celične funkcije. To lahko vključuje uravnavanje več genov in njihovih transkripcijskih faktorjev, kar se kaže v spremenjeni proizvodnji drugih citokinov, povečanje števila površinskih receptorjev za druge molekule ali zaviranju lastnega učinka z načinom povratne zanke. Med njimi so pomembni interleukini in TNF- α .

Postopek:

Najprej smo si pripravili suspenzijo THP-1 celične kulture v koncentraciji 8×10^5 celic/mL v mediju RPMI 1640. Suspenzijo celic smo alikvotirali po 1000 μ L na ustrezno mikrotitrsko ploščico. THP-1 celično linijo smo nato tretirali z analogom **2** v koncentraciji 25 μ M ali z resveratrolom pri enaki koncentraciji. Kot kontrolo smo uporabili netretirano celično kulturo. Po enurni inkubaciji (37 °C, 5 % CO₂) smo dodali LPS (1 μ g/mL) v ustrezne vzorce in tretirali 20 ur. V vsebnikih smo pripravili raztopine vzorcev in reagentov, kot je navedeno v navodilih za uporabo citokinskega kompleta (Human Inflammatory Cytokine Kit) (slika 9). Vzorce smo nato pomerili na pretočnem citometru.



Slika 9: Shematski prikaz delovanja citokinskega kompleta (povzeto po 87).

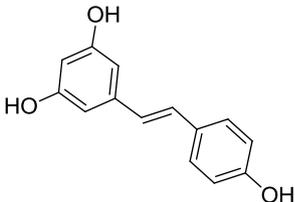
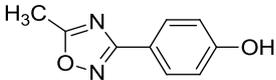
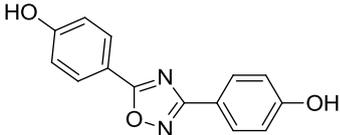
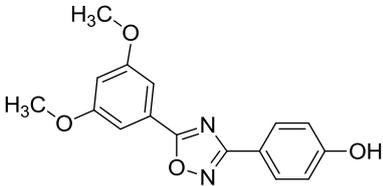
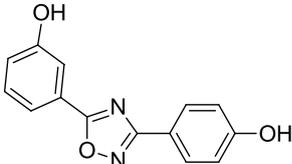
3.10 STATISTIČNA ANALIZA

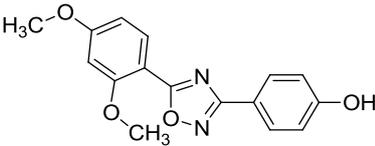
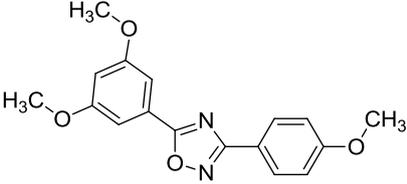
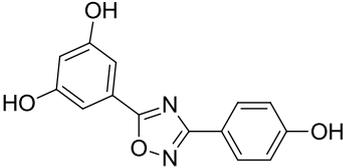
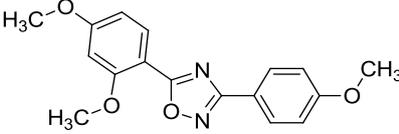
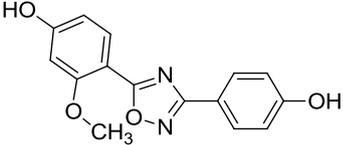
Rezultate testov smo podali kot povprečje bioloških ponovitev skupaj s standardnim odklonom. Rezultate vzorcev smo statistično primerjali z rezultati kontrol. Pri tem smo za ovrednotenje statistično signifikantne razlike uporabili Studentov t-test. Za statistično signifikantno smo vzeli vrednost $*p < 0,05$.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Resveratrol sodi med naravne polifenole in ima dokazano protivnetno in antioksidativno delovanje. Na Katedri za farmacevtsko kemijo so v okviru druge diplomske naloge sintetizirali majhno knjižnico 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola (preglednica I). Vse sintetizirane analoge smo biološko ovrednotili, pri čemer smo se osredotočili predvsem na njihovo potencialno protivnetno in antioksidativno delovanje.

Preglednica I: Prikaz 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola.

Oznaka spojine	ID spojine	Struktura
R	Resveratrol	
1	ZMP-9	
2	ZMP-15	
3	ZMP-17	
4	ZMP-20	

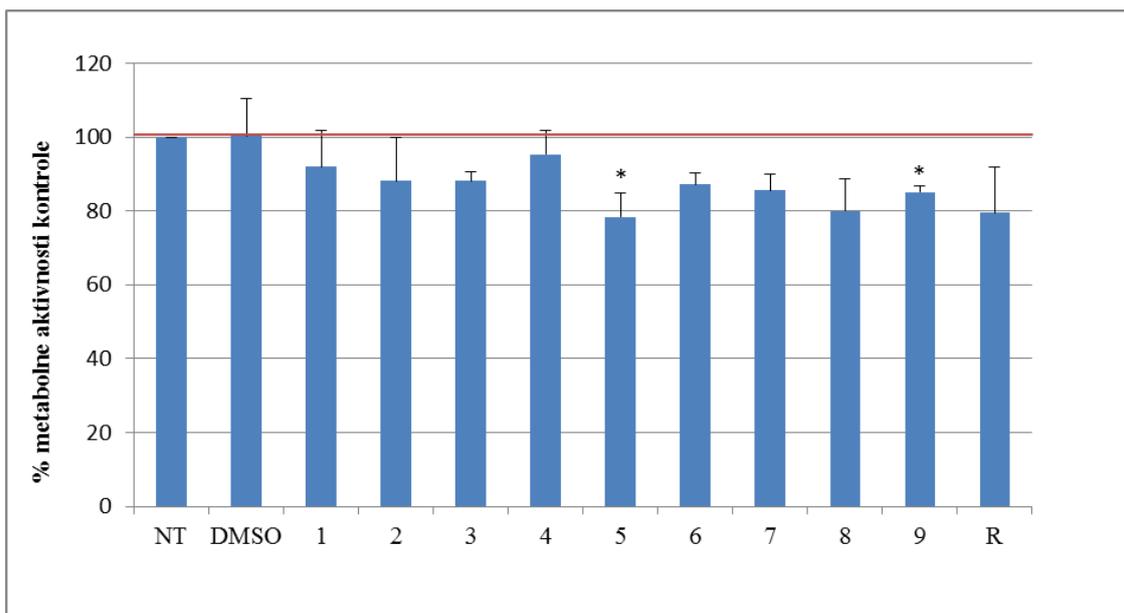
5	ZMP-21	
6	ZMP-23	
7	ZMP-24	
8	ZMP-25	
9	ZMP-26	

4.1. VREDNOTENJE CITOTOKSIČNOSTI 1,2,4-OXSADIAZOLNIH ANALOGOEV RESVERATROLA

Potencialno protivnetno in antioksidativno delovanje 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola smo želeli vrednotiti pri koncentracijah, ki niso toksične za izbrano testno celično linijo THP-1. To smo preverili s testom MTS, ki je kolorimetrična metoda za določanje vpliva ksenobiotikov na proliferacijo in živost celic.

Celice THP-1 smo tretirali s spojinami **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8** in **9** (25 μ M in 50 μ M) ter z resveratrolom (25 μ M). Po 24 h, smo izvedli test MTS, kot je opisano v protokolu. Rezultate smo podali v odstotkih metabolne aktivnosti glede na netretirane celice.

Pri 50 μ M koncentraciji spojin smo ugotovili, da se metabolna aktivnost zmanjša skoraj pri vseh spojinah za več kot 30 % (rezultati niso prikazani). Pri tej koncentraciji prav tako nismo mogli ovrednotiti vpliva spojin **3**, **5** in **6** na celično viabilnost, saj je prihajalo do obarjanja spojin in nastanka kristalov vidnih pod mikroskopom. Pri nižji koncentraciji (25 μ M), se je topnost spojine **3** in **5** izboljšala, medtem ko so kristali pri spojinah **6** izginili šele pri znižanju koncentracije na 10 μ M. Obarjanje teh spojin v celičnem mediju lahko pojasnimo z njihovo strukturo, saj so zaradi uvedenih dodatnih dveh (spojini **3** in **5**) oziroma treh metilnih skupin (spojina **6**) bolj lipofilne od ostalih analogov in s tem slabše topne v vodnih raztopinah. Kot je prikazano na sliki 10 so vse spojine pri 25 μ M koncentraciji (razen spojine **6**, ki je bila testirana pri 10 μ M) imele le minimalen vpliv na živost celic THP-1, zato smo se odločili, da nadaljnja biološka vrednotenja izvajamo pri teh koncentracijah.



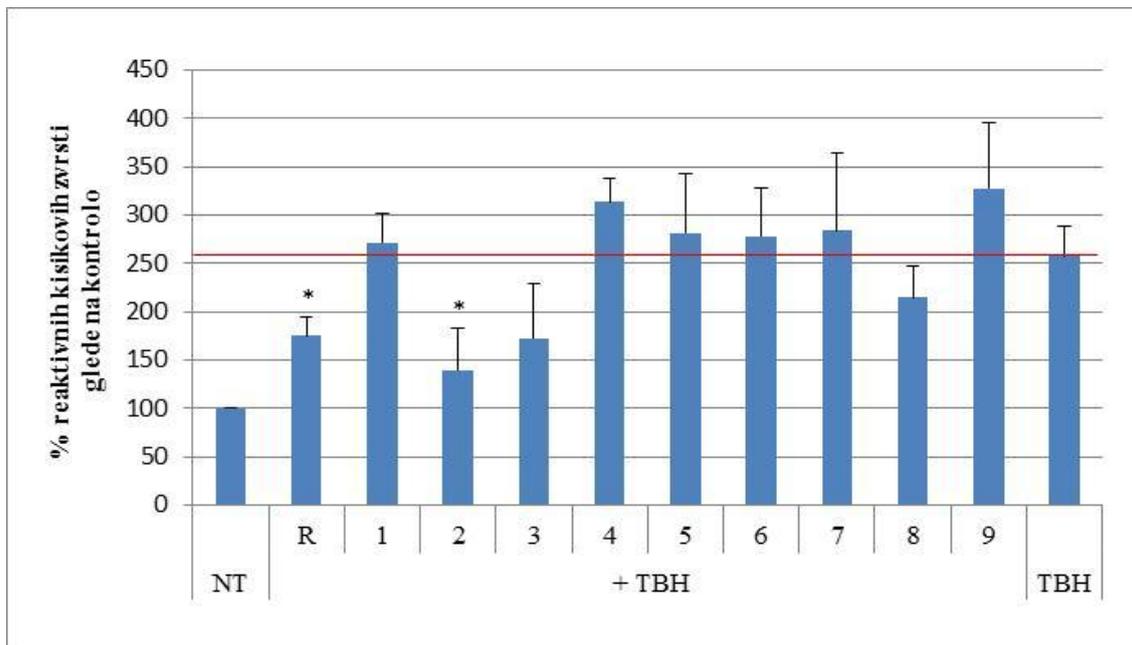
Slika 10: Metabolna aktivnost THP-1 celične linije po 24 h tretiranju z resveratrolom (R) ali 1,2,4-oksadiazolnimi analogi. Celice smo tretirali s 25 μM koncentracijami spojin, razen analoga **6**, ki smo ga uporabili v koncentraciji 10 μM . Slika prikazuje metabolno aktivnost celic, normaliziranih na metabolno aktivnost kontrolnih (netretiranih) celic. NT, netretirane celice; * $p < 0.05$ glede na NT.

4.2. PREVERJANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA

Radikali pogosto povzročijo poškodbe celic in njihovih gradnikov, kar lahko vodi v nastanek in razvoj kroničnih degenerativnih bolezni. TBH je organski peroksid, ki se pogosto uporablja v različnih oksidacijskih procesih predvsem kot iniciator radikalne polimerizacije. Celicam smo ga dodali, da smo povzročili oksidativni izbruh. V primeru, da imajo spojine antioksidativne lastnosti, so sposobne zajezi nastanek reaktivnih oksidativnih spojin. Nivo zajezitve lahko določamo z barvilom H_2DCFDA , ki je kemično reducirana oblika fluoresceina in je indikator reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) v celicah. Po cepitvi acetatnih skupin z znotrajceličnimi esterazami in po oksidaciji, se nefluorescentni H_2DCFDA pretvori v visoko fluorescenten 2',7'-diklorofluorescein (DCF), ki ga lahko izmerimo.

THP-1 celice smo 1 h pred-tretirali s spojinami ali resveratrolom v koncentraciji 25 μM (razen spojino **6** v koncentraciji 10 μM), nato smo jim dodali barvilo H_2DCFDA in po 15 min inkubaciji celice tretirali še 1 h s 100 μM TBH. Prisotnost reaktivnih kisikovih zvrsti

smo določili s pretočnim citometrom. Test smo trikrat ponovili in dobili naslednje rezultate (slika 11).



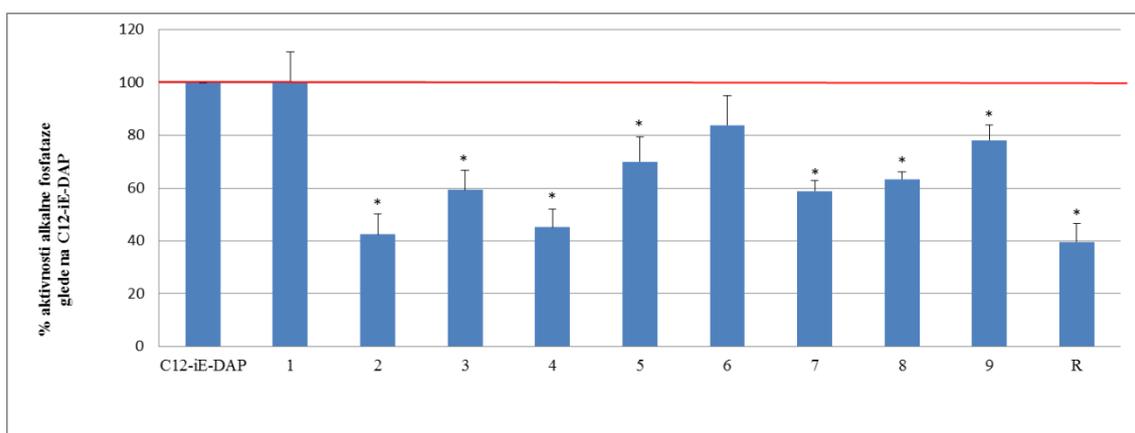
Slika 11: Določanje reaktivnih kisikovih zvrsti. Celice THP-1 smo tretirali s TBH (100 μ M) ali s TBH v prisotnosti resveratrola (R) ali njegovih analogov (25 μ M, razen spojine **6**: 10 μ M). Delež ROS smo normalizirali glede na NT. NT, netretirane celice; * $p < 0.05$ glede na TBH.

Iz grafa lahko vidimo, da TBH poveča prisotnost reaktivnih kisikovih zvrsti za približno 2,5-krat v primerjavi z netretiranimi celicami. Spojine **1**, **4**, **5**, **6**, **7** in **9** ne delujejo antioksidativno, saj je delež reaktivnih kisikovih zvrsti glede na celice tretirane s TBH podoben. Pri spojinah **3** in **8** smo sicer opazili rahel padec ROS (približno 20 %), a vrednosti niso bile statistično značilne. Spojina **2** izkazuje najboljše antioksidativno delovanje, saj se prisotnost ROS induciranih s TBH zmanjša za skoraj 50 %. Spojina **2** tako izkazuje celo boljše antioksidativno delovanje kot sam resveratrol. Za dodatno osvetlitev mehanizma antioksidativnega delovanja spojine, bi bila potrebna dodatna testiranja.

4.3 PREVERJANJE MODULACIJE POTI NF- κ B PO DODATKU C12-iE-DAP

V drugem delu diplome smo se osredotočili na vrednotenje protivnetnega delovanja 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola. Znano je, da resveratrol svoje protivnetno delovanje delno posreduje tudi preko modulacije signalne poti NF- κ B, ki je vpeta v regulacijo številnih vnetnih dejavnikov. Potencialni vpliv analogov na NF- κ B signalizacijo smo preverjali s Quanti-Blue™ testom, ki omogoča enostavno in hitro detekcijo izločene alkalne fosfataze (SEAP). Poizkus smo izvajali na celicah Ramos Blue, ki so stabilno transficirane s plazmidom sestavljenim iz promotorske regije za transkripcijski faktor NF- κ B in reporterskim genom za SEAP. Aktivacija signalne poti NF- κ B (npr. s C12-iE-DAP) povzroči povečan prepis reporterskega gena in s tem povečan nastanek SEAP, ki se izloča v celični medij, kjer ga določamo.

Ramos Blue celično linijo smo 1 h pred-tretirali z analogi in resveratrolom v koncentraciji 25 μ M (razen spojine **6**, ki smo jo uporabili v koncentraciji 10 μ M) ter nato dodali C12-iE-DAP v koncentraciji 5 μ M. Po 24 h smo odvzeli supernatant in določili aktivnost SEAP. Rezultate smo normalizirali glede na pozitivno kontrolo, tj. supernatant celic, ki so bile tretirane le s C12-iE-DAP in predstavljajo povprečje štirih bioloških ponovitev (slika 12).

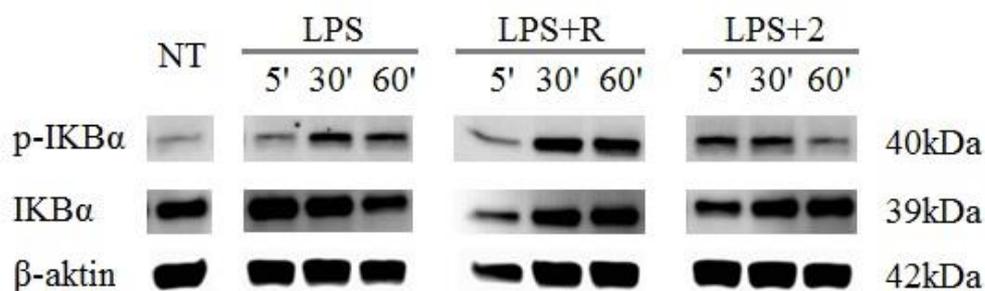


Slika 12: Vpliv analogov na NF- κ B aktivnost. Celice Ramos Blue smo pred-tretirali s spojinami in resveratrolom (R) v koncentraciji 25 μ M (razen spojine **6**: 10 μ M) in nato dodali aktivator signalne poti NF- κ B C12-iE-DAP v koncentraciji 5 μ M. Aktivnost SEAP smo določili v supernatantu in vrednosti vzorcev normalizirali na C12-iE-DAP. * $p < 0.05$ glede na C12-iE-DAP.

Kot prikazuje slika 12 lahko vidimo, da nekatere spojine zmanjšajo aktivnost alkalne fosfataze, kar pomeni, da vplivajo na obseg aktivacije signalne poti NF- κ B. Pri spojinah **2**, **4** in resveratrolu se aktivnost alkalne fosfataze zmanjša za približno 50 % v primerjavi s C12-iE-DAP, kar kaže na inhibicijo poti NF- κ B. Tudi pri drugih spojinah (**3**, **5**, **7**, **8** in **9**) smo opazili znižanje aktivnosti SEAP, ki pa ni bilo tako obsežno kot za prej omenjeni spojini. Spojini **1** in **6** nista imeli nobenega statistično značilnega učinka na modulacijo signalne poti NF- κ B. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da nekateri 1,2,4-oksadiazolni analogi resveratrola zavirajo signalno pot NF- κ B.

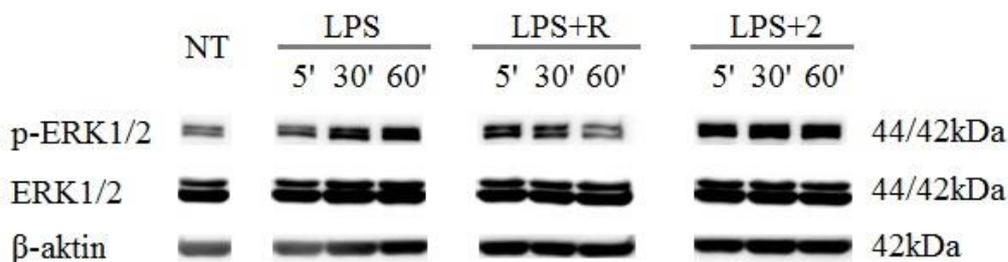
Ker je spojina **2** tako v predhodnem testu vrednotenja antioksidativnega potenciala kot tudi v tem testu izkazala najbolj primerljive vrednosti z resveratrolom, smo se odločili, da še dodatno osvetlimo molekularne mehanizme inhibicije transkripcijske aktivnosti NF- κ B. NF- κ B je proteinski kompleks, ki uravnava transkripcijo DNA. Najdemo ga v skoraj vseh vrstah živalskih celic in je vključen v celične odzive na dražljaje, kot so stres, citokini, prosti radikali, UV-sevanje, oksidirani LDL in bakterijski ali virusni antigeni. NF- κ B igra ključno vlogo pri uravnavanju imunskega odziva na okužbo (κ -verige so glavne komponente imunoglobulinov). Na kratko lahko rečemo, da je NF- κ B protein odgovoren za produkcijo citokinov in preživetje celic.

Celice smo 1 h pred-tretirali z resveratrolom ali spojino **2** pri 25 μ M koncentraciji in nato dodali LPS kot aktivator signalnih poti, ki so vpete v vnetne procese. Po 5 min, 30 min in 60 min stimulaciji smo pripravili celične lizate in jih nanegli na gel skupaj z označevalcem velikosti. S pomočjo metode prenosa po Westernu smo analizirali zaviralne proteine transkripcijskega faktorja NF- κ B, in sicer fosforilirano obliko (p-I κ B α) in nefosforilirano obliko I κ B α (slika 13) ter MAPK protein, in sicer fosforilirano obliko (p-ERK 1/2) in nefosforilirano obliko ERK 1/2 (slika 14). Če celice tretiramo s spojino kot je LPS, to vodi do fosforilacije, ubikvitinacije in degradacije I κ B α . Kot posledica se sprosti NF- κ B, ki se nato translocira v jedro, kjer sproži ekspresijo tarčnih genov, ki vključujejo tudi vnetne dejavnike kot so TNF- α , IL-1 β , IL-6 in IL-8.



Slika 13: Analiza zaviralnih molekul NF-κB (IκBα) z metodo prenosa po Westernu. Celice smo 1 h pred-tretirali z resveratrolom (R) ali spojino **2** pri 25 μM koncentraciji. Nato smo dodali LPS in inkubirali nadaljnih 5 min, 30 min in 60 min. V celičnih lizatih smo nato detektirali fosforilirano (p-IκBα) in nefosforilirano obliko IκBα. β-aktin je služil za kontrolo nanosa.

Kot prikazuje slika 13 je prišlo do določenih sprememb v izražanju IκBα. Pri LPS se fosforilirana oblika IκBα v časovnih točkah od 5 min do 60 min povečuje, medtem ko se celokupna oblika IκBα v enakih časovnih točkah niža, kar običajno nakazuje na aktivacijo signalne poti NF-κB. Pri resveratrolu lahko vidimo zvišanje tako fosforilirane kot celokupne oblike IκBα v časovnih točkah med 5 min in 60 min. To pomeni, da se IκBα ne razgrajuje, s tem ne pride do sproščanja NF-κB, pač pa do kopičenja celokupne oblike IκBα. Količina fosforilirane oblike IκBα pa je v prisotnosti testne spojine **2** napram LPS tretiranim celicam časovno odvisno padala, hkrati pa se celokupna količina IκBα ni spreminjala. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da tako resveratrol kot spojina **2** zavirajo LPS-inducirano aktivacijo signalne poti NF-κB, vendar najverjetneje ne preko enakih molekularskih mehanizmov.



Slika 14: Analiza ERK 1/2 proteinov z metodo prenosa po Westernu. Celice smo 30 min pred-tretirali z resveratrolom (R) ali spojino **2** pri 25 μM koncentraciji. Nato smo dodali LPS za 5 min, 30 min ali 60 min. V celičnih lizatih smo nato detektirali fosforilirano (p-ERK 1/2) in nefosforilirano obliko ERK 1/2. β-aktin je služil za kontrolo nanosa.

Znano je, da LPS svoje vnetne učinke posreduje tudi preko aktivacije kinazne poti MAP. V eni izmed študij z resveratrolom so nakazali, da le-ta posreduje svoje protivnetno delovanje preko modulacije ERK (67), zato smo se odločili, da preverimo potencialni vpliv analoga **2** še na to pot. Pri analizi ERK 1/2 signalne poti na sliki 14 vidimo, da je prišlo do določenih sprememb. Fosforilirana oblika ERK 1/2 se pri LPS spremeni odvisno od časovne točke, in sicer se v času od 5 min do 60 min poveča, medtem ko celokupna oblika ERK 1/2 ostane enaka preko vseh časovnih točk iz česar lahko sklepamo, da pride do aktivacije ERK signalne poti. Pri resveratrolu se fosforilirana oblika ERK 1/2 postopoma zmanjša od 5 min do 60 min, celokupna oblika ERK 1/2 pa ostaja enaka, kar nakazuje na inhibitorni vpliv resveratrola na ERK signalne poti, medtem ko pri spojini **2** ni prišlo do sprememb pri fosforilirani ali celokupni obliki ERK 1/2.

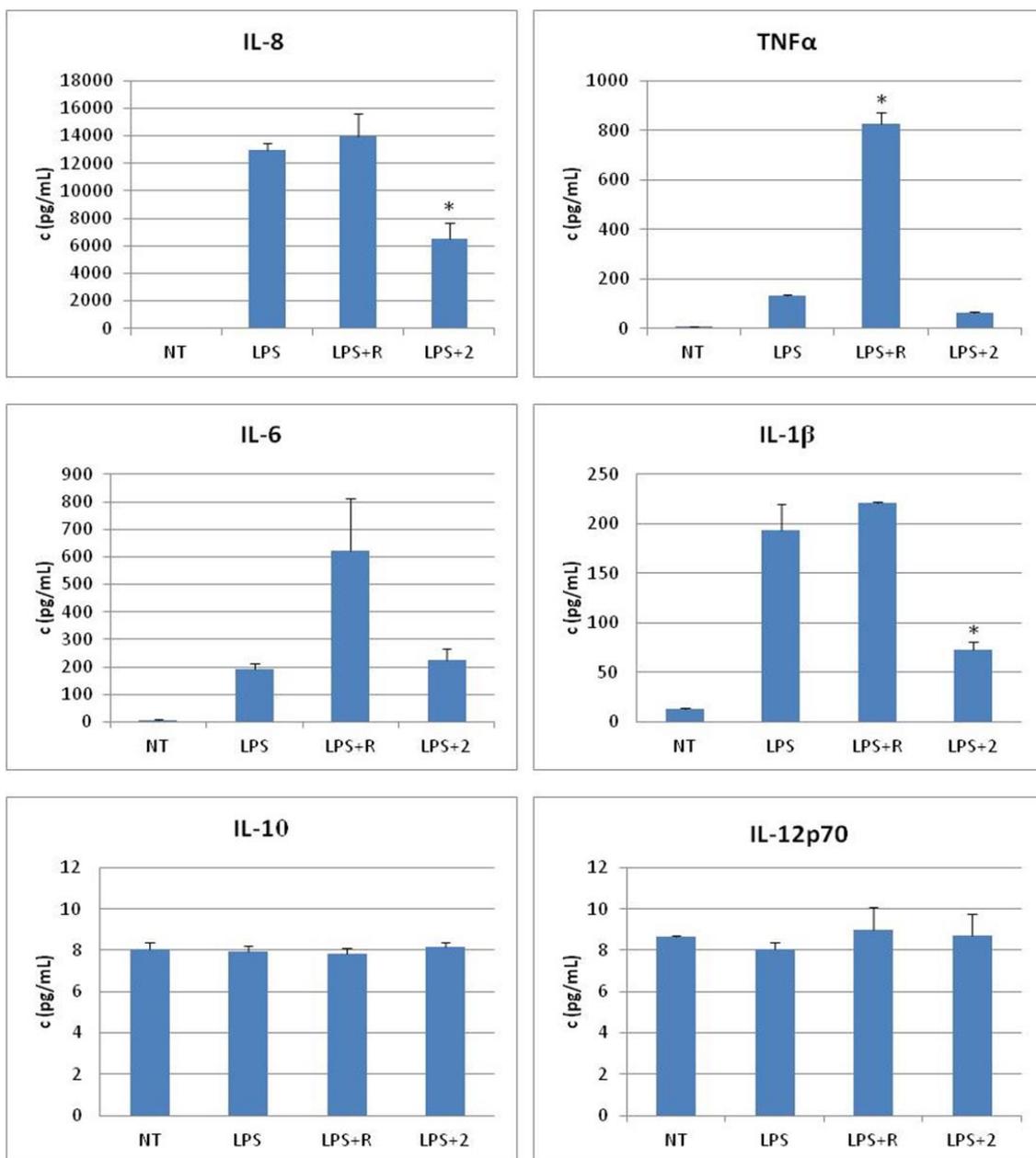
Iz rezultatov lahko sklepamo, da resveratrol in spojina **2** inhibirata signalno pot NF- κ B, medtem ko analog **2**, za razliko od resveratrola, ne modulira signalne poti ERK. Za natančno osvetlitev molekularnih mehanizmov bi bile potrebne dodatne raziskave.

Glede na strukturo 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola smo pričakovali, da se bo spojina **2** izkazala za najbolj perspektivno, saj ima v svoji strukturi dve prosti OH skupini, ki se nahajata na para mestu, kar je bolj ugodno za antioksidativno delovanje kot če bi se nahajali na meta mestu (77). Najslabše rezultate skozi vsa testiranja je izkazovala spojina **9**, ki ima za razliko od resveratrola in drugih analogov samo en benzenov obroč, in se zaradi tega strukturno zelo razlikuje od ostalih spojin, kar očitno zmanjša možnosti za dobro antioksidativno in protivnetno delovanje. Slabše delovanje so izkazovale spojine **3**, **5** in **6**, ki imajo pripete po dve ali tri metilne skupine, zaradi česar so bolj lipofilne od ostalih analogov in s tem slabše topne v vodnih raztopinah, prav tako smo zaradi zaščitene OH skupin pri teh spojinah pričakovali slabše antioksidativno in protivnetno delovanje.

4.4 CITOKINI

Citokini so raznolika skupina majhnih proteinov (od 5 do 20 kDa), ki ima pomembno vlogo pri regulaciji imunskega odziva. Mednje spadajo kemokini, interferoni, interlevkini, limfokini in dejavnik tumorske nekroze. Strukturno so si zelo podobni, saj vsi sodijo v družino glikoproteinov, imenovano hemopoetini in so pleiotropni, kar pomeni, da imajo v različnih celicah različen učinek. Citokine lahko proizvajajo različni tipi celic, vključno z imunskimi celicami kot so makrofagi, limfociti B in T, mastociti, endotelijske celice, fibroblasti in različne stromalne celice. Vsak citokin ima na celični membrani ujemajoč receptor, ki po vezavi sproži kaskado reakcij in vpliva na celične funkcije. To lahko vključuje uravnavanje več genov in njihovih transkripcijskih faktorjev, kar se kaže v spremenjeni proizvodnji drugih citokinov, povečanje števila površinskih receptorjev za druge molekule ali zaviranju lastnega učinka z načinom povratne zanke. Imajo pomembno vlogo pri zdravju in bolezni, še posebej v odgovorih gostitelja na okužbo, pri imunskem odzivu, vnetju, poškodbah, sepsi, raku in razmnoževanju.

Za konec smo preverili vpliv resveratrola in spojine **2** na izražanje citokinov. Kot je znano, resveratrol modulira izločanje številnih vnetnih dejavnikov, tudi citokinov. Inhibicija citokinov posledično vodi do zaviranja prepisovanja genov oziroma njihovih transkripcijskih faktorjev v jedru, rezultat česar je največkrat spremenjena produkcija drugih citokinov ali celičnih receptorjev za druge molekule. Med njimi so pomembni interlevkini in TNF- α . Mi smo preverili vpliv resveratrola in spojine **2** na izbranem setu vnetnih citokinov, ki vključuje interlevkin 1 β (IL-1 β), interlevkin 8 (IL-8), interlevkin 6 (IL-6), interlevkin 10 (IL-10), interlevkin 12p70 (IL-12p70) in TNF- α . THP-1 celično linijo smo pred-tretirali z analogom **2** v koncentraciji 25 μ M ali z resveratrolom enake koncentracije. Kot kontrolo smo uporabili netretirano celično kulturo. Po enourni inkubaciji smo dodali LPS (1 μ g/mL) v ustrezne vzorce in tretirali 20 h. V vsebnikih smo pripravili raztopine vzorcev in reagentov, kot je navedeno v navodilih za uporabo citokinskega kompleta (Human Inflammatory Cytokine Kit). Vzorce smo nato pomerili na pretočnem citometru. Teste smo trikrat ponovili in dobili naslednje rezultate (slika 15).



Slika 15: Določanje koncentracije IL-8, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 in IL-12p70. Celice THP-1 smo tretirali z LPS (1 μ g/mL) ali z LPS v prisotnosti resveratrola (R) ali analoga 2 (25 μ M). NT, netretirane celice; * $p < 0.05$ glede na LPS.

V prisotnosti LPS se je vrednost vseh citokinov glede na netretirane celice povečala, razen pri IL-10 in IL-12p70.

V eni izmed študij so raziskovali zaviralni učinek resveratrola na z LPS inducirano proizvodnjo citokina IL-8 v THP-1 celični liniji in ugotovili, da resveratrol inhibira izražanje IL-8 (67). V podobni študiji so dokazali, da resveratrol in njegovi metaboliti znižajo proizvodnjo IL-6 in TNF- α v makrofagih induciranih z LPS (88). Medtem pa so

drugi raziskovalci dokazali, da resveratrol v primerjavi z LPS poveča proizvodnjo določenih citokinov (TNF- α , IL-12, IL-6 in IL-1 β), če makrofagi niso aktivirani z interferonom γ (IFN- γ). Šlo naj bi za različen odziv makrofagov na LPS, če so le-ti aktivirani z IFN- γ ali ne (89). Med drugim pa so pokazali tudi, da LPS iz različnih virov oz. bakterij deluje preko različnih receptorjev in tako izzove drugačne vrste imunskih odzivov (90). Glede na rezultate iz prejšnjih testov smo pričakovali, da bo resveratrol zmanjšal proizvodnjo citokinov, a so nas rezultati presenetili, saj se je v našem eksperimentu zgodilo ravno obratno in je prišlo do povečanega izločanja citokinov. Čeprav je resveratrol dal nepričakovane rezultate pa iz drugih študij vidimo, da obstaja veliko faktorjev, ki vplivajo na odziv resveratrola v celicah induciranih z LPS.

Spojina **2** je zmanjšala izločanje IL-1 β , IL-8 in TNF- α po aktivaciji z LPS. Iz tega lahko sklepamo, da spojina **2** pomembno vpliva na nekatere vnetne faktorje in tako pripomore k protivnetnemu delovanju. Glede na to, da smo pokazali, da spojina **2** inhibira signalno pot NF- κ B, lahko sklepamo, da je zmanjšano izločanje IL-1 β , IL-8 in TNF- α posledica zmanjšane degradacije I κ B α in s tem transkripcijskega potenciala NF- κ B, katerega tarčni geni vključujejo tudi gene za IL-1 β , IL-8 in TNF- α .

5 SKLEP

Že dolgo je znano, da ima resveratrol protivnetne in antioksidativne učinke na celice. Na Katedri za farmacevtsko kemijo je bilo v okviru druge diplomske naloge sintetiziranih devet različnih 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola z namenom izboljšanja protivnetnega in antioksidativnega učinka izhodnega resveratrola. V okviru te diplomske naloge smo analoge biološko vrednotili na monocitni celični liniji THP-1 in ugotovili sledeče:

- Resveratrol in njegovi 1,2,4-oksadiazolni analogi imajo pri 25 μ M koncentraciji minimalen vpliv na viabilnost THP-1 celic, zato so te koncentracije primerne za nadaljno vrednotenje.
- Spojine **2**, **3** in **8** omejujejo obseg reaktivnih kisikovih zvrsti induciranih s *terc*-butil hidroperoksidom, pri čemer najboljši učinek izkazuje spojina **2**, ki ima celo boljše antioksidativno delovanje kot sam resveratrol.
- Tako kot resveratrol tudi spojini **2** in **4** modulirata signalno pot NF- κ B, saj zavirata s C12-iE-DAP inducirano aktivacijo NF- κ B. Z metodo prenosa po Westernu pa smo ugotovili, da spojina **2** inhibira signalno pot NF- κ B z vplivom na zaviralni protein I κ B α , a nima vpliva na signalno pot MAPK tako kot resveratrol.
- Spojina **2** zmanjša z LPS-om inducirano izločanje citokinov, in sicer interleukina 1 β (IL-1 β), interleukina 8 (IL-8) in dejavnik tumorske nekroze α (TNF- α). Iz tega lahko sklepamo, da spojina **2** pomembno vpliva na nekatere vnetne faktorje in tako pripomore k protivnetnemu delovanju.

Vse te ugotovitve prispevajo k razumevanju kemijskega prostora in strukturnih zahtev preko katerih resveratrol in njegovi analogi izkazujejo protivnetno in antioksidativno delovanje. Da bi to nedvomno potrdili, bi bilo potrebno opraviti še druge preizkuse, lahko bi na primer preverili še preostale proteine vpletene v signalne poti NF- κ B ter MAPK, raziskali proteasomsko aktivnost ter preverili učinke na drugih vrstah celic.

Ugotovitve tega raziskovalnega dela nakazujejo, da so tudi analogi sposobni antioksidativnega in protivnetnega delovanja v celični liniji THP-1 ter bi zaradi slabše biološke uporabnosti resveratrola lahko postali spojina vodnica za razvoj podobnih spojin, s katerimi bi dosegli želene učinke in tako uspešno nadomestili resveratrol.

6 LITERATURA

1. Sanders TH, McMichael RW, Hendrix KW: Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 1243–1246.
2. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean MEJ, Crozier A: Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 3337–3340.
3. Sobolev VS, Cole RJ: trans-Resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 1435–1439.
4. Wang Y, Catana F, Yang Y, Roderick R, van Breemen RB: An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 431–435.
5. Lyons MM, Yu C, Toma RB, et al: Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 5867–5870.
6. Baur JA, Sinclair DA: Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 493-506.
7. LeBlanc MR: Cultivar, juice extraction, ultra violet irradiation and storage influence the stilbene content of muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.). Ph.D. Thesis, Louisiana State. University and Agricultural and Mechanical College, Baton Rouge, LA, USA, 2006.
8. Pedras MSC, Ahiahonu PWK: Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogues by phytopathogenic fungi. *Phytochemistry* 2005; 66: 391–411.
9. Renaud S, De Lorgeril M: Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992; 339(8808): 1523–1526.
10. Mercolini L, Saracino MA, Bugamelli F, et al: HPLC-F analysis of melatonin and resveratrol isomers in wine using an SPE procedure. *J Sep Sci* 2008; 31: 1007–1014.
11. Goldberg DM, Yan J, Ng E, et al: A global survey of trans-resveratrol concentrations in commercial wines. *Am J Enol Vitic* 1995; 46(2): 159–165.
12. Romero Perez P, Amat Cecilia M, Rafie Mazketli W, Merenciano Cortina FJ, Laforga Canales JB: Epididymal adenomatoid tumor: review of the national literature and report of a case. *Actas Urol Esp* 1996; 20(9): 839–843.

13. Szewczuk LM, Penning TM: Mechanism-based inactivation of COX-1 by red wine m-hydroquinones: a structure activity relationship study. *J Nat Prod* 2004; 67: 1778–1782.
14. Landrault N, Poucheret P, Ravel P, Gasc F, et al: Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 3341–3348.
15. Peng Y, Chu Q, Liu F, Ye J: Determination of phenolic constituents of biological interest in red wine by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 153–156.
16. Kobayashi S, Ding CK, Nakamura Y, Nakajima I, Matsumoto R: Kiwifruits (*actinida deliciosa*) transferred with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glukoside). *Plant Cell Reports* 2000; 19: 904–910.
17. Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, et al: Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab* 2008; 8(2): 157–168.
18. Bass TM, Weinkove D, Houthoofd K, Gems D, Partridge L: Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 2007; 128(10): 546–552.
19. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, et al: Resveratrol improves health and survival of mice on a highcalorie diet. *Nature* 2006; 444(7117): 337–342.
20. Frankel N, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE: Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet* 1993; 341: 454–457.
21. Fremont L, Belguendouz L, Delpal S: Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Science – Elsevier* 1999; 64: 2511–2521.
22. Blache D, Gesquiere L, Loreau N, Durand P: Oxidant stress: The role of nutrients in cell-lipoprotein interactions. *Proc Nutr Soc* 1999; 58: 559–563.
23. Halliwell B: Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: How should we move forward. *Cardiovascular Research - Elsevier* 2000; 47: 410–418.
24. Belguendouz L, Fremont L, Gozzelino MT: Interaction of trans-resveratrol with plasma lipoproteins. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 811– 816.

25. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE: Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 1993; 341: 1103–1104.
26. Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ: Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 549–555.
27. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM: The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 1995; 235: 207–219.
28. Bertelli AA, Giovannini L, Giannessi D, et al: Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int J Tissue Reactions* 1995; 17(1): 1–3.
29. Virgili M, Contestabile A: Partial neuroprotection of in vivo excitotoxic brain damage by chronic administration of the red wine antioxidant agent, trans-resveratrol in rats. *Neurosci Lett* 2000; 281: 123–126.
30. Anekonda TS: Resveratrol—a boon for treating Alzheimer’s disease? *Brain Res Rev* 2006; 52: 316–326.
31. Karuppagounder SS, Pinto JT, Xu H, Chen HL, Beal MF, Gibson GE: Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer’s disease. *Neurochem Int* 2009; 54: 111–118.
32. Ates O, Cayli SR, Yucel N, Altinoz E, Kocak A, Durak MA, Turkoz Y, Yologlu S: Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Clin Neurosci* 2007; 14: 256–260.
33. Su HC, Hung LM, Chen JK: Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290 (6): 1339–1346.
34. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, et al: Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997; 275: 218–220.
35. Mgbonyebi OP, Russo J, Russo IH: Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells. *Int J Oncol* 1998; 12: 865–869.
36. Lu R, Serrero G: Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity, and inhibits the growth of human breast cancer cells. *J Cell Physiol* 1999; 179: 297–304.

37. Hsieh TC, Wu JM: Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp Cell Res* 1999; 249: 109–115.
38. Schneider Y, Vincent F, Durantou B, Badolo L, Gosse F, Bergmann C, et al: Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes, and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Lett* 2000; 158: 85–91.
39. Marques FZ, Markus MA, Morris BJ: Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 2125–2128.
40. Athar M, Back JH, Tang X, et al: Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 224: 274–283.
41. Shankar S, Singh G, Srivastava RK: Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potentials. *Front Biosci* 2007; 12: 4839–4854.
42. Signorelli P, Ghidoni R: Resveratrol as an antiproliferative agent for cancer. In: Aggarwal BB, Shishodia S, eds. *Resveratrol in Health and Disease*. CRC Press 2006; 57–83.
43. Pervaiz S, Holme AL: Mechanism of apoptosis by resveratrol. In: Aggarwal BB, Shishodia S, eds. *Resveratrol in Health and Disease*. CRC Press 2006; 85–104.
44. Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD: Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *J Assoc Physicians India*. 2004; 52: 794-804.
45. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE: Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 1993; 341(8852): 1103–1104.
46. Vozelj M: *Temelji imunologije*, 1. izdaja, DZS d.d., Ljubljana, 2000: 327-352.
47. Elmali N, Baysal O, Harma A, Esenkaya I, Mizrak B: Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. *Inflammation* 2007; 30(1–2): 1–6.
48. Yoshida Y, Shioi T, Izumi T: Resveratrol ameliorates experimental autoimmunemyocarditis. *Circ J* 2007; 71(3): 397–404.
49. Singh NP, Hegde VL, Hofseth LJ, Nagarkatti M, Nagarkatti P: Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) ameliorates experimental allergic encephalomyelitis, primarily via induction of apoptosis in T cells involving activation of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor. *Mol Pharmacol* 2007; 72(6): 1508–1521.

50. Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420: 885–891.
51. Samuelsson B: On the incorporation of oxygen in the conversion of 8,11,14-eicosatrienoic acid to prostaglandin E1. *J Am Chem Soc* 1965; 87(13): 3011–3013.
52. Hamberg M, Samuelsson B: Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70(3): 899–903.
53. Hamberg M, Samuelsson B: Prostaglandin endoperoxides: novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71(9): 3400–3404.
54. Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, et al: Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273(34): 21875–21882.
55. Kundu JK, Surh YJ: Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF-kappaB and AP-1 as potential targets. *Mutat Res* 2004; 555(1–2): 65–80.
56. Westwick JK, Weitzel C, Minden A, Karin M, Brenner DA: Tumornecrosis factor alpha stimulates AP-1 activity through prolonged activation of the c-Jun kinase. *J Biol Chem* 1994; 269(42): 26396–26401.
57. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB: Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 2000; 164(12): 6509–6519.
58. Ghosh S, May MJ, Kopp EB: NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225–260.
59. Karin M, Ben-Neriah Y: Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621–663.
60. Ghosh S, Karin M: Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002; 109 (Suppl): S81–S96.
61. Karin M, Yamamoto Y, Wang QM: The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(1): 17–26.
62. Jost PJ, Ruland J: Aberrant NF-κB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences and therapeutic implications. *Blood* 2007; 109: 2700–2707.
63. Estrov Z, Shishodia S, Faderl S, et al: Resveratrol blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappaB, inhibits proliferation,

- causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acutemyeloid leukemia cells. *Blood* 2003; 102(3): 987–995.
64. Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK: Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol* 1999; 126(3): 673–680.
 65. Cho DI, Koo NY, ChungWJ, et al: Effects of resveratrol-related hydroxystilbenes on the nitric oxide production in macrophage cells: structural requirements and mechanism of action. *Life Sci* 2002; 71(17): 2071–2082.
 66. Pendurthi UR, Meng F, Mackman N, Rao LV: Mechanism of resveratrol-mediated suppression of tissue factor gene expression. *Thromb Haemostasis* 2002; 87(1): 155–162.
 67. Oh YC, Kang OH, Choi JG, Chae HS, Lee YS, Brice OO, Jung HJ, Hong SH, Lee YM, Kwon DY: Anti-inflammatory effect of resveratrol by inhibition of IL-8 production in LPS-induced THP-1 cells. *Am J Chin Med* 2009; 37(6): 1203-1214.
 68. Zong Y, Sun L, Liu B, Deng YS, Zhan D, Chen YL, He Y, Liu J, Zhang ZJ, Sun J, Lu D: Resveratrol inhibits LPS-induced MAPKs activation via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in murine RAW 264.7 macrophage cells. *PLoS One* 2012; 7(8): 44107.
 69. Lee HJ, Seo JW, Lee BH, Chung KH, Chi DY, Bioorg: Syntheses and radical scavenging activities of resveratrol derivatives. *Med Chem Lett* 2004; 14(2): 463–466.
 70. Kang SS, Cuendet M, Endringer DC, Croy VL, Pezzuto JM, Lipton MA: Synthesis and biological evaluation of a library of resveratrol analogues as inhibitors of COX-1, COX-2 and NF-κB. *Bioorg Med Chem* 2009; 17: 1044–1054.
 71. Orsini F, Pelizzoni F, Verotta L, Aburjai T, Rogers CB: Isolation, synthesis, and antiplatelet aggregation activity of Resveratrol-3-O-β-D-glucopyranoside and related compounds. *J Nat Prod* 1997; 60: 1082–1087.
 72. Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM: Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci* 1997; 6: 2103–2110.

73. Hoshino J, Park EJ, Kondratyuk TP, Marler L, Pezzuto JM, Breemen RB, Mo S, Li Y, Cushman M: Selective Synthesis and Biological Evaluation of Sulfate-Conjugated Resveratrol Metabolites. *J Med Chem* 2010; 53(13): 5033–5043.
74. Murias M, Handler N, Erker T, Pleban K, Ecker G, Saiko P: Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure-activity relationship. *Bioorg Med Chem* 2004; 12: 5571–5578.
75. Murias M, Jäger W, Handler N, Erker T, Horvath Z, Szekeres T: Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 903–912.
76. Ashikawa K, Majumdar S, Banerjee S, Bharti AC, Shishodia S, Aggarwal BB: Piceatannol inhibits TNF-induced NF-kappaB activation and NF-kappaB-mediated gene expression through suppression of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation. *Immunol* 2002; 169: 6490–6497.
77. Stivala LA, Savio M, Carafoli F, Perucca P, Bianchi L, Maga G, Forti L, Pagnoni UM, Albini A, Prosperi E, Vannini V: Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J Biol Chem* 2001; 276(25): 22586-22594.
78. Savio M, Coppa T, Bianchi L, Vannini V, Maga G, Forti L, Cazzalini O, Lazzè MC, Perucca P, Prosperi E, Stivala LA: The resveratrol analogue 4,4'-dihydroxy-trans-stilbene inhibits cell proliferation with higher efficiency but different mechanism from resveratrol. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(12): 2493-2502.
79. Balan KV, Wang Y, Chen SW, Chen JC, Zheng LF, Yang L: Proteasome-independent down-regulation of estrogen receptor-alpha (ERalpha) in breast cancer cells treated with 4,4'-dihydroxy-trans-stilbene. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 573–581.
80. Cai YJ, Fang JG, Ma LP, Yang L, Liu ZL: Inhibition of free radical-induced peroxidation of rat liver microsomes by resveratrol and its analogues. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1637: 31–38.
81. Siddiqui A, Dandawate P, Rub R, Padhye S, Aphale S, Moghe A, Jagyasi A, Venkateswara SK, Singh B, Chatterjee A, Ronghe A, Bhat HK: Novel Azaresveratrol analogs: synthesis, characterization and anticancer activity against breast cancer cell lines. *Bioorg Med Chem Lett* 2013; 23(3): 635-640.

82. Promega Corporation. <http://www.promega.com/products/cell-health-assays/cellviability-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay- mts />
Dostop: december 2013.
83. <http://www.biotek.com/resources/articles/reactive-oxygen-species.html>
Dostop: januar 2014.
84. Protein Assay. Bio-Rad Laboratories SIG 120197, LIT 448 RevD.
85. <http://www.piercenet.com/method/overview-western-blotting>
Dostop: December 2013.
86. Kuhelj R: Biokemija v praksi: načela in tehnike, s prilogo: Renko M, Kuhelj R, Bevec T, et al: Navodila za eksperimentalno delo pri laboratorijskih vajah iz biokemije. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2003; 68-71, 73-74.
87. <http://www.bdbiosciences.com/instruments/facscalibur/features/applications.jsp>
Dostop: januar 2014.
88. Walker J, Schueller K, Schaefer LM, Pignitter M, Esefelder L, Somoza V: Resveratrol and its metabolites inhibit pro-inflammatory effects of lipopolysaccharides in U-937 macrophages in plasma-representative concentrations. *Food Funct* 2013; 5(1): 74-84.
89. Feng YH, Zhu YN, Liu J, Ren YX, Xu JY, Yang YF, Li XY, Zou JP: Differential regulation of resveratrol on lipopolysacchride-stimulated human macrophages with or without IFN-g pre-priming. *Int Immunopharmacol* 2004; 4(6): 713–720.
90. Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, Banchereau J: Lipopolysaccharides from Distinct Pathogens Induce Different Classes of Immune Responses In Vivo. *J Immunol* 2001; 167: 5067–5076.