

Katarzyna Owczarek, Jakub Fichna, *Urszula Lewandowska

Aktywność przeciwzapalna związków polifenolowych

Anti-inflammatory activity of polyphenolic compounds

Zakład Biochemii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Kierownik Zakładu: prof. nadzw. dr hab. n. med. Jakub Fichna

SUMMARY

Polyphenols are natural compounds characterized by a high structural diversity, and their common occurrence in plants renders them intrinsic dietary components. At present, polyphenols are looked upon as secondary metabolites characterized by a wide spectrum of biological activities. There is also a growing body of evidence on their anti-inflammatory activity. It is well known that inflammation plays a key role in many chronic diseases such as circulatory, pulmonary, autoimmune, and neurodegenerative diseases, as well as diabetes and cancer. The mechanism of polyphenol activity in the inflammatory process is associated with control and inhibition of proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and enzymes involved in the metabolism of arachidonic acid. Furthermore, polyphenols exhibit inflammatory activity on many levels by NF- κ B inhibition, MAPK, iNOS and growth factors regulation. This review discusses the anti-inflammatory and therapeutic activity of some polyphenolic compounds and polyphenol-rich extracts.

Keywords: polyphenols, anti-inflammatory activity, anti-inflammatory agents

STRESZCZENIE

Polifenole to naturalne związki o dużym zróżnicowaniu strukturalnym, a ich powszechne występowanie w roślinach sprawia, że są nierozłącznymi składnikami diety. Obecnie polifenole uznaje się za wtórne metabolity o szerokim spektrum aktywności biologicznej. Rośnie także liczba dowodów potwierdzających ich potencjał przeciwzapalny. Wiadomo, że stan zapalny odgrywa kluczową rolę w przebiegu wielu przewlekłych chorób, takich jak choroby układu krążenia, płucne, autoimmunologiczne, cukrzyca, choroby nowotworowe i neurodegeneracyjne. Mechanizm przeciwzapalnego działania związków polifenolowych polega na kontroli syntezy prozapalnych cytokin, takich jak IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α oraz enzymów zaangażowanych w metabolizm kwasu arachidonowego. Polifenole wykazują aktywność przeciwzapalną poprzez hamowanie NF- κ B oraz regulację MAPK, iNOS i niektórych czynników wzrostu. Celem niniejszej pracy było omówienie aktywności przeciwzapalnej i terapeutycznej wybranych związków polifenolowych i ekstraktów bogatych w polifenole.

Słowa kluczowe: polifenole, aktywność przeciwzapalna, czynniki przeciwzapalne

Wprowadzenie

Aktualna wiedza na temat polifenoli i ekstraktów bogatych w te związki, potwierdzona badaniami *in vitro* i *in vivo*, wskazuje na ich właściwości przeciwzapalne.

Zasadniczy wpływ polifenoli na przebieg procesów zapalnych polega na hamowaniu syntezy prozapalnych cytokin, takich jak IL-1 β , IL-2, IL-6, γ -interferonu (ang. *interferon-gamma* – IFN- γ),

czynnika martwicy nowotworów α (ang. *tumor necrosis factor α* – TNF- α) oraz chemokin w różnych typach komórek (1, 2). Ponadto polifenole wykazują właściwości przeciwzapalne na wielu poziomach, głównie na drodze hamowania czynnika jądrowego κ B (ang. *nuclear factor- κ B* – NF- κ B), regulacji kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinases* – MAPK), indukowalnej syntazy tlenku azotu (ang. *inducible nitric oxide synthase* – iNOS) oraz hamowania enzymów zaangażowanych w metabolizm

kwasy arachidonowego – cyklooksygenazy-2 (ang. *cyclooxygenase-2* – COX-2) i lipooksygenazy (ang. *lipoxygenase* – LOX), a także obniżenia syntezy reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species* – ROS) w stosunku do reaktywnych form azotu (ang. *reactive nitrogen species* – RNS) (3-5).

Celem niniejszego artykułu jest przegląd aktualnych danych pochodzących z badań *in vitro* i *in vivo*, wskazujących na przeciwzapalne działanie niektórych polifenoli oraz ekstraktów bogatych w te związki, poprzez hamowanie aktywności NF- κ B, COX-2 oraz iNOS.

Wpływ polifenoli na aktywację jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B

Istotnym celem działania polifenolowych związków roślinnych jest czynnik NF- κ B, odgrywający znaczącą rolę w procesach odpornościowych i zapalnych. NF- κ B występuje w niemalże wszystkich organizmach eukariotycznych w postaci homo- i heterodimerów, uformowanych z rodziny białek transkrypcyjnych Rel, tworząc nieaktywny kompleks z inhibitorem białkowym (ang. *inhibitor of NF- κ B* – I κ B) w cytoplazmie. Fosforylacja I κ B powoduje aktywację i umożliwia przemieszczenie NF- κ B do jądra, czego wynikiem jest również aktywacja transkrypcji genów kodujących białka, odpowiedzialnych za komórkową odpowiedź na czynniki chorobotwórcze i stresowe (6). NF- κ B kontroluje ekspresję cytokin prozapalnych i chemokin (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α), COX-2, niektórych czynników wzrostu i regulatorów apoptozy poprzez indukcję proliferacji oraz stymulację angiogenezy w komórkach (7). Dlatego czynniki, które ograniczają aktywację NF- κ B, mogą potencjalnie zapobiegać także ekspresji cytokin, a tym samym blokować odpowiedź zapalną. Zaburzenia wydzielania NF- κ B są istotne w wielu chorobach związanych z procesem zapalnym, takich jak astma, stwardnienie rozsiane, miażdżycy, choroba Leśniowskiego-Crohna czy wrzodziejące zapalenie jelit (5, 8). Nadmierna aktywność tego czynnika jest także obserwowana w rozwoju cukrzycy typu 2 połączonej z otyłością (9).

Badania ostatnich lat wskazują, że modulacja NF- κ B pod wpływem działania polifenoli wywołuje pozytywny efekt przeciwzapalny (5).

Dowiedziano, że galusan epigallokatechiny (ang. (-)-*epigallocatechin-3-gallate* – EGCG), kapsaicyna i kurkumina hamują działanie czynnika NF- κ B, przeciwdziałają aktywacji kinazy I κ B, ograniczając tym samym ekspresję regulowanych przez ten czynnik genów (10). W komórkach nowotworowych jelita grubego Caco-2 oraz mastocytach stwierdzono

hamowanie aktywności NF- κ B przez chryzynę (11, 12). Wykazano, że chryzyna w stężeniu 10 μ g/ml łagodziła alergiczne stany zapalne mastocytów na drodze hamowania aktywności NF- κ B oraz TNF- α , IL-1 β , IL-4 i IL-6 (3). Podobny przeciwzapalny efekt powodowały antocyjany wyizolowane z owoców borówki amerykańskiej (frakcja PC18), które blokowały translokację NF- κ B do jądra mysich komórek mikrogleju (BV-2) (13). Aktywacja BV-2 może prowadzić do postępujących uszkodzeń układu nerwowego, w tym udaru mózgu, stwardnienia rozsianego, a także chorób Parkinsona i Alzheimerera. Udokumentowano, że badana frakcja PC18 w stężeniu 100 μ g/ml na poziomie transkrypcyjnym hamuje indukowaną lipopolisacharydem (ang. *lipopolysaccharide* – LPS) syntezę prozapalnych mediatorów COX-2 (40%) i iNOS (80%) w stosunku do kontroli. Malwidyno-3-glukozyd (Mv3glc), również należący do antocyjanów, hamował aktywowaną nadtlenoazotynem ekspresję iNOS, NF- κ B, COX-2 i IL-6 w bydłych komórkach śródbłonna aorty, pozyskanych z aorty klatki piersiowej. Poziom NF- κ B już po 14 godz. inkubacji komórek w obecności 25 μ M Mv3glc uległ obniżeniu przez ograniczenie degradacji cytoplazmatycznego inhibitora I κ B α (14). Ekspresja regulowanych przez NF- κ B prozapalnych mediatorów została zredukowana o 50% w przypadku COX-2 i prawie w 100% dla IL-6 już po 1 godz. inkubacji z malwidyną.

Mito i wsp. (15) dowiedli natomiast kardioochronnych właściwości kurkuminy, dzięki zahamowaniu ekspresji NF- κ B oraz IL-1 i TNF- α , jako strategii leczenia zapalenia mięśnia sercowego. Badania (*in vitro* i *in vivo*) dotyczące raka prostaty wykazały, że kurkumina w stężeniu 15 μ M blokowała translokację NF- κ B do jądra przez inhibicję kinazy I κ B oraz znacząco redukowała ekspresję COX-2, której nadekspresja powiązana jest z rozrostem gruczołu krokowego (2). Z kolei apigenina, należąca do flawonów, w komórkach RAW 264.7 ograniczyła aktywność kinazy I κ B, blokując fosforylację podjednostki p65 NF- κ B wzbudzonej przez LPS oraz *in vivo* zahamowała syntezę TNF- α (16, 17). Przeciwzapalny efekt działania tego flawonu zaobserwowano u myszy z ostrym urazem płucnym, wywołanym przez LPS, odpowiedzialnym za aktywację makrofagów. Apigenina podana do otrzewnowo w dawce 20 mg/kg obniżyła ekspresję NF- κ B (30%), a także TNF- α (60%) i COX-2 (20%) w stosunku do grupy kontrolnej (17).

Skutecznym polifenolem zapobiegającym stanom zapalnym wątroby okazała się genisteina obecna w soi (18). Szybko postępującą niewydolność wątroby indukowaną u szczurów D-galaktozoaminą zahamowano dożołądkowym podawaniem genisteiny w dawce

5 mg/kg przez 30 dni. Powyższy efekt przeciwzapalny był wynikiem redukcji białka iNOS i COX-2 poprzez zablokowanie aktywacji NF-κB i fosforylacji p38 MAPK. Celem badań przeprowadzonych przez Terrę i wsp. (8) była ocena przeciwzapalnych właściwości ekstraktu z pestek winogron i jego wpływu na ekspresję NF-κB w komórkach RAW 264.7. Komórki makrofagów inkubowano przez 4 godz. z ekstraktem w stężeniu 65 μg/ml, a następnie stymulowano mieszaniną LPS i IFN-γ. Okazało się, że ekstrakt z pestek winogron zahamował translokację p65 NF-κB prawie o 40%.

Badania przeprowadzone na 120 zdrowych ochotnikach, spożywających dwa razy dziennie przez trzy tygodnie suplement diety Medox, odpowiadający 100 g świeżych owoców jagodowych, wykazały znaczne różnice w ekspresji prozapalnych mediatorów kontrolowanych przez NF-κB (19). Obserwacje dotyczyły między innymi chemokiny IL-8 oraz interferonu α (IFNα), których poziom w osoczu w grupie przyjmującej suplement Medox uległ obniżeniu odpowiednio o 45 i 40%, w porównaniu z grupą przyjmującą placebo. Powyższe przykłady sugerują, że suplementacja diety polifenolami może odgrywać ważną rolę w zapobieganiu i leczeniu chorób o podłożu zapalnym, przez hamowanie aktywności NF-κB oraz ograniczenie wydzielania w osoczu prozapalnych chemokin i cytokin.

Wpływ polifenoli na aktywność cyklooksygenazy

Cyklooksygenaza (ang. *cyclooxygenase* – COX) występuje w postaci trzech izoform: COX-1, COX-2 i COX-3. COX-1 jest formą konstytutywną w większości komórek. COX-2 jest natomiast enzymem indukowalnym, którego ekspresję stymulują czynniki prozapalne (20, 27). Ekspresja COX-3 dotyczy zaś ośrodkowego układu nerwowego, obecność tego enzymu wykryto w korze mózgowej, rdzeniu kręgowym i sercu (21). Ekspresja genu COX-2 pobudzana jest przez wiele czynników, wśród których wyróżniamy: czynniki wzrostu, NF-κB oraz mediatory zapalenia IL-1 i TNF-α. Prawie we wszystkich typach komórek poddanych działaniu TNF-α, LPS lub innych czynników stymulujących zachodzi aktywacja NF-κB i aktywatora białka-1 (ang. *activating protein-1* – AP-1), prowadząc do pobudzenia ekspresji genów COX-2, iNOS, cząstek adhezyjnych, cytokin i chemokin (22). Istnieje ścisły związek między procesem kancerogenezy a toczącym się w obrębie danej tkanki stanem zapalnym. Syntetyzowane z udziałem COX-2 prostaglandyny pełnią istotną rolę w patogenezie nowotworów, wpływając na proliferację

komórek, adhezję komórkową oraz przez działanie immunosupresyjne zmniejszając szanse na rozpoznanie i eliminację nieprawidłowych komórek (23). Długotrwała synteza prostaglandyn lub nadekspresja COX-2 związana jest z zaburzeniami o charakterze zapalnym, takimi jak astma, reumatoidalne zapalenie stawów oraz choroba Alzheimera.

W leczeniu przewlekłych stanów zapalnych wykorzystywane są niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), których długotrwałe przyjmowanie może powodować różne efekty uboczne ze strony przewodu pokarmowego, nerek, wątroby oraz może zaburzać układ krzepnięcia (24).

Działanie NLPZ polega na hamowaniu aktywności COX-2, głównego enzymu odpowiadającego za syntezę prostaglandyn. Stymulują one procesy zapalne, dla których substratami są endotlenki powstające po utlenieniu przez cyklooksygenazę kwasu arachidonowego (25).

Obiecującą alternatywę dla NLPZ mogą stanowić związki polifenolowe pochodzenia roślinnego, obecne w diecie człowieka. Należą do nich flawonoidy wykazujące zdolność hamowania syntezy eikozanoidów poprzez oddziaływanie na COX. Wykazano, że kwercetyna hamuje aktywność COX-2, co powoduje obniżenie syntezy prostaglandyny PGE₂, a w konsekwencji zahamowanie napływu leukocytów, unormowanie napięcia naczyń włosowatych i zmniejszenie odczynu zapalnego (26).

Dowodów na hamowanie ekspresji COX-2 przez polifenole, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka oraz przeciwdziałanie skutkom ubocznym NLPZ dostarczyły badania przeprowadzone przez D'Argenio i wsp. (27). Ekstrakt z jabłek, bogaty w polifenole, w stężeniu 0,0001 mol zredukował stan zapalny błony śluzowej żołądka wywołany aspiryną (podawaną szczurom dożołądkowo w dawce 200 mg/kg). Wykazano, że ekstrakt ten obniżał o 50% zarówno ostry, jak i przewlekły stan zapalny u zwierząt (27).

Kolejnym przykładem powiązania przeciwzapalnego działania polifenoli i ich wpływu na COX-2 były badania Obaty i wsp. (28). Ludzkie komórki nabłonkowe nosa (ang. *human nasal epithelial cells* – HNECs) zakażone syncytialnym wirusem oddechowym (ang. *respiratory syncytial virus* – RSV), będącym najczęstszą przyczyną zapalenia oskrzelików i płuc, a w konsekwencji astmy u niemowląt i dzieci, poddano działaniu kurkuminy. Zastosowanie polifenolu w stężeniach 0,1-10 μg/ml spowodowało zahamowanie ekspresji COX-2. Kurkumina okazała się być obiecującym związkiem dla terapii chorób dolnych dróg oddechowych wywołanych przez RSV, wymagającym dalszych badań.

Gonzales i Orlando (29) aktywowali natomiast za pomocą TNF- α mysie adipocyty 3T3-L1, uzyskując 2,5-krotny wzrost ekspresji COX-2 na poziomie mRNA. Zastosowane w następnych etapach badań kurkumina i resweratrol w stężeniu 2 μ M zahamowały o 50% ekspresję genu COX-2, a przy 20 μ mol stężeniu również IL-6 oraz PGE₂. Ograniczenie ekspresji COX-2 przez flawonoidy uzyskano także poprzez działanie kemferolem w stężeniu 100 μ mol na fibroblasty wyizolowane od pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (ang. *rheumatoid arthritis synovial fibroblasts* – RASF) (30). RASF pobudzone do syntezy COX-2 w wyniku stymulacji IL-1 β , odgrywającej kluczową rolę w rozwoju tej choroby, w stężeniu 1 ng/ml, z równoczesnym podaniem kemferolu (100 μ mol), zahamowały ekspresję COX-2 na poziomie mRNA. Badany kemferol wyizolowany z wiśni kosmatej (*Prunus tomentosa*), w stymulowanych przez LPS mysich komórkach RAW 264.7, również obniżał mRNA COX-2 w sposób zależny od dawki (31). Komórki RAW 264.7 posłużyły także jako model do oceny działania ekstraktu z korzenia rzepy (25-100 μ g/ml) (32). Zaobserwowano zahamowanie ekspresji COX-2 na poziomie białka również w sposób zależny od dawki ekstraktu. Te same komórki wykorzystano do określenia aktywności przeciwzapalnej ekstraktów pozyskanych z trzech gatunków oregano: *Lippia graveolens* (LG), *Lippia palmeri* (LP) i *Hedeoma patens* (HP) (33). Wszystkie badane ekstrakty w stężeniu 200 μ g/ml ograniczyły znacząco ekspresję COX-2 odpowiednio o 81,7; 74,6 i 64,7%.

Wpływ polifenoli na syntezę tlenu azotu i aktywność indukowanej syntazy tlenu azotu

Tlenek azotu (NO) to gazowy wolny rodnik, powstający w wyniku działania enzymu iNOS stymulowanego przez cytokiny i LPS (28). Niedobór NO występuje w licznych chorobach układu sercowo-naczyniowego, żołądkowo-jelitowego, moczowo-płciowego oraz oddechowego (34). Tlenek azotu uczestniczy w procesach fizjologicznych (regulacja przepływu i ciśnienia krwi, regulacja hormonalna, neurotransmisja) i patologicznych (stan zapalny, procesy oksydacyjno-redukcyjne oraz niedokrwienia i reperfuzji) (34, 35). Ze względu na małą masę cząsteczkową, NO może w krótkim czasie przedostawać się przez błony komórkowe i dyfundować na odległość nawet kilku mikronów. Oznacza to, że NO może być formowany i syntetyzowany przez różne tkanki i w konsekwencji bierze udział w ważnych procesach biologicznych związanych z rozwojem wielu chorób (35).

Ekspresja iNOS zarówno na poziomie mRNA, jak i białka jest kontrolowana przez stale rosnącą liczbę agonistów, głównie przez mediatory prozapalne. Do kluczowych cytokin zaangażowanych w stymulację iNOS należą: TNF- α , IL-1 i IFN- γ oraz endotoksyna LPS. Regulacja syntetyzowanego NO, potencjalnego czynnika prozapalnego, przy udziale iNOS, zachodzi na poziomie transkrypcji i translacji (36). W wyniku reakcji NO z wolnymi rodnikami powstaje szkodliwy nadtlenoazotyn (ONOO⁻), który uszkadza DNA, co w konsekwencji może prowadzić do mutacji nowotworowych (37).

Flawonoidy i inne naturalne polifenole wykazują zdolność usuwania wolnych rodników zapobiegając ich reakcjom z NO i w ten sposób zmniejszając rozmiar uszkodzeń DNA. Związkiem ograniczającym szkodliwe działanie ONOO⁻ jest (-)-epikatechina, będąca składnikiem zielonej herbaty (38). W badaniach z użyciem linii komórkowej HUVEC, polegających na inkubacji tych komórek z (-)-epikatechiną, obserwowano ograniczenie ilości uwalnianego NO (39).

Redukcję ekspresji NO/iNOS oraz prozapalnych IL-6 i TNF- α wykazano także *in vitro* w komórkach RAW 264.7 (40). Dowiedziono, że delfinidyna, należąca do antocyjanów wyizolowanych z kettmii szczawiowej (*Hibiscus sabdariffa* L.), zastosowana w stężeniu 200 μ M spowodowała zahamowanie ekspresji iNOS na poziomie białka o ponad 55% w stosunku do kontroli, w której komórki potraktowane zostały tylko LPS. Poziom cytokin (IL-6 i TNF- α) również uległ obniżeniu w sposób zależny od stężenia.

W tej samej linii RAW 264.7 ekstrakt z pestek winogron zastosowany w stężeniu 10-65 μ g/ml obniżał ekspresję iNOS na poziomie mRNA i białka także w sposób zależny od stężenia. Ekstrakt ten w stężeniu 10 μ g/ml hamował ponadto syntezę NO o 40%. Wykazano, że inhibicja NO była zależna nie tylko od stężenia, ale i od czasu działania ekstraktu (8). Komórki RAW 264.7 posłużyły także Eo i wsp. (41) do oceny aktywności przeciwzapalnej metanolowego ekstraktu z korzenia morwy (*Morus alba* L.). Ekstrakt zastosowany w stężeniach 10-50 μ g/ml znacząco hamował ekspresję iNOS na poziomie białka w sposób zależny od stężenia, poza tym w stężeniu 30 μ g/ml blokował w 50% syntezę NO w porównaniu z kontrolą traktowaną LPS (1 μ g/ml).

Aktywację makrofagów z linii RAW 264.7 uzyskali Li i wsp. (42) poprzez stymulację komórek LPS (1,5 mg/ml) i IFN- γ (10 ng/ml). Następnie makrofagi poddano działaniu ekstraktów bogatych w antocyjany pochodzących z różnych gatunków owoców jagodowych. Najskuteczniej syntezę NO hamował ekstrakt z owoców

Tab. 1. Przeciwwzapalny efekt działania polifenoli i ich ekstraktów na ekspresję NF-κB, COX-2 and iNOS

Efekt przeciwzapalny	Polifenol/ekstrakt	Rodzaj badania	Model badań	Zakres stężeń	Źródło
↓NF-κB	chryzyna (5,7-dihydroksyflawon)	<i>in vitro</i>	komórki tuczne (mastocyty)	10 µg/ml	(11)
		<i>in vitro</i>	linia nowotworowa jelita grubego (Caco-2)	50 µM	(12)
	malwidyno-3-glikozyd (chlorek 3,4,5,7-tetrahydroksy- -3,5-dimetoksyflawilu)	<i>in vitro</i>	bydłęce komórki śródbłonka aorty pozyskane z aorty klatki piersiowej	25 µM	(12)
	kurkumina (1,7-bis (4-hydroksy-3- -metoksyfenilo) hepta-1,6-dieno- -3,5-dion)	<i>in vitro</i>	linia komórek nowotworowych prostaty (PC-3)	15 µM	(2)
	apigenina (4,5,7-trihydroksyflawon)	<i>in vitro</i>	linia makrofagów mysich (RAW 264.7)	0,5-20 µM	(16)
	antocyjany wyizolowane z owoców borówki amerykańskiej (frakcja PC18)	<i>in vitro</i>	linia mysich komórek mikrogleju (BV-2)	100 µg/ml	(13)
	luteolina (3,4,5,7-tetrahydroksyflawon)	<i>in vitro</i>	komórki śródbłonka naczyń krwionośnych myszy	2 µM	(45)
	ekstrakt z pestek winogron	<i>in vitro</i>	RAW 264.7	65 µg/ml	(8)
	apigenina	<i>in vivo</i>	mysi model z wywołanym LPS ostrym urazem płucnym	20 mg/kg	(17)
genisteina (5,7-trihydroksyizoflawon)	<i>in vivo</i>	szczurzy model z indukowaną d-galaktozoaminą niewydolnością wątroby	5 mg/kg	(18)	
↓COX-2	kurkumina	<i>in vitro</i>	komórki tłuszczowe (adipocyty) (3T3-L1)	1-20 µM	(29)
	kempferol (5,7,4'-trihydroksyflawonol)	<i>in vitro</i>	fibroblasty (RASf)	100 µM	(30)
		<i>in vitro</i>	RAW 264.7	12,5-100 µg/ml	(31)
	ekstrakt z korzenia rzepty	<i>in vitro</i>	RAW 264.7	25, 50 i 100 µg/ml	(32)
	kurkumina	<i>in vivo</i>	komórki nabłonkowe nosa (HNEC)	0,1-10 µg/ml	(28)
ekstrakt z jabłek	<i>in vivo</i>	szczurzy model z wywołanym stanem zapalnym żołądka	10 ⁻⁴ M	(27)	
↓iNOS	delfinidyna (3,3',4',5,5',7- -heksahydroksyflawylum)	<i>in vitro</i>	RAW 264.7	100 µM	(40)
	ekstrakt z pestek winogron	<i>in vitro</i>	RAW 264.7	10-65 µg/ml	(8)
	ekstrakt z korzenia morwy	<i>in vitro</i>	RAW 264.7	10-50 µg/ml	(41)
	ekstrakt z owoców malin	<i>in vitro</i>	RAW 264.7	150 i 200 µg/ml	(42)
	ekstrakt z oliwy z oliwek	<i>in vitro</i>	RAW 264.7	25 i 50 µg/ml	(43)
	ekstrakt z miodu	<i>in vitro</i>	N13	0,5 i 1 µg/ml	(44)
	delfinidyna	<i>in vivo</i>	mysi model z wywołanym LPS obrzękiem	15 µM/kg	(40)

malin właściwych, który w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ powodował inhibicję NO do 69,34%, zaś w stężeniu 200 $\mu\text{g/ml}$ do 98,84% w porównaniu z kontrolą. Oceniono także wpływ tego ekstraktu (150 i 200 $\mu\text{g/ml}$) na ekspresję iNOS jako podstawowego regulatora NO oraz COX-2. Poziom ekspresji obu genów podwyższony przez LPS i IFN- γ został zahamowany przez ekstrakt z malin właściwych, w sposób zależny od stężenia, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka.

Ekstrakt bogaty w polifenole pozyskany z oliwy z oliwek (*Olea europaea* L.) również hamował uwalnianie NO w makrofagach mysich aktywowanych przez LPS (5 $\mu\text{g/ml}$) (43). Ekstrakt użyty w stężeniach 25 i 50 $\mu\text{g/ml}$ spowodował obniżenie ekspresji iNOS (o ok. 50%), a w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ również obniżenie ekspresji COX-2 i blokowanie degradacji I κ B α , która związana jest ze wzrostem aktywności NF- κ B i jego translokacji do białka p65. Zatem ograniczenie odpowiedzi zapalnej przez hamowanie syntezy NO było związane z blokowaniem ekspresji iNOS i COX-2 przez ścieżkę sygnałową NF- κ B. Działanie przeciwzapalne w badaniach na komórkach N13 wykazał ekstrakt pozyskany z miodu, bogaty we flawonoidy, takie jak luteolina, kwercetyna, apigenina, kemferol czy chryzyna (44). Zastosowanie ekstraktu w komórkach N13 ograniczyło indukowaną przez

LPS ekspresję iNOS zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, w sposób zależny od stężenia. Ekspresja tego genu uległa zahamowaniu o 80% w stosunku do kontroli po zastosowaniu ekstraktu w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$. Użyty ekstrakt hamował również ekspresję TNF- α i IL-1 β na poziomie mRNA.

Działanie przeciwzapalne polifenoli i ekstraktów bogatych w te związki zostało podsumowane w tabeli 1.

Podsumowanie

Przedmiotem intensywnych badań ostatnich lat są prozdrowotne efekty diety bogatej w związki polifenolowe, zmniejszające ryzyko wystąpienia chorób zapalnych. Zaprezentowane w pracy wyniki badań na modelach *in vitro* i *in vivo* wskazują na wysoką aktywność przeciwzapalną zarówno polifenoli, jak i ich ekstraktów, czyniąc z tych związków coraz bardziej docenianą alternatywę dla syntetycznych leków przeciwzapalnych. W przyszłości może doprowadzić to do wykorzystania polifenoli i ekstraktów bogatych w te związki w zapobieganiu, jak i w terapii przeciwzapalnej.

Praca finansowana z działalności statutowej Zakładu Biochemii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (503/1-156-04/503-01).

Piśmiennictwo

- Valko M, Leibfritz D, Moncol J i wsp. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:44-84.
- Killian PH, Kronski E, Michalik KM i wsp. Curcumin inhibits prostate cancer metastasis *in vivo* by targeting the inflammatory cytokines CXCL1 and -2. *Cancerogenesis* 2012; 33:2507-19.
- Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol* 2006; 71:1397-421.
- Ammar-el SM, Gameil NM, Shawky NM i wsp. Comparative evaluation of anti-inflammatory properties of thymoquinone and curcumin using an asthmatic murine model. *Int J Immunopharmacol* 2011; 11:2232-6.
- Park MH, Hong JT. Roles of NF- κ B in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches. *Cells* 2016; 5(2):15.
- Mincheva-Tasheva S, Soler RM. NF- κ B signaling pathways: role in nervous system physiology and pathology. *Neuroscientist* 2013; 19:175-94.
- Karin M. NF- κ B as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1(5):a000141. DOI: 10.1101/cshperspect.a000141.
- Terra X, Valls J, Vitrac X i wsp. Grape-seed procyanidins act as anti-inflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NF κ B signaling pathway. *J Agric Food Chem* 2007; 55:4357-65.
- Cottam DR, Mattar SG, Barinas-Mitchell E i wsp. The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes Surg* 2004; 14:589-600.
- Cheng TO. All teas are not created equal: the Chinese green tea and cardiovascular health. *Int J Cardiol* 2006; 108:301-8.
- Bae Y, Lee S, Kim SH. Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor- κ B. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 254:56-64.
- Romier B, Van De Walle J, During A i wsp. Modulation of signalling nuclear factor-kappaB activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells. *Br J Nutr* 2008; 100:542-51.
- Lau FC, Josepha JA, McDonald JE i wsp. Attenuation of iNOS and COX2 by blueberry polyphenols is mediated through the suppression of NF- κ B activation. *J Funct Foods* 2009; 1:274-83.
- Paixao J, Dinis TC, Almeida LM. Malvidin-3-glucoside protects endothelial cells up-regulating endothelial NO synthase and inhibiting peroxynitrite-induced NF- κ B activation. *Chem Biol Interact* 2012; 199:192-200.
- Mito S, Watanabe K, Harima M i wsp. Curcumin ameliorates cardiac inflammation in rats with autoimmune myocarditis. *Biol Pharm Bull* 2011; 34:974-9.
- Liang YC, Huang YT, Tsai SH i wsp. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by

- apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 1999; 20:1945-52.
17. Wang J, Liu YT, Xiao L i wsp. Anti-inflammatory effects of apigenin in lipopolysaccharide-induced inflammatory in acute lung injury by suppressing COX-2 and NF- κ B pathway. *Inflammation* 2014; 37:2085-90.
 18. Ganai AA, Khan AA, Malik ZA i wsp. Genistein modulates the expression of NF- κ B and MAPK (p-38 and ERK1/2), thereby attenuating d-Galactosamine induced fulminant hepatic failure in Wistar rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 283:139-46.
 19. Karlsen A, Retterstol L, Laake P i wsp. Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappaB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *J Nutr* 2007; 137:1951-4.
 20. Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68:165-75.
 21. Schwab JM, Schluesener HJ, Meyermann R i wsp. COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 69:339-43.
 22. Shalini V, Pushpan CK. Tricin, flavonoid from Njavara reduces inflammatory responses in hPBMCs by modulating the p38MAPK and PI3K/Akt pathways and prevents inflammation associated endothelial dysfunction in HUVECs. *Immunobiology* 2016; 221:137-44.
 23. Olejnik A, Tomczyk J, Kowalska K i wsp. Antocyjany w chemoprewencji nowotworu jelita grubego. *Post Fitoter* 2009; 3:180-8.
 24. Farzaei MH, Abdollahi M, Rahimi R. Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer. *World J Gastroenterol* 2015; 21:6499-517.
 25. Pairet M, Engelhardt G. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundam Clin Pharmacol* 1996; 10:1-17.
 26. Vanamala J, Reddivari L, Radhakrishnan S. Resveratrol suppresses IGF-1 induced human colon cancer cell proliferation and elevates apoptosis via suppression of IGF-1R/Wnt and activation of p53 signaling pathways. *BMC Cancer* 2010; 10:238. DOI: 10.1186/1471-2407-10-238.
 27. D'Argenio G, Mazzone G, Tuccillo C i wsp. Apple polyphenol extracts prevent aspirin-induced damage to the rat gastric mucosa. *Br J Nutr* 2008; 100:1228-36.
 28. Obata K, Kojima T, Masaki T i wsp. Curcumin prevents replication of respiratory syncytial virus and the epithelial responses to it in human nasal epithelial cells. *Plos One* 2013; 8(9):e70225. DOI: 10.1371/journal.pone.0070225.
 29. Gonzales AM, Orlando RA. Curcumin and resveratrol inhibit nuclear factor-kappaB-mediated cytokine expression in adipocytes. *Nutr Metab (Lond)* 2008; 5:17.
 30. Yoon HY, Lee EG, Lee H i wsp. Kaempferol inhibits IL-1 β -induced proliferation of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and the production of COX-2, PGE2 and MMPs. *Int J Mol Med* 2013; 32:971-7.
 31. Kim SK, Kim HJ, Choi SE i wsp. Anti-oxidative and inhibitory activities on nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (COX-2) production of flavonoids from seeds of *Prunus tomentosa* Thunberg. *Arch Pharm Res* 2008; 31:424-8.
 32. Shin JS, Yun CH, Cho YW i wsp. Indole-containing fractions of *Brassica rapa* inhibit inducible nitric oxide synthase and pro-inflammatory cytokine expression by inactivating nuclear factor-kappaB. *J Med Food* 2011; 14:1527-37.
 33. Leyva-López N, Nair V, Bang WY i wsp. Protective role of terpenes and polyphenols from three species of *Oregano* (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. *J Ethnopharmacol* 2016; 187:302-12.
 34. Kankuri E, Hämäläinen M, Hukkanen M i wsp. Suppression of pro-inflammatory cytokine release by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in mucosal explants from patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38:186-92.
 35. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 2007; 15:252-9.
 36. Holt EM, Steffen LM, Moran A i wsp. Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents. *J Am Diet Assoc* 2009; 109:414-21.
 37. Szabo C, Ohshima H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide* 1997; 1:373-85.
 38. Schroeder P, Zhang H, Klotz L i wsp. (-)-Epicatechin inhibits nitration and dimerization of tyrosine in hydrophilic as well as hydrophobic environments. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289:1334-8.
 39. Brossette T, Hundsdörfer C, Kröncke KD i wsp. Direct evidence that (-)-epicatechin increases nitric oxide levels in human endothelial cells. *Eur J Nutr* 2011; 50:595-9.
 40. Sogo T, Terahara N, Hisanaga A i wsp. Anti-inflammatory activity and molecular mechanism of delphinidin 3-sambubioside, a *Hibiscus* anthocyanin. *Biofactors* 2015; 41:58-65.
 41. Eo HJ, Park JH, Park GH i wsp. Anti-inflammatory and anti-cancer activity of mulberry (*Morus alba* L.) root bark. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14:200.
 42. Li L, Wang L, Wu Z i wsp. Anthocyanin-rich fractions from red raspberries attenuate inflammation in both RAW 264.7 macrophages and a mouse model of colitis. *Sci Reports* 2014; 4:6234. DOI: 10.1038/srep06234.
 43. Cárdeno A, Sánchez-Hidalgo M, Aparicio-Soto M i wsp. Extra virgin olive oil polyphenolic extracts down regulate inflammatory responses in LPS-activated murine peritoneal macrophages suppressing NF- κ B and MAPK signalling pathways. *Food Funct* 2014; 5:1270-7.
 44. Candiracci M, Piatti E, Dominguez-Barragán M i wsp. Anti-inflammatory activity of a honey flavonoid extract on lipopolysaccharide-activated N13 microglial cells. *J Agric Food Chem* 2012; 60:12304-11.
 45. Jia Z, Nallasamy P, Liu D i wsp. Luteolin protects against vascular inflammation in mice and TNF-alpha-induced monocyte adhesion to endothelial cells via suppressing I κ B α /NF- κ B signaling pathway. *J Nutr Biochem* 2015; 26:293-302.

Konflikt interesów**Conflict of interest**

Brak konfliktu interesów
None

otrzymano/received: 14.10.2016

zaakceptowano/accepted: 23.11.2016

Adres/address:

*dr hab. n. med. Urszula Lewandowska
Zakład Biochemii, Wydział Lekarski

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

tel. +48 (42) 272-57-14

e-mail: urszula.lewandowska@umed.lodz.pl