

Válasz Prof. Dr. Zupkó István az MTA doktora cím elnyerése érdekében benyújtott pályázatom bírálataira

Tisztelt Professzor Úr!

Elsősorban szeretném kifejezni hálámat és nagyrabecsülésem az MTA doktori értekezésem körültekintő, magas színvonalú és szakszerű értékeléséért, valamint a támogató szemléletért. Külön köszönöm, hogy munkámat alkalmasnak találta a nyilvános vitára. Az alábbiakban részletes választ adok a felvetett formai és tartalmi észrevételekre és kérdésekre.

1. A jelölt a görögszéna hatóanyagaként jelöli meg a 4-hidroxi-izoleucint a bevezetésben (22. old.), jöllehet az „egy növény – egy hatásért felelős tartalomanyag” elv nem tartható. A görögszéna az említett aminosav mellett tartalmaz többek között alkaloidokat, szteroid szaponinokat és flavonoidokat (Singh N et al. Food Biosci 46: 101546 (2022), doi: 10.1016/j.fbio.2022.101546).

Válasz:

A *Trigonella foenum-graecum* (görögszéna) farmakológiai hatásai a növény rendkívül összetett és gazdag fitovegyület profiljából erednek, amelyek komplex módon képesek modulálni a lipid- és glükózanyagcserét, a gyulladásos mediátorok szintjét, valamint az oxidatív stressz folyamatait¹. E tulajdonságok indokolják a görögszéna alkalmazását metabolikus és kardiovaszkuláris megbetegedések, különösen a 2-es típusú diabetes mellitus (T2DM), inzulinrezisztencia és endothel diszfunkció prevenciójában és kiegészítő kezelésében. A közelmúltban továbbá daganatellenes, hepatoprotektív és neuroprotektív hatásokat is dokumentáltak¹⁻³, amelyek még inkább növelik a növény terápiás jelentőségét.

Valóban, a szakirodalom alapján világosan körvonalazódik, hogy a görögszéna élettani hatásai nem vezethetők vissza egyetlen izolált hatóanyagra. A növény maga számos bioaktív komponenst tartalmaz, köztük szteroid szaponinokat (pl. dioszenin), flavonoidokat (pl. kvercetin), alkaloidokat (pl. trigonellin), vízdékony rostokat (pl. galaktomannán), valamint nem standard aminosavakat, mint például a 4-hidroxi-izoleucint (4-HIL)^{1, 4}. Fontos hangsúlyozni, hogy a fitofarmakológiai aktivitás valóban nem értelmezhető az „egy növény – egy hatóanyag – egy hatás” redukcionista modell szerint. A növényi eredetű készítmények hatásmechanizmusait sokkal inkább a hatóanyagok közötti szinergizmus, potencírozás alakítja, amely komplex polifarmakológiai és interakciós rendszert eredményez, amit „shotgun effektus”-ként is szoktak említeni, ami azt jelenti, hogy egy növényi kivonat sokféle hatóanyagot tartalmaz, amelyek egyszerre több célpontra hatnak.

A tisztelt bíráló észrevételével összhangban a dolgozat nem a 4-HIL kizárólagos vagy domináns szerepét kívánta hangsúlyozni, hanem azt a szándékot tükrözi, hogy e komponens ismerete, különös tekintettel a glükózfüggő inzulinszekréció fokozására és a PI3K/Akt útvonal aktiválására⁵, hozzájárul a növény általános metabolikus hatásprofiljának jobb megértéséhez. Hasonlóképpen, a dioszenin több kutatás alapján is képes önálló farmakológiai hatás

kifejtésére, különösen a lipidprofil javítása, az inzulinérzékenység fokozása, illetve a gyulladásos és oxidatív stressz válaszok mérséklése terén⁶⁻⁸. Ennek ellenére saját *in vivo* kísérletes eredményeink azt mutatják, hogy a dioszgenin hatásai dóziszfüggők, és nem minden esetben fedik le a teljes görögyszéna magkivonattal elért hatásokat.

2. A szerző a rezveratrol hatásait pravasztatinnal kombinációban is vizsgálta, a pravasztatint azonban csak a módszertani leírásban említi (33. old.). A későbbiekben – az eredmények bemutatásakor és azok diszkussziójában – csak statinként, ill. több alfejezetcímben „Resveratrol és statinok hatása-ként hivatkozik a kezelésre. A sztatink között jelentős farmakológiai eltérések vannak, így nem célszerű az ilyen általánosítás. Az Eredmények II. alfejezeteinek címei megtévesztőek, mivel csak egy sztatín-típusú hatóanyagot alkalmaztak.

Válasz:

A statinok között jelentős farmakológiai különbségek állnak fenn, így a bíráló által említett általánosítás valóban félrevezető lehet. A pravastatin hidrophil karakterű, alacsonyabb LDL-csökkentő potenciállal bíró molekula, amely minimálisan metabolizálódik a CYP-enzimrendszeren keresztül, és viszonylag kevés gyógyszerkölesönhatással rendelkezik. Ezek a farmakokinetikai és farmakodinámiai sajátosságok érdemben eltérnek más – különösen a lipofil – statinokétól, így az eredmények általános statin hatásként való értelmezése nem teljesen helyes.

A statinok kémiai tulajdonságaik alapján két fő csoportra oszthatók: lipofil és hidrophil vegyületek. A csoportok közötti különbségek befolyásolják a hatásait és mellékhatásait. A lipofil statinok, mint például az atorvastatin, a simvastatin és a lovastatin, könnyen bejuthatnak a májon kívüli szövetekbe, így a perifériás szövetekben, például az izmokban is megjelenhetnek. Ennek következményeként ezek a statinok nagyobb vázizom mellékhatások kockázatával járnak, mivel a hatóanyagok felhalmozódhatnak a szövetekben⁹. Ezen gyógyszerek hatékonysága és lipidcsökkentő hatása nagy, de pl. myopathia nagyobb arányban jelentkezik. Ezzel szemben a hidrophil statinok, mint a rosuvastatin és az általunk is vizsgált pravastatin, szelektívebbek a májra, így kevesebb extrahepatikus mellékhatással járnak és ezért biztonságosabbak. A statinok közötti különbségek másik fontos aspektusa azok potenciája, hogy milyen mértékben csökkentik az LDL-koleszterin szintet. A rosuvastatin a legmagasabb potenciájú statin, ami erőteljesebben csökkenti az LDL-szintet, mint például a szintén elég hatékony atorvastatin. Az atorvastatin és a simvastatin közepes potenciájú statinok, míg a pravastatin és a fluvastatin alacsonyabb potenciájúak¹⁰. A rosuvastatin 10 mg-os adagja körülbelül megegyezik az atorvastatin 20 mg-os adagjával, illetve a simvastatin 40 mg-jával az LDL-csökkentő hatás tekintetében. A különböző statinok közötti farmakodinámiai különbségek figyelembevételével fontos, hogy az egyes kezeléseknél az optimális dózist és farmakológiai profilokat mérlegeljük. A statinok metabolizmusa szintén jelentős eltéréseket mutat, ami alapvetően befolyásolhatja a gyógyszerkölesönhatások kockázatát. Az atorvastatin, simvastatin és lovastatin a CYP3A4 enzim által metabolizálódnak, így gyógyszerkölesönhatásokra érzékenyek. Különösen a makrolid antibiotikumok, az azol gombaellenes szerek és a grapefruitlé interakciói figyelhetők meg, amelyek erőteljesen

befolyásolhatják ezen gyógyszerek farmakokinetikai viselkedését, fokozhatják például a rhabdomyolysis kockázatát¹¹. Ezzel szemben a fluvastatin és a rosuvastatin főként a CYP2C9 enzimén keresztül metabolizálódnak, ami kisebb interakciós kockázatot hordoz. A pravastatin metabolizmusa minimális, ezért a legkevesebb gyógyszerinterakcióval rendelkezik, ami előnyös lehet azok számára, akik sokféle gyógyszert szednek. A statinok felezési ideje is jelentős mértékben eltér egymástól, ami befolyásolja az adagolásukat. A hosszú felezési idejű statinok, mint az atorvastatin (14 óra) és a rosuvastatin (19 óra), a nap bármely szakában adhatók, mivel a hatóanyag hosszú ideig a szervezetben marad^{12, 13}. Ezzel szemben a rövid felezési idejű statinokat, mint a simvastatin, lovastatin és fluvastatin, este célszerű bevenni, mivel a koleszterinszintézis főként éjszaka történik. A statinok többsége a májban metabolizálódik és epével ürül, azonban a pravastatin és rosuvastatin esetében a vesék is jelentős szerepet játszanak a gyógyszer kiürítésében⁹. A vesén keresztüli kiválasztódás növeli annak esélyét, hogy ezen statinok felhalmozódhatnak a szervezetben, így különös figyelmet kell fordítani a vese működésére a kezelés során.

Egyetértve a bíráló kritikájával, egyben köszönöm, hogy felhívta a figyelmemet erre a pontatlanságra. Valóban pontosabban kellett volna az alfejezet címeit fogalmazni. Helyesebb lett volna „a resveratrol és a pravastatin” kifejezések használata.

3. Több esetben szokatlan és nehézkes a szignifikanciát jelző markerek értelmezése. Pl. a 6. ábra szövegében: „†p<0,05 3., 4.,5., csoport vs 2. csoport”, ám a marker csak a 3. oszlopon szerepel. Ugyanezen ábra bal oldali részén nem szerepelnek statisztikai markerek, jóllehet a 2-5 csoportok adatai markánsan eltérnek az egészséges állatok értékeihez viszonyítva.

Válasz:

Köszönöm az észrevételt. Valóban a †szignifikancia jelzés lemaradt a 4. illetve az 5. oszlopokról, csupán az ábramagyarázatban jelent meg. A bal oldali ábrán nem szerepelnek szignifikancia jelzések annak ellenére, hogy a statisztikai elemzés alapján elérték a szignifikancia szintet. Ennek oka, hogy ez csak reprezentatív ábraként lett besúrva, ahol a vércukor értékeket 5 nappal az STZ kezelést követően megmértük és összehasonlítottuk a kontroll állatokéval annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk a STZ kezelés hatékonyságáról. ≥ 300 mg/dl értékek esetén tekintettük az állatokat diabéteszesnek, ez alatt kizártuk az állatokat a kísérletből.

4. A szerző több alkalommal is statisztikailag nem szignifikáns eltéréseket tárgyal. Így pl. a noradrenalinra adott vaszkuláris válasz kapcsán a nem szignifikáns eltérés lehetséges okát is leírja (90. old.). Hasonló értelmezés olvasható a „BGP-15 hatása az endotél-függő vazorelaxációra” c. fejezetben (95. old.). Ezek nem felelnek meg annak az általánosan elfogadott farmakológiai alapelvnek, miszerint a beavatkozásnak csak akkor van értelmezhető hatása, ha az szignifikáns mértéket ér el.

Válasz:

A statisztikai elemzés célja – egészen leegyszerűsítve – az, hogy a vizsgálót (és olvasóit, illetve hallgatóságát) ne csaphassa be a látszat, és egy adekvát algoritmus mentén haladva minél megbízhatóbb választ kapjunk arra a kérdésre, hogy a csoportok közötti különbségek az általunk vizsgált körülményeknek (eleve meglevő eltéréseknek és/vagy kezeléseknél) tulajdoníthatók-e. A statisztikai elemzés eredményeinek maradéktalan közlése az eredmények bemutatásakor ehhez elégséges biztosítékot jelent. A nem szignifikáns eredmények interpretálása ugyanakkor bizonyos esetekben hasznos lehet, még ha természetesen sokkal kisebb súllyal is esnek latba a statisztikailag szignifikáns eredményekhez képest. Ennek oka, hogy a statisztikai szignifikancia és a biológiai jelentőség elválhatnak egymástól. Kellően nagy számú adat elemzésekor biológiai jelentéktelen különbségek is szignifikánssá válhatnak statisztikailag, míg kis számú adat birtokában biológiai nézőpontból potenciálisan (tehát esetlegesen) jelentőséggel bíró eltérések is lehetnek statisztikailag nem-szignifikánsak¹⁴. Az interpretáció során természetesen helyén kell kezelni a statisztikailag nem szignifikáns eredményeket (tehát mindig utalni kell hipotetikus voltukra), amit én is igyekeztem megtenni közleményeimben és a disszertációmban is. Egyetértek ugyanakkor a bírálóval a tekintetben, hogy ez félrevezető lehet és egy adott beavatkozásnak akkor van könnyen értelmezhető hatása, ha szignifikáns mértéket ér el. Szigorúan véve statisztikai értelemben valóban nincsen értelme tendenciáról beszélni, amennyiben a teszt által kimutatott különbség nem szignifikáns.

5. Mi indokolta, hogy eltérő ketamin/xilazin dózisokat alkalmaztak a meggyimagkivonattal és a medvehagyma liofilizátummal kezelt állatok esetében (43. old.)?

Válasz:

A ketamint gyógyszerkönyvi nevén (*Ketamini hydrochloridum*) 1962-ben Calvin Stevens fejlesztette ki és 1964-től kezdték el szélesebb körben alkalmazni az egészségügyben. A ketamin aril-cikloalkilamin szerkezetű vegyület, hasonlóan a fenciklidinhez (PCP). Előnyeként hamar megmutatkozott, hogy a PCP-hez képest jóval enyhébb személyiségbeli változásokat idéz elő. Magas dózisban rontja a memóriát, ami miatt fogyasztói gyakran váltak erőszak áldozatává. Széles körben alkalmazzák érzéstelenítő és fájdalomcsillapító hatása miatt, legyen szó humán gyógyászatáról vagy állatkísérletekről¹⁵.

Hatásmechanizmusát tekintve a ketamin az agykéregre és a limbikus rendszerre hat, az NMDA-receptorok use-dependens, nem kompetitív antagonistája. Gátolja a gerincvelő hátsó szarvában található neuronok központi szenzitizációját, ami fájdalomcsillapító hatásáért felelős. Ezen kívül negatív allosztérikus modulátora a nikotinos acetilkolin receptoroknak, gyenge agonistája a delta-, kappa- és mü-opioid receptoroknak, valamint dopamin D2-receptor antagonistája. Szintén gyenge antagonistája a muszkarinos acetilkolin receptorokon, és gátolja a dopamin, szerotonin és noradrenalin visszavételét¹⁶.

A xylazint 1962-ben fejlesztették ki Németországban. Már korán szembetűnő volt jelentős antihipertenzív és központi idegrendszeri hatása. Mivel túlzottan erős hipotenziót és bradycardiát idézett elő, az FDA emberi felhasználásra alkalmatlannak minősítette. Rekreatív hatásaira először 1979-ben figyeltek fel, amikor heroinnal keverve tabletták formájában került forgalomba a feketepiacon¹⁷. A xylazin arilaminotiazin-származék, szerkezete a clonidinéhoz hasonló. Nyugtató, fájdalomcsillapító és izomrelaxáns tulajdonságai miatt állatgyógyászatban széles körben alkalmazzák. Hatásmechanizmusát tekintve, hasonlóan a guanfacinhoz és a guanabenzhez, a xylazin a központi és perifériás alfa₂-receptorok agonistája. A preszinaptikus oldalon a noradrenalin kibocsátás gátlása révén csökkenti a szimpatikus aktivitást, aminek következménye a vérnyomás- és szívfrekvencia-csökkenés. Az echocardiográfia során a xylazin szimpatikus tónust csökkenő hatását használjuk ki.

Xu és munkatársai vizsgálták a ketamin/xylazin kombináció különböző dózisainak hatásait az echokardiográfiás paraméterekre. Az eredmények azt mutatták, hogy önmagában ketamin alkalmazása, illetve az alacsony dózisú ketamin–xylazin kombináció stabil és biztonságos állapotot biztosított, ugyanakkor csak rövid, körülbelül 20 perces anesztéziás időt eredményezett. Ezek mellett a szívfrekvencia magasabb értékeket mutatott, mint a nagyobb dózisú ketamin–xylazin kombináció esetében, mely utóbbi hosszabb és stabilabb anesztéziát váltott ki. A legalacsonyabb szívfrekvenciát a legmagasabb kombinációs dózissal mérték, míg a legmagasabb értéket az 50 mg/kg ketamin – 2,5 mg/kg xylazin kombináció eredményezte. A legnagyobb kombinációs dózis mellett majdnem a legalacsonyabb frakcionális rövidülést és a legnagyobb végdiasztolés bal kamra belső átmérőt produkálta. Az emelkedő kombinációs dózis az anesztézia fokozatos meghosszabbodását is eredményezte. Érdekes megfigyelés volt, hogy az 50 mg/kg ketamin – 2,5 mg/kg xylazin kombináció kisebb bal kamra dilatációt okozott, mint a 100 mg/kg ketamin – 2,5 mg/kg xylazin kombináció. A 100 mg/kg ketamin és emelkedő xylazin dózisok (0,5–10 mg/kg) fokozatosan növelték a frakcionális rövidülést, ugyanakkor a végdiasztolés bal kamra belső átmérője is emelkedett. A ketamin és xylazin kombinációja során a xylazin közvetlenül depressziálja a szívfunkciót és gátolta a ketamin májbeli metabolizmusát, ezáltal elnyújtva annak pozitív inotróp hatását¹⁸.

Mivel minden egyes állattörzs rendelésekor optimalizáljuk az altatási protokollt, az inkriminált különbség ebből adódott. Számunkra az egyik legfontosabb paraméter az EF és FS mellett az E/A arány. Az E és A hullám szétválása nagyon érzékeny az alkalmazott altatási protokollra, ezért minden egyes kísérletsorozat elején beállítjuk az adott állatok esetében a legjobb kombinációt (elsősorban a dyastolés paraméterekre optimalizálva). Az exterminalálás során mindig ki kell választanunk azt a dózist, ahol minden állatnál elérjük a szedációhoz szükséges mennyiséget, és ez a medvehagyma vizsgálataiba vont állatok esetében dózisemelést kívánt, amit a szigorú állatvédelmi törvények és etikai szabályzat miatt meg is kellett valósítanunk. Megjegyzendő, hogy a suboptimális dózis mellett kiváltódó védekező reflexek rontják a toracotomia pontosságát is. Fontos hangsúlyozni, hogy önmagában nem jelent problémát, ha két különböző kísérlet eltérő altatási protokollt alkalmaz, de egy adott vizsgálaton belül végig ugyanazt az altatószer-kombinációt kell használni annak érdekében, hogy minden állatra azonos kísérleti feltételek teljesüljenek.

6. Mértékegység nélküli adatok szerepelnek a medvehagyma liofilizátum szérumszámjegyekre kifejtett hatását bemutató fejezetben (84-85. old.), ill. a 3. táblázatban. Ez azért is zavaró, mert a prezentált lipidológiai paraméterek mg/dl-ben és moláris koncentrációban is fellelhetők a szakirodalomban. Ugyanezen részben a szerző azt írja, hogy „a HDL nyolc nagyságrenddel volt magasabb a HC, és hat nagyságrenddel a HCT csoportban a kezeltellen kontroll nyulak plazmaszintjeihez viszonyítva”. A táblázat adataiból viszont kitűnik, hogy valójában nyolcszoros és hatszoros különbségekről van szó.

Válasz:

A laboratóriumi paraméterek mértékegységei az EFLM (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) által javasolt SI-rendszer szerint kerültek megadásra, összhangban az európai klinikai laboratóriumi gyakorlat szabványaival. Sajnálatos módon a mértékegységek lemaradtak a táblázatból, illetve hozzá tartozó magyarázó szövegből. A táblázat paraméterei mértékegységekkel megadva az alábbiak:

Csoport	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	ApoA (g/L)	ApoB (g/L)
Kontroll	0,7929±0,066 85	0,23±0,02259	0,5231±0,04498	0,04231±0,00 5083	0,01538±0,003323
HC	26,37±3,663 ^{*,#}	23,55±3,032 ^{*,#}	4,427±0,6562 [*]	0,02222±0,00 2778 ^{*,#}	0,28±0,06349 ^{*,#}
HCT	20,03±1,947 ^{*,*}	17±1,942 ^{*,**}	3,314±0,3686 [*]	0,056±0,0084 59 ^{**}	0,1718±0,01920 ^{*,**}
	TG (mmol/L)	CRP (mg/L)	GOT (U/L)	LDH (U/L)	CK (U/L)
Kontroll	0,7877±0,035 34	0,1±0,01387	29,67±2,895	726,4±170,7	4213±623,2
HC	1,367±0,3354	0,7278±0,361 7 [*]	48,8±16,22 [*]	791,9±325,4	4955±1353
HCT	1,052±0,3391	0,5958±0,231 1	24,91±2,708 ^{**}	316,6±37,17 [*]	2851±600,8 ^{**}

3. táblázat. A szérumszámjegyek analízise.

Rövidítések: TC: össz koleszterin; LDL: alacsony denzitású lipoprotein-koleszterin; HDL: magas denzitású lipoprotein-koleszterin; ApoA: apolipoprotein A-I; ApoB: apolipoprotein B; TG: triglicerid; CRP: c-reaktív protein; GOT: glutamát-oxálacetát transzamináz; LDH: laktát dehidrogenáz; CK: kreatin-kináz. A * kontroll csoporthoz viszonyított, a ** a HC csoporthoz viszonyított, a # a HCT csoporthoz viszonyított szignifikáns különbséget jelöli (p<0,05).

A HDL értékekre vonatkozóan valóban elírás történt, és a táblázat adatai a helytállóak – valóban nem nagyságrendi különbségekről van szó, hanem csak 6, illetve 8-szoros eltérésekről. Köszönöm az észrevételt, amiből kitűnik, hogy a bíráló mennyire alaposan bírálta a dolgozatot.

7. A Western blot eredmények egy részében egy-egy átlagértékhez igen eltérő párhuzamosok tartoznak. Ilyen pl. a 28. ábrán a hemoxigenáz-1 (HO-1) expressziója a kivonattal kezelt iszkémia/reperfúziós csoportban, vagy a 30. ábrán szintén a HO-1 a HC csoportban.

Párhuzamos mérések eredményeinek ilyen mértékű eltérése kérdésessé teszi az adott kísérlet reprodukálhatóságát.

Válasz:

Köszönöm az észrevételt, a kérdés megválaszolásához néhány gyakorlati információval szolgálnék. Annak érdekében, hogy a kapott intenzitás, tehát a fehérje expressziója, ezáltal a különböző minták bemérése arányos legyen, szükséges az azonos, összes fehérje koncentráció bemérése minden mintában. Ezt elsősorban az izolátum összfehérje koncentrációjának meghatározásával érjük el, melyre a bicinchoninsavas (BCA) meghatározást használunk, emellett eredményeinket egy háztartási fehérje expressziójának mértékével ellenőrizzük és normalizáljuk. Az eredmények normalizálására több módszer áll rendelkezésünkre, jelen esetben is az egyik abszolút értékre, a másik relatív értékre lett normalizálva. Annak ellenére, hogy egyre több szakvélemény születik a háztartási fehérjéről, mely szerint expressziójuk sejttípusonként, illetve különböző környezeti hatásokra (pl. hypoxia, diabétesz) változhat¹⁹⁻²², továbbra is elfogadott módszernek számít a Western blot eredmények kiértékelésénél a rájuk történő normalizálás. Jelen esetben a normalizált érték a vizsgálandó fehérjéhez tartozó pixel intenzitása és az ugyanazon mintán vizsgált háztartási fehérje előhívásából kapott pixel intenzitás hányadosa. Így valóban egy szemikvantitatív, mértékegység nélküli értékkel számolunk, ami jelentős mértékben különbözhet az alkalmazott kiértékelési módszertől függően.

A jelen disszertációban a citoszolikus fehérjék normalizálásához gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenázt (GAPDH, 36 kDa) használtunk, ami a glikolízis sebességmeghatározó lépéséért felel; a mitokondriális fehérjék normalizálásához pedig COX IV-et (17 kDa), ami a citokróm c oxidáz konstitutív alegysége. Itt fontos azt is elmondani, hogy a háztartási fehérjék használata az egyes szövetekben különböző lehet. A 28. és 30. ábrán látható Western blot előhívásból származó képek csupán egy eredmény, melyet önkényesen választottunk ki a többi közül, illusztrációként. Az valóban igaz, hogy a HO-1-re vonatkoztatva lehetett volna választani olyan felvételt, ahol a pixelintenzitások közelebb vannak egymáshoz.

Azonban azt is fontos megemlíteni, hogy az egér, patkány és humán mintákhoz képest a nyúl Western blot technikája nagyon nehézkes a kevésbé specifikus antitestek miatt (sokszor csak poliklonális antitestek állnak rendelkezésünkre). A nagyobb szórásnak van egy olyan oka is, ami az állatok állapotához köthető: a magas koleszterin tartalmú diéta megviseli az állatokat. Ez a funkcionális vizsgálatoknál is megnyilvánul, izolált dolgozó szív esetén a vizsgálati rendszert teljes mértékben át kell állítani és például kisebb afterload beállításával dolgozni a beteg állatok esetében.

Mindezek alapján elmondható, hogy kutatócsoportunk a technikai reprodukálhatóság feltételeinek mindenben próbált megfelelni, melyek 4, illetve 6 minta átlagát mutatják a háztartási fehérjével végzett normalizálást követően. Az eredmények GraphPad Prism 5 szoftver segítségével voltak kiértékelve, Shapiro-Wilk teszt alapján normál eloszlást mutattak, az adatok statisztikai elemzéséhez Bonferroni-féle többszörös összehasonlító tesztet alkalmaztunk, amely lehetővé tette a csoportok közötti különbségek alapos értékelését. A

különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p értéke kisebb volt, mint 0,05. A nagy szórás egy olyan biológiai jellemzőt azonosít, amely jelentős egyéni függőségre utal. Ilyen körülmények között különösen hasznos a statisztikai értékelés, amely a lényeges eltéréseket képes azonosítani a nagy szórás dacára is. A szórás biológiai okainak vizsgálata külön tanulmányokat igényel, így ennek pontos okairól nincsenek objektív ismereteim, mint ahogy ezen drasztikusan változó paraméterek biológiai jelentőségének mélyreható elemzéséhez sem.

8. A nyúlak adott aterogén diéta kardiológiai hatásaival kapcsolatban tekintélyes szakirodalmi adatállomány áll rendelkezésre – pl. Talini E et al. *Atherosclerosis* 197: 346-354 (2008), doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.05.024 – így az Eredmények X fejezetben bemutatott eredmények egy része megerősítő jellegű.

Válasz:

Igen, a bemutatott eredmények egy része valóban megerősítő jellegű, hiszen igazolnunk kellett modellünk és ezzel együtt a kezelésünk hatékonyságát annak érdekében, hogy az adott szignáltranszdukciós útvonalat illeszteni tudjuk az atherosclerosis kinetikájához. Tanulmányunk legjelentősebb eredménye, hogy – ismereteink szerint elsőként – kimutattuk a PDE9A fokozott expresszióját hipercholesterinaemiás nyulak bal kamrai szövetmintáiban, atherosclerotikus környezetben. A PDE9A upregulációjához kapcsolódó kardiális (és kognitív) betegségek egyre nagyobb figyelmet kapnak, különösen mióta bebizonyosodott, hogy a PDE9 az agyi nátriuretikus peptid útvonal által is termelt cGMP szintjét szabályozza – ezzel még jelentősebb szerepet játszhat a szívelégtelenség kialakulásában, mint a PDE5.

Kísérletünk során a VASP és annak foszforilált formájának, a pVASP²³⁹-nek az expresszióját is vizsgáltuk. Az atherosclerotikus állatok miokardiális szövetében szignifikánsan emelkedett a nem foszforilált VASP szintje, ami más kutatások eredményeit is alátámaszthatja. Tudomásunk szerint azonban ez az első olyan tanulmány, amely atherosclerosis talaján kialakuló szívbetegség állatmodelljében emelkedett miokardiális VASP expresszióról számol be.

9. Nem világos, hogy mi indokolta egy aktív kezelést nem kapó Wistar patkány csoport bevonását a BGP-15 hatásának vizsgálatába, amikor a kezeléseket Goto-Kakizaki patkányokon végezték, és alkalmaztak ugyanilyen kontroll csoportot is. A két törzs között metabolikus különbségek jól ismertek a szakirodalomban. Zavaró, hogy az éhomi glükóz eredményeket mmol/l-ben adja meg a szerző (5. táblázat), ugyanakkor a módszertani részben mg/dl-ben adja meg a diabétesz határértékét (33. old.).

Válasz:

A Goto-Kakizaki (GK) patkány törzs egy stabil és öröklődő 2-es típusú diabéteszes modell, amit az 1970-es években Japánban (Sendai, Tohoku Egyetem) hoztak létre: glükóz-intoleranciát

mutató Wistar patkányokat szelektív tenyésztéssel, generációkon át párosítottak, így non obese formában alakult ki inzulinrezisztencia és β -sejt diszfunkció²³⁻²⁵. A saját kísérletsorozatunkban azért használtuk őket, mert össze kívántuk hasonlítani a Wistart (mint egészséges állatot) a beteg modellel annak érdekében, hogy a beteg modellünk mennyire előrehaladott állapotban van.

Az éhomi glükóz értékek közötti különbségeknek az az oka, hogy az újság kritériumainak meg kellett felelnünk a mértékegységek tekintetében, így a 33. oldalon bemutatott glükózértékeket az amerikai gyakorlatban alkalmazott conventional units szabványrendszer szerint, mg/dL mértékegységben adtuk meg (amely eltér az Európában elterjedt SI alapú mmol/L egységtől). Elképzelhető, hogy helyesebb lett volna a dolgozatban valamelyik szabványrendszert kiválasztani és azt végig követni, de az meg a közleményekkel való konfliktushoz vezetett volna.

10. Ellentmondásosnak tűnik a rezveratrol Akt foszforilációjára gyakorolt hatásának szöveges és grafikus bemutatása. A leírtak szerint a p-Akt szintjében a diabéteszes és nem diabéteszes csoport között nem mutatkozott statisztikailag különbség (58. old.), ugyanakkor az ide vonatkozó 9. ábra felső részén az 1. és 2. csoport között szignifikáns eltérés látható.

Válasz:

Köszönöm a nagyon alapos bírálaton alapuló észrevételt. Valóban ellentmondásos az ábra és a szövegben található magyarázat. A táblázatban szerepel helyesen a statisztikai szignifikancia. A diabéteszes és nem diabéteszes csoport között statisztikailag szignifikáns a különbség. Az elírás és diszkrepancia miatt elnézést kérek.

11. A 10. ábrán bemutatott eredmények értelmében a rezveratrol növeli a kezelt állatokban a VEGF expresszióját. Tekintettel arra, hogy a tumorterápia egyik korszerű eleme a VEGF gátlása, lát-e a jelölt onkológiai kockázatot a rezveratrol alkalmazásával kapcsolatban? Megítélése szerint felmerülhet-e kedvezőtlen interakció a rezveratrol és a VEGF-antagonisták között?

Válasz:

Az onkológiai, de akár más VEGF-függő betegségek esetén elsődlegesen a hypoxia indukált angiogenezis gátlása a cél (például bevacicumabbal), ezért felmerül a kérdés, hogy a resveratrol esetleg növeli-e a daganatok növekedését azáltal, hogy az eredményeink alapján a VEGF expressziója fokozódik. Lévé, hogy a resveratrol intenzíven kutatott természetes vegyület, számos tudományos publikáció áll rendelkezésre ezen kérdés megválaszolására²⁶. A resveratrol állatkísérletesen mind pro-²⁷, mind anti-angiogén hatásokat is kiválthat, de daganatos modellekben általában a VEGF-független tumorgátlás dominálja. Jelen tudásunk szerint

resveratrol bevitele (megfelelő dózisban) nem jár egyértelmű onkológiai rizikóval, és kifejezett kedvezőtlen interakció a VEGF-gátló terápiákkal sem ismert. A resveratrol potenciálisan kedvező hatású adjuváns a daganatellenes terápiákban: gátolja a tumorsejt proliferációt, angiogenezist és inváziót, miközben apoptózist indukál²⁸. Nem számoltak be olyan állatkísérletes eredményekről, amelyek arra utalnának, hogy resveratrol a VEGF-emelés révén fokozná a tumoros szövet méretének növekedését.

Ugyanakkor a kísérletünkben bemutatott pro-angiogén potenciál miatt elméletben érdemes figyelni a resveratrol dóziséra és a páciens állapotára: ha valakinél VEGF-gátló kezelés folyik, célszerű lehet orvosi konzultációt kérni a kiegészítő resveratrol használata előtt, azt eldöntendő, hogy a beteg állapota a VEGF-gátlóval monoterápiaként vagy resveratrollal kombinálva javítható-e jobban.

12. „A szerző a bromelain infarktus kiterjedésére és a miokardiális sejtpusztulás mértékére gyakorolt hatásának bemutatásakor szinonimaként használja a sejthalál és a szívizom apoptózisa kifejezéseket (18. ábra), jóllehet a modellezett miokardiális károsodáskor apoptózis és nekrosis egyaránt lejátszódik (Konstaninidis K et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 10.1161/ATVBAHA.111.224915 (2012), doi: 10.1161/ATVBAHA.111.224915).”

Válasz:

Teljes mértékben egyetértek a bíráló állításával. A terminális dezoxinukleotidil-transzferáz által közvetített dUTP nick end labeling (TUNEL) vizsgálat a DNS-törést a szabad 3'-hidroxilvégek fluoreszcens vagy kromogén jelölésével mutatja ki. Mivel a genomiális DNS-törések az apoptózis korai és késői szakaszában is előfordulnak, a TUNEL-festést továbbra is széles körben használják az apoptotikus sejthalál mérésére. Apoptózis során a DNS szabályozott módon, endonukleázok hatására fragmentálódik, ami pozitív TUNEL reakciót eredményez. A vizsgálat előnyei közé tartozik, hogy viszonylag könnyen elvégezhető, és a TUNEL-vizsgálati készletek széles körben elérhetők különböző alkalmazásokhoz, például az apoptózis egysejtes elemzéséhez sejtkultúrákban és szövetmintákban. A TUNEL assay a DNS fragmentációt detektálja, amely az apoptózis egyik jellemzője. A DNS láncok végén található szabad 3'-OH csoportokat jelöli meg fluoreszcens vagy kromogén módszerrel²⁹⁻³². Mindennek megfelelően, az ábrán pontosabb lett volna a sejthalál helyett az apoptózis kifejezés használata.

13. A jelölt az eredmények diszkussziójakor azt írja, hogy resveratrol „újabb terápiás lehetőséget jelenthet diabéteszes betegek klinikai kezelésében” (109. old.). Pontosan hogyan képzei a növényi vegyület beépítését a rutinszerű ellátásba? Ismer-e erre vonatkozó klinikai vizsgálatot?

Válasz:

A resveratrol preventív célú alkalmazása főként metabolikus szindróma, inzulinrezisztencia és prediabetes esetén merülhetne fel kiegészítő terápiaként. Emellett esetleg szerepet játszhatna időskori neurodegeneratív kórképek – például Alzheimer-kór – megelőzésében is. Kiegészítő kezelésként a jelenleg alkalmazott konzervatív kezelések mellett többféle krónikus betegség esetén jöhet szóba, úgymint 2-es típusú diabetes³⁴, vagy szív-érrendszeri megbetegedések, például az endothel funkció javítása, vagy az LDL-oxidáció mérséklése céljából³⁵. Számos betegséggel kapcsolatban folynak humán klinikai vizsgálatok a resveratrol terápiás potenciáljának feltárása végett, és bár a kutatási eredmények vegyesek, összességében ígéretesnek mondhatóak.

Kiemelendő, hogy Brasnyó és munkatársai igazolták a resveratrol inzulinérzékenységet javító hatását 2-es típusú diabeteses betegek körében, amelyet a jelátviteli útvonalak aktiválása is alátámasztott³⁶. Crandall és mtsai idősebb, inzulinrezisztens egyéneknél a glükóztolerancia javulását írták le resveratrol kiegészítő terápia esetén³⁷. Ugyanakkor egyes vizsgálatok, mint például Yoshino és mtsai posztmenopauzális nőknél végzett tanulmánya, nem mutattak metabolikus előnyöket egészséges populációban³⁸. Hasonlóképpen, Van der Made és munkacsoportja nem talált jelentős javulást a metabolikus és gyulladásos paraméterek tekintetében túlsúlyos egyéneknél^{39, 40}.

Egy másik fontos megfigyelés, hogy elhízott, metabolikus szindrómás férfiaknál a resveratrol a kalóriamegvonáshoz hasonló anyagcserejavító hatásokat idézett elő, például csökkentette a gyulladásos markereket és javította az inzulinérzékenységet⁴¹. Ugyanakkor jól kontrollált 2-es típusú cukorbetegségeknél a hatások kevésbé egyértelműek voltak, ami felveti a gyógyszerkölsönhatások lehetőségét egyéb antidiabetikumokkal, és további vizsgálatokat szorgalmaz⁴².

A kardiovaszkuláris hatásokra vonatkozó klinikai vizsgálatok azt mutatják, hogy a resveratrol javíthatja az endothel funkciót, például növelve az áramlás-mediált értágulatot⁴³, valamint 2-es típusú cukorbetegségeknél javította az agyi véráramlás szabályozását⁴⁴. Nagyobb populációkon végzett megfigyelések, mint például a PREDIMED tanulmány adatai, összefüggést mutattak a magasabb (táplálékkal bevitt) resveratrol-metabolit szintek és kedvezőbb kardiometabolikus paraméterek között⁴⁵. Ugyanakkor nem minden vizsgálat támasztotta alá ezeket az eredményeket, különösen metabolikus rizikófaktorok terén.

Policisztás ovárium szindrómában (PCOS) a resveratrol kedvező hormonális és metabolikus hatásokat váltott ki⁴⁶.

Egyéb indikációkban is ígéretes eredmények születtek: neurodegeneratív betegségekben (pl. Alzheimer-kór) a resveratrol csökkentette a neuroinflammációt és kedvező biomarker változásokat indukált⁴⁷, gyulladásos bélbetegségekben (colitis ulcerosa) pedig a gyulladásos markerek csökkenését és klinikai javulást figyeltek meg⁴⁸. Reumatoid arthritisben a resveratrol csökkentette a gyulladásos tüneteket és a betegség aktivitását⁴⁹.

Összességében a resveratrol, mint természetes eredetű polifenol, elsősorban antioxidáns, gyulladáscsökkentő és inzulinérzékenyítő tulajdonságai révén került az érdeklődés középpontjába. Ugyanakkor klinikai alkalmazása, illetve a rutinszerű ellátásba történő integrációja még kezdeti stádiumban van, és számos akadályt kell leküzdeni ahhoz, hogy terápiás szinten elfogadottá váljon. A leggyakrabban említett problémák közé tartozik kedvezőtlen farmakokinetikai profilja, különösen a gyenge biohasznosulás, az eltérő készítményekben fellelhető változó hatóanyag-tartalom, valamint a nem egységes dózisajánlások. Mindezek mellett a humán klinikai bizonyítékok száma és minősége egyelőre korlátozott. Fontos továbbá megemlíteni, hogy a resveratrol esetleges mellékhatásai, valamint gyógyszerkölsönhatásai több kutató szerint még nem teljeskörűen tisztázottak³³.

A jövőbeni klinikai alkalmazás feltételeként elsősorban egy korszerűen formulázott (jól felszívódó), fix, magas dózist tartalmazó készítmény kifejlesztése lenne kívánatos. E célra alkalmas lehet például liposzómás, nanogyöngyös vagy béta-ciklodextrines technológia. Ezt követően – hasonlóan a bioekvivalencia vizsgálatokhoz – elengedhetetlen lenne az AUC értékek monitorozása, azok határértékeinek jogszabály szerinti betartatása és ennek megfelelő ellenőrzése. A klinikai adatok arra engednek következtetni, hogy a resveratrol kiegészítő terápiaként, különösen metabolikus és kardiovaszkuláris betegségek esetén, hasznos lehet, de jelenleg további nagyobb, standardizált és hosszabb távú vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy milyen körülmények között és mely betegcsoportokban a leghatékonyabb, illetve hogyan lehet rutinszerűen beépíteni a klinikai gyakorlatba.

Végezetül szeretném ismételten megköszönni Professzor Úr átfogó, magas színvonalú munkáját és értékes észrevételeit, amelyek új szemléletet kínáltak számomra, és lehetőséget teremtettek a pályázatom tudományos mélységének, tartalmi minőségének és koherenciájának további erősítésére a későbbi pályafutásom során.

Felhasznált irodalom:

1. Visuvanathan T, Than LTL, Stanslas J, et al. Revisiting *Trigonella foenum-graecum* L.: Pharmacology and Therapeutic Potentialities. *Plants (Basel)* 2022; 11 20220529. DOI: 10.3390/plants11111450.
2. Fatima SN and Masood J. Fenugreek seeds attenuate thioacetamide induced liver damage. *Pak J Pharm Sci* 2021; 34: 933-942.
3. Moghadam FH, Vakili-Zarch B, Shafiee M, et al. Fenugreek seed extract treats peripheral neuropathy in pyridoxine induced neuropathic mice. *EXCLI J* 2013; 12: 282-290. 20130225.
4. Alu'datt MH, Rababah T, Al-Ali S, et al. Current perspectives on fenugreek bioactive compounds and their potential impact on human health: A review of recent insights into functional foods and other high value applications. *J Food Sci* 2024; 89: 1835-1864. 20240226. DOI: 10.1111/1750-3841.16970.

5. Jette L, Harvey L, Eugeni K, et al. 4-Hydroxyisoleucine: a plant-derived treatment for metabolic syndrome. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; 10: 353-358.
6. Kusano Y, Tsujihara N, Masui H, et al. Diosgenin Supplementation Prevents Lipid Accumulation and Induces Skeletal Muscle-Fiber Hypertrophy in Rats. *Journal of nutritional science and vitaminology* 2019; 65: 421-429. DOI: 10.3177/jnsv.65.421.
7. Gan Q, Wang J, Hu J, et al. The role of diosgenin in diabetes and diabetic complications. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2020; 198: 105575. 20191230. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105575.
8. Manivannan J, Barathkumar TR, Sivasubramanian J, et al. Diosgenin attenuates vascular calcification in chronic renal failure rats. *Molecular and cellular biochemistry* 2013; 378: 9-18. 20130220. DOI: 10.1007/s11010-013-1588-8.
9. Ward NC, Watts GF and Eckel RH. Statin Toxicity. *Circulation research* 2019; 124: 328-350. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312782.
10. Kheloussi S. Considerations in the approach to appropriate statin selection. *US Pharmacist* 2018; 43: 22-26.
11. Attardo S, Musumeci O, Velardo D, et al. Statins Neuromuscular Adverse Effects. *Int J Mol Sci* 2022; 23 20220728. DOI: 10.3390/ijms23158364.
12. Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacological Research* 2014; 88: 3-11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.03.002>.
13. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental & clinical pharmacology* 2005; 19: 117-125. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2004.00299.x.
14. Harlow L, Mulaik and Steiger J. *Harlow, L.L., Mulaik, S., & Steiger, J. (Eds.) (1997). What if there were no significance tests? Mahwah, NJ: Erlbaum. 1997.*
15. Radovanovic D and Pjevic M. [Ketamine: the past 30 years and its future]. *Medicinski pregleđ* 2003; 56: 439-445. DOI: 10.2298/mpns0310439r.
16. Sinner B and Graf B. Ketamine. *Handbook of experimental pharmacology* 2008; 182: 313-333. DOI: 10.1007/978-3-540-74806-9_15.
17. Reyes JC, Negron JL, Colon HM, et al. The emerging of xylazine as a new drug of abuse and its health consequences among drug users in Puerto Rico. *J Urban Health* 2012; 89: 519-526. DOI: 10.1007/s11524-011-9662-6.
18. Xu Q, Ming Z, Dart A, et al. Optimizing dosage of ketamine and xylazine in murine echocardiography. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 2007; 34: 499-507. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2007.04601.x.
19. Taylor SC, Berkelman T, Yadav G, et al. A defined methodology for reliable quantification of Western blot data. *Mol Biotechnol* 2013; 55: 217-226. DOI: 10.1007/s12033-013-9672-6.

20. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of biotechnology* 1999; 75: 291-295. DOI: 10.1016/s0168-1656(99)00163-7.
21. Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, et al. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports* 2017; 27: 4-25. 20160605. DOI: 10.1111/sms.12702.
22. Li R and Shen Y. An old method facing a new challenge: re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life sciences* 2013; 92: 747-751. 20130227. DOI: 10.1016/j.lfs.2013.02.014.
23. Guest PC. Characterization of the Goto-Kakizaki (GK) Rat Model of Type 2 Diabetes. *Methods in molecular biology* 2019; 1916: 203-211. DOI: 10.1007/978-1-4939-8994-2_19.
24. Nagao M, Asai A, Eliasson L, et al. Selectively bred rodent models for studying the etiology of type 2 diabetes: Goto-Kakizaki rats and Oikawa-Nagao mice. *Endocr J* 2023; 70: 19-30. 20221207. DOI: 10.1507/endocrj.EJ22-0253.
25. Gimenes GM, Santana GO, Scervino MVM, et al. A short review on the features of the non-obese diabetic Goto-Kakizaki rat intestine. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 2022; 55: e11910. 20220822. DOI: 10.1590/1414-431X2022e11910.
26. Ren B, Kwah MX, Liu C, et al. Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives. *Cancer Lett* 2021; 515: 63-72. 20210528. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.05.001.
27. Fan D, Liu C, Guo Z, et al. Resveratrol Promotes Angiogenesis in a FoxO1-Dependent Manner in Hind Limb Ischemia in Mice. *Molecules* 2021; 26 20211212. DOI: 10.3390/molecules26247528.
28. Trapp V, Parmakhtiar B, Papazian V, et al. Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. *Angiogenesis* 2010; 13: 305-315. 20101007. DOI: 10.1007/s10456-010-9187-8.
29. Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW, et al. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: C1309-1318. 20021221. DOI: 10.1152/ajpcell.00353.2002.
30. Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, et al. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods in molecular biology* 2012; 887: 41-47. DOI: 10.1007/978-1-61779-860-3_5.
31. Kabakov AE and Gabai VL. Cell Death and Survival Assays. *Methods in molecular biology* 2018; 1709: 107-127. DOI: 10.1007/978-1-4939-7477-1_9.
32. Mirzayans R and Murray D. Do TUNEL and Other Apoptosis Assays Detect Cell Death in Preclinical Studies? *Int J Mol Sci* 2020; 21 20201129. DOI: 10.3390/ijms21239090.
33. Shaito A, Posadino AM, Younes N, et al. Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review. *Int J Mol Sci* 2020; 21 20200318. DOI: 10.3390/ijms21062084.

34. Mahjabeen W, Khan DA and Mirza SA. Role of resveratrol supplementation in regulation of glucose hemostasis, inflammation and oxidative stress in patients with diabetes mellitus type 2: A randomized, placebo-controlled trial. *Complement Ther Med* 2022; 66: 102819. 20220301. DOI: 10.1016/j.ctim.2022.102819.
35. Singh AP, Singh R, Verma SS, et al. Health benefits of resveratrol: Evidence from clinical studies. *Med Res Rev* 2019; 39: 1851-1891. 20190211. DOI: 10.1002/med.21565.
36. Brasnyo P, Molnar GA, Mohas M, et al. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *The British journal of nutrition* 2011; 106: 383-389. 20110309. DOI: 10.1017/S0007114511000316.
37. Crandall JP, Oram V, Trandafirescu G, et al. Pilot study of resveratrol in older adults with impaired glucose tolerance. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012; 67: 1307-1312. 20120104. DOI: 10.1093/gerona/glr235.
38. Yoshino J, Conte C, Fontana L, et al. Resveratrol supplementation does not improve metabolic function in nonobese women with normal glucose tolerance. *Cell metabolism* 2012; 16: 658-664. 20121025. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.09.015.
39. van der Made SM, Plat J and Mensink RP. Resveratrol does not influence metabolic risk markers related to cardiovascular health in overweight and slightly obese subjects: a randomized, placebo-controlled crossover trial. *PloS one* 2015; 10: e0118393. 20150319. DOI: 10.1371/journal.pone.0118393.
40. van der Made SM, Plat J and Mensink RP. Trans-Resveratrol Supplementation and Endothelial Function during the Fasting and Postprandial Phase: A Randomized Placebo-Controlled Trial in Overweight and Slightly Obese Participants. *Nutrients* 2017; 9 20170612. DOI: 10.3390/nu9060596.
41. Timmers S, Konings E, Bilet L, et al. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell metabolism* 2011; 14: 612-622. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.10.002.
42. Timmers S, de Ligt M, Phielix E, et al. Resveratrol as Add-on Therapy in Subjects With Well-Controlled Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Trial. *Diabetes care* 2016; 39: 2211-2217. 20161006. DOI: 10.2337/dc16-0499.
43. Wong RH, Howe PR, Buckley JD, et al. Acute resveratrol supplementation improves flow-mediated dilatation in overweight/obese individuals with mildly elevated blood pressure. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 2011; 21: 851-856. 20100731. DOI: 10.1016/j.numecd.2010.03.003.
44. Wong RH, Raederstorff D and Howe PR. Acute Resveratrol Consumption Improves Neurovascular Coupling Capacity in Adults with Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients* 2016; 8 20160712. DOI: 10.3390/nu8070425.
45. Zamora-Ros R, Urpi-Sarda M, Lamuela-Raventos RM, et al. High urinary levels of resveratrol metabolites are associated with a reduction in the prevalence of cardiovascular risk

factors in high-risk patients. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 2012; 65: 615-620. 20120323. DOI: 10.1016/j.phrs.2012.03.009.

46. Banaszewska B, Wrotyńska-Barczyńska J, Spaczynski RZ, et al. Effects of Resveratrol on Polycystic Ovary Syndrome: A Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Trial. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2016; 101: 4322-4328. 20161018. DOI: 10.1210/jc.2016-1858.

47. Turner RS, Thomas RG, Craft S, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. *Neurology* 2015; 85: 1383-1391. 20150911. DOI: 10.1212/WNL.0000000000002035.

48. Samsami-Kor M, Daryani NE, Asl PR, et al. Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol in Patients with Ulcerative Colitis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Pilot Study. *Archives of medical research* 2015; 46: 280-285. 20150520. DOI: 10.1016/j.arcmed.2015.05.005.

49. Khojah HM, Ahmed S, Abdel-Rahman MS, et al. Resveratrol as an effective adjuvant therapy in the management of rheumatoid arthritis: a clinical study. *Clin Rheumatol* 2018; 37: 2035-2042. 20180403. DOI: 10.1007/s10067-018-4080-8.

