

# RESVERATROL, PALMİTAT İLE İNDÜKLENEN ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ İNHİBE EDER: ANTI-APOPTOTİK ETKİ

## *Resveratrol Inhibits Palmitic Acid Induced Endoplasmic Reticulum Stres: Anti-Apoptotic Effect*

Aslı F. CEYLAN<sup>1</sup>, Sinem ASLAN ERDEM<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji A.D., Kırıkkale

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognози A.D., Ankara

### ÖZ

### ABSTRACT

**Giriş:** Endoplazmik retikulum (ER) stresin obezite patofizyolojisinde yeri bilinmesine karşın, obezite ile indüklenen kardiyovasküler hastalıklarda (ER) stresin rolü tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamız, doğal bir polifenolik bileşik olan resveratrolün H9c2 hücre dizisinde serbest yağ asidi olan palmitik asid (PA) ile indüklenen ER-stres üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

**Gereç ve Yöntem:** H9c2 hücre dizisi çeşitli konsantrasyon ve zaman aralıklarında PA ile inkübe edilerek, ER-stres oluşumu sağlanmıştır. Resveratrolün çeşitli konsantrasyonları kullanılarak, ER-stres yolağı ve bu yolağın indüklediği apoptotik yolak incelenmiştir.

**Bulgular:** PA doz ve süre bağımlı olarak ER-stres yolağını aktive etmiştir. Bu yolak, apoptotik bir yolağın da aktivasyonuna neden olmuştur. Resveratrol, PA ile indüklenen ER-stresi azaltmakla birlikte, apoptozu da inhibe etmiştir. Bununla birlikte, PA hücrel oksidatif stresin artmasına neden olurken, resveratrol antioksidan etkinlik sergilemiştir.

**Sonuç:** Sonuçlarımız, H9c2 hücrelerinde PA ile indüklenen ER-stresin azaltılmasında ve apoptozun inhibe edilmesinde resveratrolün etkili olduğunu göstermiştir.

**Introduction:** Endoplasmic reticulum (ER) stress is involved in the pathophysiology of obesity but little is known about the role of ER-stress on obesity-induced cardiovascular diseases.

**Material and Methods:** This study was designed to examine the effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on palmitic acid-induced ER-stress in H9c2 cell lines. ER-stress was induced by various concentration of PA in different time manner in H9c2 cell lines. Effects of resveratrol on ER-stress and apoptosis pathways were examined in this model.

**Results:** PA activated ER-stress pathway in a dose- and time-dependent manner. Indeed, apoptotic pathway was activated in the cells by PA. Resveratrol not only alleviated ER-stress but also inhibited apoptosis. On the other hand, PA increased oxidative stress in the cells which was alleviated by resveratrol.

**Conclusion:** Our results suggest that, resveratrol play a role in alleviating ER-stress and inhibiting apoptosis in H9c2 cell lines.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, endoplazmik retikulum stres, H9c2 hücre dizisi, palmitik asid, resveratrol

**Keywords:** Apoptosis, endoplasmic reticulum stress, H9c2 cell, palmitic acid, resveratrol



**Yazışma Adresi / Correspondence:** Dr. Aslı F. CEYLAN

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Yahşihan/Kırıkkale

**Telefon:** 0 318 333 5010/5782

**E-posta:** asliceylan@kku.edu.tr

**Geliş Tarihi / Received:** 17.08.2016

**Kabul Tarihi / Accepted:** 26.08.2016

## GİRİŞ

Kalp hastalıkları başlıca morbidite ve mortalite nedeni olarak gösterilmektedir (1,2) Yaş, cinsiyet, diyabet, insülin rezistansı, hipertansiyon ve obezite kardiyovasküler hastalıkların oluşmasında önemli risk etmenleri olarak gösterilmektedir (3,4). Son yıllarda artmış olan obez popülasyonu nedeniyle, obezite tüm bu etmenler içinde bir adım öne çıkmaktadır. Her ne kadar dislipidemi, hipertansiyon, insülin rezistansı ve kronik enflamasyon obezite ile indüklenen kardiyak komplikasyonlara katkıda bulsun da, patolojiden sorumlu asıl mekanizmalar hala saptanamamıştır.

Endoplazmik retikulum (ER), proteinlerin sentezi, paketlenmesi ve biraraya getirilmesinden sorumludur (5). Hücresel fonksiyonların devamı için ER'nin etkin bir biçimde çalışması gereklidir. ER homeostazının etkileyebilecek herhangi bir uyarı, hatalı proteinlerin ER lümeninde birikmesine neden olur ki bu durum ER-stres olarak tanımlanır (6,7). ER-stresin obezite, insülin rezistansı ve diyabet gibi pek çok hastalıkta artmış olması, ER-stresi azaltabilecek farmakolojik ajanların bu hastalıkların tedavisinde terapötik değerinin olabileceğini gündeme getirmiştir.

Resveratrol, kardiyoprotektif, anti-platelet ve antiinflamatuvar etkileri olduğu bilinen polifenolik bir bileşiktir (8,9). Resveratrol kaynaklı yararlı etkilerin oksidatif stresi azaltmasından kaynaklı olduğu belirtilmektedir (10). Yapılan çalışmalarda resveratrolün miyokardiyal apoptozu azalttığı, kardiyomiyositleri anoksik ortamdaki hasardan koruduğu ve antitümör etkisinin olduğu gösterilmiştir (11-13). Her ne kadar yapılan çalışmalarda resveratrolün yararlı etkileri gösterilmiş olsa da, bu etkilere ilişkin mekanizmalar aydınlatılmış değildir. Çalışmamızda resveratrolün H9c2 hücre dizilerinde, palmitik asitle indüklenen ER-stres üzerine olan etkilerinin araştırılması planlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

modifiye Eagle (DMEM), fetal sıgır serumu, antibiyotik karışımı ile diğer gerekli kimyasallar ATCC'den alınmıştır. Glutasyon ve glutasyon disülfid ve Kaspaz-3 aktivasyonu analizinde kullanılan kimsallar Sigma&Aldrich ve Fisher Scientific'ten sağlanmıştır. Western blot için kullanılan sarflar Bio-Rad'den, primer ve sekonder antikorlar ise Cell Signaling'ten sağlanmıştır. Palmitik asid ve resveratrol dimetil sülfoksit (%0.01) içinde çözüldükten sonra kullanılmıştır.

### Hücre Kültürü

H9c2 hücreleri %10 fetal sıgır serumu (SIGMA), 100 U/ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisin içeren Dulbecco's modifiye Eagle kültür ortamında, 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda kültüre edilmiştir. Hücreler, palmitik asid ile çeşitli konsantrasyon (0-5 mM) ve zaman aralıklarında (0-360 dk) inkübe edilerek, ER-stresin oluşabileceği konsantrasyon ve zaman aralığı saptanmıştır. Resveratrolün ER-stres üzerine olan etkilerinin saptanması amacıyla hücreler, palmitik asid varlığında, çeşitli konsantrasyon (0-10 mM) ve zaman aralıklarında (0-360 dk) resveratrolle inkübasyon yapılmıştır.

### Glutasyon ve Glutasyon Disülfid Analizi

Oksidatif stres göstergesi olarak glutasyon düzeyleri saptanmıştır. Hücreler 4 volümlük (w/v) %1 pikrik asid çözeltisi içinde homojenize edilmiş ve 16,000 xg'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant, total glutasyon (GSH) ve glutasyon disülfid (GSSG) konsantrasyonlarının saptanması için kullanılmıştır. GSH standart eğri kullanılarak saptanmış ve GSSG de 4-vinil piridin ile ölçümlenmiştir. GSSG değeri, GSH'den çıkarılarak, asıl GSH değeri elde edilmiştir.

### Kaspaz-3 Aktivasyonu

Kaspaz-3 aktivasyonu için hücreler PBS ile ön işleme tutulmuş ve 4°C'de 10,000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Homojenat, 100 µl'lik soğuk lizat tampon çözeltisi (50 mM HEPES, pH 7,4 %0,1 CHAPS, 1 mM ditiyothreitol, 0,1 mM EDTA, %0,1 NP40) ile işlenmiştir. Analiz, 96-kuyucuklu plate kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz çözeltisi (50 mM HEPES, %0,1 CHAPS, 100 mM NaCl, 10 mM DTT ve 1 mM EDTA), hücre lizatı ve kaspaz-3 kolorimetrik substrat Ac-DEVD-pNA içeren kuyucukar, 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra, 405 nm'de ölçümlenmiştir. Kaspaz-3 aktivitesi dakikada µg protein başına salınan pNA miktarı (pikomol) olarak verilmiştir.

### Western blot

H9c2 hücrelerindeki proteinler Western blot ile analiz edilmiştir. Bu deneyler için pH 6,8 olacak biçimde %4 SDS, 2 mM EDTA ve 50 mM Tris-HCl solüsyonu hazırlanarak hücreler homojenize edilmiştir. Homojenatlar 4°C'de 12000 x g'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatantlar ayrılmıştır. Protein kantifikasyonu Bradford yöntemi ile yapılmıştır. Eşit miktarlardaki proteinler %10'luk SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılmış, PVDF membranlara transfer edilmiş, Tris-tamponlu salin ile yıkanmış ve oda sıcaklığında 1 saat Tween-20'li Tris-tamponlu salin ile %5'lik süt tozu ya da %5'lik BSA ile bloke edilmiştir. Membranlar daha sonra uygun primer antikor çözeltisi ile 12 saat süresince 4°C'de ve sonrasında HRP ile konjüge sekonder antikorla 1 saat süresince oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Membranlar SuperSignal-enhanced kemilüminesen substrat solüsyonu (Pierce Chemical Company, Rockford, USA) ile yüklenmiştir.

### İstatistik

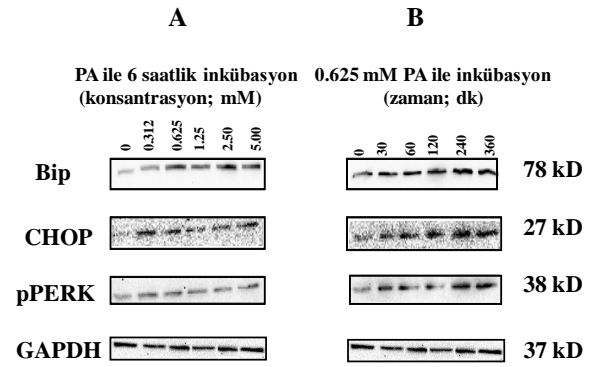
Sonuçlar Ortalama±S.E.M. olarak sunulmuştur. İstatistiksel anlamlılık ANOVA'yı takiben Tukey son testi ile  $p < 0.05$  olarak değerlendirilmiştir.

## BUGULAR

### Palmitik Asid Konsantrasyon ve Zaman Bağımlı Olarak ER-stresi ve Apoptozu İndükler

H9c2 hücre dizisinde, palmitik asid 0-5 mM konsantrasyonlarda 6 saatlik inkübasyonla doz-bağımlı olarak ve 0-360 dakikalık sürelerde 0.625 mM konsantrasyonda zaman bağımlı olarak ER-stresi indüklemiştir (Şekil 1A ve 1B).

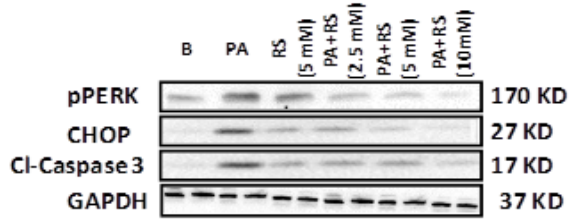
H9c2 hücre dizisinde, palmitik asid 0-5 mM konsantrasyonlarda 6 saatlik inkübasyonla, doz-bağımlı olarak, apoptozu indüklemiştir (Şekil 2).



**Şekil 1.** H9c2 hücre lizatlarında palmitik asidin çeşitli konsantrasyon (A) ve zaman (B) aralıklarında endoplazmik retikulum stres belirteçlerinin Western blot analizi. Görüntüler anti-Bip, anti-CHOP ve anti-pPERK kullanılarak elde edilen bantlardır. GAPDH standart protein olarak kullanılmıştır. PA: Palmitik asid



**Şekil 2.** H9c2 hücre lizatlarında palmitik asidin çeşitli konsantrasyonlarında (6 saatlik inkübasyon) apoptotik kaspaz yolağı belirteçlerinin Western blot analizi. Görüntüler anti-kaspaz-4 ve anti-cleaved-kaspaz-3 kullanılarak elde edilen bantlardır. GAPDH standart protein olarak kullanılmıştır.



**Şekil 3.** H9c2 hücre lizatlarında palmitik asid (0.625 mM) varlığında, resveratrolün çeşitli konsantrasyonları ile (6 saatlik inkübasyon) endoplazmik retikulum stres ve apoptotik kaspaz yolağı belirteçlerinin Western blot analizi. Görüntüler anti-CHOP, anti-pPERK ve cleaved-kaspaz-3 kullanılarak elde edilen bantlardır. GAPDH standart protein olarak kullanılmıştır.

B: Boş, PA: Palmitik asid, RS: Resveratrol.

### Resveratrol Palmitik Asid ile İndüklenen ER-stresi ve Apoptozu Baskılar

Resveratrol 0-10 mM konsantrasyonlarda, palmitik asid (0.625 mM, 6 saat) ile indüklenen ER-stresi ve apoptozu, doz-bağımlı olarak, baskılamıştır.

### Resveratrol Okdidatif Stresi Azaltır

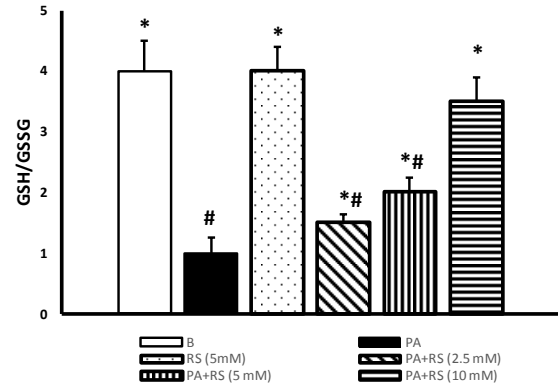
Hücre içi oksidatif stresin göstergesi olarak kabul edilen glutatyon düzeylerinin, resveratrol ile düzenlendiği saptanmıştır. Resveratrol 0-10 mM konsantrasyonlarda, palmitik asid (0.625 mM, 6 saat) ile azalmış olan GSH/GSSG oranını, doz-bağımlı olarak arttırmıştır (Şekil 4).

### Resveratrol Kaspaz 3 Aktivasyonunu Azaltır

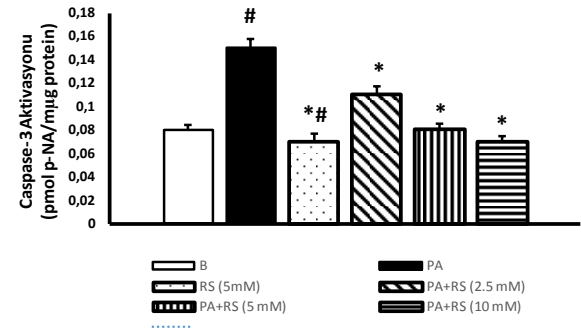
Apoptoz göstergesi olan Kaspaz 3 aktivasyonu, 0.625 mM palmitik asid ile 6 saatlik inkübasyon sonrasında artmıştır. Artmış olan bu aktivite, resveratrolün 0-10 mM konsantrasyonları ile doz-bağımlı olarak, azaltılmıştır (Şekil 5).

## TARTIŞMA

Çalışmamız, H9c2 hücre dizisinde, serbest bir yağ aside olan palmitik asidin (PA) konsantrasyon ve zaman bağımlı olarak, endoplazmik retikulum (ER)



**Şekil 4.** H9c2 hücre lizatlarında GSH/GSSG oranı. B: Boş, PA: Palmitik asid, RS: Resveratrol. Resveratrolün çeşitli konsantrasyonları (0, 2.5, 5 ve 10 mM), palmitik asidin 0.625 mM konsantrasyonuna karşı çalışılmıştır (6 saatlik inkübasyon). \*  $p < 0.05$  vs. PA ve #  $p < 0.05$  vs. RS.



**Şekil 5.** H9c2 hücre lizatlarında kaspaz 3 aktivasyonu. B: Boş, PA: Palmitik asid, RS: Resveratrol. Resveratrolün çeşitli konsantrasyonları (0, 2.5, 5 ve 10 mM), palmitik asidin 0.625 mM konsantrasyonuna karşı çalışılmıştır (6 saatlik inkübasyon). \*  $p < 0.05$  vs. PA ve #  $p < 0.05$  vs. RS.

stresi indüklediğini göstermiştir. PA ile indüklenen ER-stres üzerine resveratrolün doz-bağımlı azaltıcı etkisi, aynı hücre dizisinde gösterilmiştir. Ek olarak, PA ile indüklenen ER-stresin, apoptotik sinyal ileti yolağını

uyardığı ve resveratrol ile bu yolağın baskılandığı da saptanmıştır. Resveratrol aynı zamanda, doz-bağımlı olarak, artmış oksidatif stresin bir göstergesi olan azalmış GSH/GSSG oranını da arttırmıştır. H9c2 hücre dizisinde PA ile doz-bağımlı olarak artmış olan Kaspaz-3 aktivitesi, resveratrol ile yine doz-dozbağımlı olarak azalmıştır.

Obezite, ER-stres ile indüklenen mekanizmalar aracılığıyla insulin rezistansına neden olur (14). Bu durum özellikle kalp hastalıkları açısından çok önemlidir; çünkü ER-stresin süregelmesi durumunda kalp yetmezliği, iskemi-reperfüzyon hasarı, kardiyak hipertrofi ve ateroskleroz gibi patolojik durumlar ortaya çıkmaktadır (15,16). Son zamanlarda yapılan çalışmalar obezite ile indüklenen kardiyovasküler hastalıklar ile ER-stresin yakından ilgili olduğunu göstermiştir (15,17). ER-stres, özellikle hücreyel savunma mekanizmalarını etkisiz hale getirerek hücreleri apoptoza doğru sürüklemektedir (18). Bu durum, kardiyak mortalite açısından oldukça önemlidir. Çalışmamızda, H9c2 hücre dizisinde PA'nın ER-stresi indüklediği gösterilmiştir. Serbest yağ asitlerinin hücre düzeyinde ortaya çıkardığı bu etkinin bir sonraki basamağı da apoptoz olarak karşımıza çıkmıştır. Artan obez popülasyonu gözönüne alındığında, ER-stresi hedef alan tedavi stratejileri obezite ile indüklenen kardiyovasküler komplikasyonların önlenmesi açısından son derece önemlidir.

Polifenolik bir bileşik olan resveratrol, bitkilerde patojenlerin ataklarına yanıt olarak doğal olarak üretilmektedir (19). Resveratrol doğal olarak bitkilerden izole edilip, saflaştırılabildiği gibi, kimyasal olarak da sentezlenebilmektedir (20). Kardiyovasküler, enflamatuvar, nörodejeneratif, metabolic ve yaşlanma ile ilgili hastalıklarda yararlı etkilerinin gösterilmiş olması nedeniyle, umut vaadeden bir doğal bileşiktir. Çalışmamızda, resveratrolün H9c2 hücre dizisinde hücre içi oksidatif stresin göstergesi olan azalmış GSH/GSSG oranını arttırarak, hücre içi oksidatif stresin azaltılmasına katkıda bulunabileceği

saptanmıştır. Resveratrolün yararlı etkilerinin temeli sahip olduğu fenol halkaları olarak gösterilmektedir. Doğal olarak bir antioksidan görevi gördüğü ve bu nedenle özellikle hücreyel oksidatif stresi ve buna bağlı olarak ortaya çıkabilecek oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (11,21). Resveratrolün oksidatif stresi azaltıcı bu etkisinin, aynı zamanda apoptozu da azaltabileceği ileri sürülmüştür (11,22). Benzer biçimde, çalışmamızda resveratrolün doz-bağımlı olarak kaspaz 3 aktivasyonu azaltması, ER-stres ile indüklenen apoptoz yolağında resveratrolün olumlu etkilerinin olabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle Western blot kullanılarak, ER-stres göstergesi olan PERK fosforilasyonunu takiben bir nükleus protein olan ve apoptotik kaspaz yolağının aktivitesini sağlayan CHOP analiz edilmiştir. Resveratrol sözü edilen bu proteinleri azaltarak, gerek ER-stresin gerekse apoptozun inhibe edilmesine yardımcı olmuştur. Çalışma koşullarımızda, resveratrolle ortaya çıkan bu yararlı etkiler, onun oksidatif stresi azaltıcı etkisinden kaynaklı olabilir. Bu konuda kesin bir yargıya varabilmek için, ileri çalışmaların yapılması gereklidir.

Sonuç olarak, deney koşullarımızda H9c2 hücre dizilerinde PA ile doz- ve zaman- bağımlı olarak ER-stres indüklenmiştir. Bu durum, gerek oksidatif stresin gerekse apoptotik yolların aktivasyonuna neden olmuştur. Resveratrol ise, kullanılan konsantrasyon ve zaman aralıklarında, H9c2 hücre dizisinde PA ile indüklenen ER-stresin inhibe edilmesinde katkıda bulunmuştur. Bu etki sonucunda, hücreyel oksidatif stres göstergesi olan azalmış GSH/GSSG oranı artmış ve artmış olan kaspaz 3 aktivasyonu da azalmıştır. Resveratrolün bu yararlı etkileri, Western blot ile protein düzeyinde de saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar, obezite ile indüklenen kardiyovasküler hastalıklardan korunmak amacıyla resveratrolün terapötik önemi olabileceğini ve bu konuda çalışmalar yapılmasının yararlı olabileceğini göstermektedir.

**KAYNAKLAR**

1. Ramalingam L, Menikdewella K, LeMieux M, et al. The renin angiotensin system, oxidative stress and mitochondrial function in obesity and insulin resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Aug 4. [Epub ahead of print].
2. Maroufi NF, Farzaneh K, Alibabrdel M, et al. Taq1B Polymorphism of Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) and Its Effects on the Serum Lipid Levels in Metabolic Syndrome Patients. *Biochem Genet*. 2016. [Epub ahead of print].
3. Ceylan-Isik AF, Kandadi MR, Xu X, et al. Apelin administration ameliorates high fat diet-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol*. 2013; 63: 4-13.
4. Xu X, Pang J, Chen Y, Bucala R, Zhang Y, Ren J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) knockout preserves cardiac homeostasis through alleviating Akt-mediated myocardial autophagy suppression in high-fat diet-induced obesity. *Int J Obes*. 2016; 39(3): 387-96.
5. Yalcin A, Hotamisligil GS. Impact of ER protein homeostasis on metabolism. *Diabetes*. 2013; 62(3): 691-3.
6. Gallagher EJ, Leroith D, Karnieli E. Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome. *Mt Sinai J Med*. 2010; 77(5): 511-23.
7. Lee DK, Cheng R, Nguyen T, et al. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem*. 2000; 74(1): 34-41.
8. Renaud J, Bournival J, Zottig X, Martinoli MG. Resveratrol protects DAergic PC12 cells from high glucose-induced oxidative stress and apoptosis: effect on p53 and GRP75 localization. *Neurotox Res*. 2014; 25(1): 110-23.
9. Liu MH, Lin XL, Guo DM, et al. Resveratrol protects PC12 cells from high glucose-induced neurotoxicity via PI3K/Akt/FoxO3a pathway. *Cell Mol Neurobiol*. 2016; 35(4): 513-22.
10. Tatlıdede E, Şehirli O, Velioglu-Oğünç A, et al. Resveratrol treatment protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. *Free Radic Res*. 2009. 43(3): 195-205.
11. Huang CY, Ting WJ, Huang CY, Yang JY, Lin WT. Resveratrol attenuated hydrogen peroxide-induced myocardial apoptosis by autophagic flux. *Food Nutr Res*. 2016; 60: 30511.
12. Yang B, Ma S, Wang YB, et al. Resveratrol exerts protective effects on anoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes via miR-34a/Sirt1 signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016; 20(12): 2734-41.
13. Gu J, Hu W, Song ZP, Chen YG, Zhang DD, Wang CQ. Resveratrol-induced autophagy promotes survival and attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Int Immunopharmacol*. 2016; 32: 1-7.
14. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, et al. Chemical chaperones reduce ER-stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*. 2006. 313(5790): 1137-40.
15. Jia G, Durante W, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol*. 2016; 12(3): 144-53.
16. Cominacini L, Mozzini C, Garbin U, et al. Endoplasmic reticulum stress and Nrf2 signaling in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med*. 2015; 88: 233-42.
17. Wu LL, Russell DL, Wong SL, et al. Mitochondrial dysfunction in oocytes of obese mothers: transmission to offspring and reversal by pharmacological endoplasmic reticulum stress inhibitors. *Development*. 2015; 142(4): 681-91.
18. Younce CW, Niu J, Ayala J, et al. Exendin-4 improves cardiac function in mice overexpressing monocyte chemoattractant protein-1 in

- cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2015; 76: 172-6.
19. Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000; 66(8); 663-73.
20. Weiskirchen S, Weiskirchen R. Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy? *Adv Nutr.* 2016; 7(4): 706-18.
21. Bonnefont-Rousselot D. Resveratrol and Cardiovascular Diseases. *Nutrients.* 2016; 8(5), 250; doi:10.3390/nu8050250.
22. Feng J, Yang Y, Zhou Y, et al. Bakuchiol attenuates myocardial ischemia reperfusion injury by maintaining mitochondrial function: the role of silent information regulator 1. *Apoptosis.* 2016; 21(5): 532-45.