



ROZPRAWA DOKTORSKA

Hanna Piotrowska

Działanie przeciwnowotworowe metylowych analogów resweratrolu

Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Toksykologii
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
pod kierunkiem: **dr hab. Marka Muriasa**

Praca dofinansowana z grantu promotorskiego MNiSzW nr NN 404 24833
oraz z projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach
uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”,
Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego
przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

Poznań, 2011

Słowa kluczowe:

nowotwór jajnika, apoptoza, resweratrol, metylowe analogi resweratrolu, 3,4,4',5-TMS

*Serdeczne podziękowania składam
Panu dr hab. Markowi Muriasowi
za wyrozumiałość
i pomoc w trakcie realizacji projektu.*

*Serdecznie dziękuję
Pani Profesor Jadwidze Jodynisi-Liebert
za umożliwienie wykonania pracy doktorskiej.*

*Dziękuję dr Katarzynie Kulcenty
oraz dr Elizie Kwiatkowskiej-Borowczyk
za pomoc w realizacji części badań.*

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	7
1.1. Choroby nowotworowe.....	7
1.2. Kancerogeneza.....	7
1.2.1. Etapy kancerogenezy.....	8
1.2.2. Kancerogeny.....	8
1.3. Chemoprewencja.....	9
1.4. Apoptoza.....	10
1.4.1. Apoptoza a nekroza.....	11
1.4.2. Indukcja apoptozy.....	11
1.4.2.1. Zewnętrzny szlak apoptozy.....	12
1.4.2.2. Wewnętrzny szlak apoptozy.....	13
1.4.2.3. Szlak pseudoreceptorowy.....	14
1.4.2.4. Szlak sfingomielinowo-ceramidowy.....	14
1.4.2.5. Szlak indukowany stresem.....	15
1.5. Stres oksydacyjny.....	15
1.5.1. Stres oksydacyjny w komórkach nowotworowych.....	16
1.5.1.1. Mechanizmy odpowiedzialne za występowanie stałego stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych.....	16
1.5.2. Stres oksydacyjny a proces apoptozy.....	17
1.6. Metabolizm ksenobiotyków.....	18
1.6.1. Strategie projektowania leków przeciwnowotworowych.....	19
1.6.1.1. Mechanizm działania przeciwnowotworowego na drodze inhibicji CYP1 za pośrednictwem receptora AhR.....	20
1.6.1.2. Leki aktywowane bezpośrednio w komórce nowotworowej.....	20
1.7. Resweratrol.....	21
1.7.1. Struktura i źródła resweratrolu.....	21
1.7.2. Aktywność biologiczna resweratrolu.....	22
1.7.3. Biodostępność i metabolizm resweratrolu.....	26
1.7.4. Pochodne resweratrolu.....	29
1.7.4.1. Metylowe pochodne resweratrolu.....	29
2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	35

3. MATERIAŁY I METODY	37
3.1. Odczynniki i sprzęt	37
3.1.1. Hodowla komórek.....	37
3.1.2. Test MTT	41
3.1.3. Test ELISA	41
3.1.4. Oznaczenie aktywności kaspazy 3 oraz 7	41
3.1.5. Detekcja stresu oksydacyjnego przy użyciu diocyanu 2'-7'-dichlorofluorescyny ..	41
3.1.6. Cytometria przepływowa	42
3.1.7. Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja	42
3.1.8. Amplifikacja cDNA	42
3.1.8.1. Amplifikacja cDNA za pomocą metody RT-qPCR.....	42
3.1.8.2. Amplifikacja cDNA za pomocą metody PCR-array.....	43
3.1.9. SDS-PAGE i Western blotting.....	43
3.1.10. Transfekcja komórek raka jajnika A-2780	44
3.1.11. Model eksperymentalny mysich ksenograftów SCID	44
3.1.12. Oprogramowanie.....	45
3.2. Metody	46
3.2.1. Hodowla komórek.....	46
3.2.2. Ocena cytotoksyczności badanych związków za pomocą testu MTT	46
3.2.3. Ocena zdolności 3,4,4',5-TMS do indukcji apoptozy	47
3.2.4. Oznaczenie aktywności kaspazy 3 oraz 7	48
3.2.5. Detekcja stresu oksydacyjnego przy użyciu H ₂ DCF-DA	49
3.2.6. Cytometria przepływowa	49
3.2.7. Izolacja RNA	50
3.2.8. Odwrotna transkrypcja.....	50
3.2.9. Amplifikacja cDNA	51
3.2.9.1. Amplifikacja cDNA za pomocą metody RT-qPCR.....	51
3.2.9.2. Amplifikacja cDNA za pomocą metody PCR-array.....	52
3.2.10. SDS-PAGE i Western blotting.....	53
3.2.11. Transfekcja komórek raka jajnika A-2780	54
3.2.12. Model eksperymentalny mysich ksenograftów SCID	55
3.2.13. Analiza statystyczna wyników.....	56

4. WYNIKI	57
4.1. Ocena cytotoksyczności metyloowych pochodnych resweratrolu wobec nowotworowych linii komórkowych	57
4.2. Ocena zdolności 3,4,4',5-TMS do indukcji apoptozy w komórkach raka jajnika.....	61
4.3. Wpływ 3,4,4',5-TMS na aktywność proliferacyjną komórek raka jajnika.....	63
4.4. Wpływ 3,4,4',5-TMS na ekspresję genów pro- i antyapoptotycznych w liniach komórkowych raka jajnika.....	64
4.5. Ocena wpływu 3,4,4',5-TMS na aktywność kaspazy 3 oraz 7.....	69
4.6. Porównanie ekspresji CYP1A1 i CYP1B1 w liniach komórkowych raka jajnika A-2780 oraz SKOV-3	70
4.6.1. Wpływ 3,4,4',5-TMS na ekspresję genów CYP1A1, CYP1B1, AhR w komórkach raka jajnika	71
4.6.2. Wpływ 3,4,4',5-TMS na ekspresję białek CYP1A1, CYP1B1, AhR w komórkach raka jajnika	72
4.7. Detekcja stresu oksydacyjnego w komórkach raka jajnika z wykorzystaniem H ₂ DCF-DA	73
4.8. Ocena działania przeciwnowotworowego 3,4,4',5-TMS w modelu mysich ksenograftów SCID.....	74
5. DYSKUSJA	76
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	86
7. ZASTOSOWANE SKRÓTY	88
8. PIŚMIENNICTWO	91
STRESZCZENIE	101
SUMMARY	103

1. WSTĘP

1.1. Choroby nowotworowe

Według doniesień Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) choroby nowotworowe są przyczyną 13% (7,6 miliona) wszystkich zgonów na świecie. Do najczęściej występujących nowotworów należą: rak płuca (1,4 miliona zgonów), żołądka (740 000 zgonów), wątroby (700 000 zgonów), jelita grubego (610 000 zgonów) oraz piersi (460 000 zgonów). Ponad 70% zgonów spowodowanych chorobami nowotworowymi odnotowuje się w krajach o niskich i średnich dochodach. Przewiduje się, że liczba zgonów z powodu nowotworów w 2030 roku sięgnie 11 milionów [1].

W Polsce, podobnie jak na całym świecie, nowotwory stanowią drugą po chorobach układu krążenia przyczynę śmierci, powodując 26% zgonów u mężczyzn oraz 23% zgonów u kobiet. Na każde 100 000 osób w polskiej populacji u ponad 330 diagnozuje się chorobę nowotworową, a ponad 240 umiera [2].

Pomimo rozpowszechniania programów prewencyjnych i skryningowych, choroby nowotworowe są nadal diagnozowane każdego roku u milionów osób na całym świecie. Dotychczasowe metody leczenia polegające na chirurgicznym usunięciu guza, radioterapii i chemioterapii okazują się niezadowalające [3, 4]. Ponadto, terapie chorób nowotworowych wiążą się z wysokimi kosztami ekonomicznymi oraz trudnymi do oszacowania, aczkolwiek również bardzo istotnymi kosztami społecznymi [5, 6]. Dlatego zarówno badania nad profilaktyką chorób nowotworowych, jak i bezpieczną dla pacjenta terapią powinny stanowić cel współczesnych nauk biomedycznych.

1.2. Kancerogeneza

Kancerogeneza jest to wieloczynnikowy proces prowadzący do powstania nowotworu. Kancerogeneza jest procesem wieloletnim, zakłócającym równowagę pomiędzy proliferacją, apoptozą, różnicowaniem oraz starzeniem się komórek, a jej przebieg zależy od rodzaju guza i tkanki, w której zachodzi [7]. Przyczyną procesu kancerogenezy są mutacje dziedziczne oraz spontaniczne, indukowane przez czynniki chemiczne i fizyczne. Dotyczą one genów odpowiadających za kontrolę cyklu życiowego: supresorowych, protoonkogenów oraz genów regulatorowych. Skutkiem zmiany

sekwencji nukleotydów w łańcuchu DNA są niekontrolowane podziały zmutowanej komórki, co prowadzi do transformacji nowotworowej [8].

1.2.1. Etapy kancerogenezy

Ponad 60 lat temu na podstawie badań przeprowadzonych na modelu zwierzęcym stwierdzono, że w procesie kancerogenezy można wyróżnić trzy podstawowe etapy: inicjacji, promocji i progresji. W stadium inicjacji dochodzi do nieodwracalnej zmiany o charakterze genotypowym i polega na uszkodzeniu DNA wywołanym interakcją z reaktywną formą kancerogenu. Za zainicjowane uważa się komórki o nieodróżnionym fenotypie, odporne na działanie czynników różnicujących i cytotoksycznych, wrażliwe natomiast na czynniki wzrostowe [8]. Drugą fazą kancerogenezy jest promocja, będąca wynikiem włączania się kancerogenów promujących (promotorów). Na etapie promocji zachodzą zmiany o charakterze epigenetycznym, następuje selektywny klonalny wzrost zainicjowanych komórek poprzez nasilenie proliferacji lub hamowanie apoptozy. W efekcie powstają zmiany fenotypowe, dochodzi do uszkodzeń preneoplastycznych zmutowanej komórki, utraty swoistych funkcji oraz łączności z innymi komórkami. Ostatnim stadium kancerogenezy jest progresja, będąca etapem nieodwracalnym, obejmująca inwazję na sąsiednie tkanki i metastazę do odległych organów [9].

1.2.2. Kancerogeny

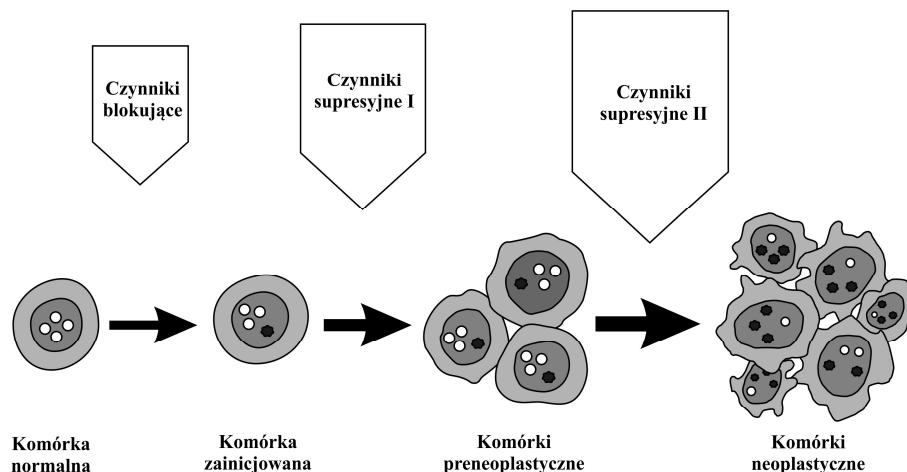
Kancerogenem jest mutagen wywołujący uszkodzenia DNA. Zależnie od charakteru i sposobu działania kancerogenów można podzielić je na dwie grupy: genotoksyczne i epigenetyczne. Kancerogeny genotoksyczne, wiążące się z DNA, inicjują i powodują progresję mutacji niezbędnych do rozwoju nowotworu. Każda ekspozycja na kancerogeny genotoksyczne może wiązać się z ryzykiem wywołania nowotworu ponieważ są one czynnikami bezprogowymi. Oznacza to, że nie jest możliwe określenie bezpiecznego stężenia (progu), które nie powoduje żadnych zmian w organizmie. W klasie kancerogenów genotoksycznych wyróżnia się czynniki bezpośrednie, niewymagające aktywacji metabolicznej (np. związki alkilujące) oraz pośrednie (prokancerogeny), których metabolity są bezpośrednimi kancerogenami (np. benzopiren).

Kancerogeny epigenetyczne, niewiążące się z DNA, aktywują protoonkogeny w wyniku zaburzenia dróg sygnałowych i przyspieszają proces kancerogenezy przez promocję (np. fenobarbital) lub immunosupresję (np. azapuryna) [10].

1.3. Chemoprewencja

Koncepcja chemoprewencji opracowana ponad 30 lat temu przez Sporną oznacza stosowanie naturalnych bądź farmakologicznych środków w celu zapobiegania, zahamowania lub regresji procesu kancerogenezy u osób z grupy podwyższonego ryzyka rozwoju choroby nowotworowej [11].

W zależności od mechanizmu działania, czynniki chemoprewencyjne dzieli się na dwie kategorie: blokujące, które działają na etapie inicjacji oraz supresyjne, modulujące etap promocji lub progresji nowotworu (ryc. 1). Wśród badanych związków chemoprewencyjnych można również wyróżnić czynniki skuteczne na wszystkich trzech etapach kancerogenezy. Do naturalnie występujących czynników chemoprewencyjnych o udowodnionych właściwościach antyinicjacyjnych należą m.in.: kumaryny, flawonoidy, terpeny oraz indole [12]. Mogą one hamować aktywację metaboliczną kancerogenów, zwiększać ich detoksykację, unieczynniać reaktywne elektrofilowe metabolity oraz wolne rodniki, zapobiegać ich reakcji z DNA, a także zwiększać skuteczność naprawy DNA [13]. Czynniki chemoprewencyjne zawartymi w diecie człowieka, działającymi na etapie promocji oraz progresji procesu kancerogenezy, są m.in.: retinoidy, karotenoidy oraz witamina E [12]. Działanie antypromocyjne/antyprogresyjne może polegać na zmiataniu reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) oraz hamowaniu procesów zapalnych, modulowaniu dróg transdukcji sygnału, a także aktywności hormonów i czynników wzrostu. Mechanizm działania antypromocyjnego/antyprogresyjnego przebiega również na drodze indukcji różnicowania się komórek, zmiany profilu ekspresji genów, hamowania proliferacji, a także inicjacji procesu apoptozy [12], która następuje głównie w wyniku odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe, np. brak czynników wzrostu. Indukcja apoptozy jest celem działania czynników chemoprewencyjnych, jednakże przy zachowaniu równowagi z zachodzącymi podziałami mitotycznymi komórek [14].



Ryc. 1. Chemoprewencja wieloetapowego procesu kancerogenezy (oryginalna rycina zaczerpnięta z Baer-Dubowska i wsp., 2005) [14]

1.4. Apoptoza

W 1858 roku Rudolf Virchow jako pierwszy zaobserwował spontaniczne, destrukcyjne zmiany na poziomie komórkowym i określił je mianem „degeneracji” [15]. Walter Flemming, 30 lat później, opisał zanikanie jąder komórkowych, kondensację chromatyny oraz wytwarzanie tzw. półksiężyców, jednakże zachodzący proces nazwał „chromatolizą” [16]. Wprowadzenie w 1972 roku obecnie stosowanego terminu „apoptoza” przypisuje się Kerrowi, Wyllie’owi oraz Currie’owi, którzy opisali przebieg procesu programowanej śmierci oraz zaproponowali nazwę, pochodzącą od greckiego słowa „apoptosis” oznaczającego opadanie liści lub płatków kwiatowych [17]. Złożoność zjawiska oraz znaczenie apoptozy w procesie kancerogenezy spowodowały, że obecnie wiele grup badawczych zajmuje się zaprogramowaną śmiercią komórki. Potwierdzeniem rosnącego zainteresowania procesem apoptozy było przyznanie w 2002 roku Nagrody Nobla Brennerowi, Horvitzowi oraz Sulstonowi za odkrycia w dziedzinie genetycznej regulacji organogenezy.

Okres życia komórek różni się w zależności od ich rodzaju, np. enterocyty mogą przeżyć od trzech do pięciu dni [18], podczas gdy okres życia fibroblastów wynosi 20-25 dni [19]. Warunkiem prawidłowego funkcjonowania organizmu jest zachowanie równowagi między czterema procesami: podziałem, różnicowaniem, dojrzewaniem i śmiercią komórek, która może zachodzić zarówno na drodze apoptozy, jak i nekrozy [20].

1.4.1. Apoptoza a nekroza

Apoptoza i nekroza stanowią dwie różne formy śmierci komórek, zarówno pod względem morfologicznym, jak i biochemicznym. Apoptoza jest procesem przebiegającym zawsze według określonego schematu obejmującego aktywację enzymów proteolitycznych z grupy kaspaz. Nekroza charakteryzuje się natomiast niekontrolowaną inaktywacją zachodzących procesów biochemicznych. Procesy te mogą być indukowane przez czynniki fizyczne, chemiczne oraz biologiczne. O tym czy komórka zostanie skierowana na drogę apoptozy czy nekrozy decyduje rodzaj czynnika wywołującego, czas ekspozycji, a także rodzaj komórek. Nekroza zwana również martwicą jest procesem patologicznym. Proces apoptozy może zachodzić natomiast zarówno w warunkach patologicznych, jak i fizjologicznych. Komórkę, która została skierowana na drogę apoptozy charakteryzuje agregacja oraz kondensacja chromatyny tuż pod błoną jądrową. DNA zostaje pocięte na fragmenty od 180- do 200- par zasad i ich wielokrotności, co daje wyraźny obraz „drabinki” w żelu agarozowym. W procesie nekrozy, morfologiczny obraz chromatyny jest natomiast podobny do obserwowanego w zdrowej komórce, a DNA zostaje pocięte na odcinki o przypadkowej długości [21]. W odróżnieniu do apoptozy, w komórkach nekrotycznych następuje, w wyniku utraty ciągłości ich błony, wypłynięcie zawartości do przestrzeni międzykomórkowej, co w konsekwencji prowadzi do wystąpienia reakcji zapalnej. Błona komórki apoptotycznej pozostaje natomiast nienaruszona, a z powodu hydrolizy sfingomielin oraz wypływu cholesterolu, na jej powierzchni rozwijają się liczne uwypuklenia [22]. Następnie dochodzi do fragmentacji cytoplazmy i powstania tzw. ciałek apoptotycznych, zawierających organelle oraz pozostałości chromatyny. Ciałka apoptotyczne są fagocytowane przez sąsiednie komórki oraz makrofagi, dlatego też nie dochodzi do rozwoju stanu zapalnego [23].

1.4.2. Indukcja apoptozy

Programowana śmierć komórki może przebiegać przy udziale receptorów śmierci, mitochondrium, granzymu B lub siateczki wewnątrzplazmatycznej. Niezależnie od rodzaju komórki oraz organelli komórkowych zaangażowanych w proces apoptozy, ogniwem łączącym różne drogi sygnałowe apoptozy są kaspazy. Należą one do rodziny proteaz cysteinowych i występują w komórce w postaci nieczynnych zymogenów, których aktywacja następuje wskutek kaskady reakcji proteolitycznych [24]. Aktywny enzym funkcjonuje w postaci tetrameru, rozcinając wysoce specyficznie wiązania

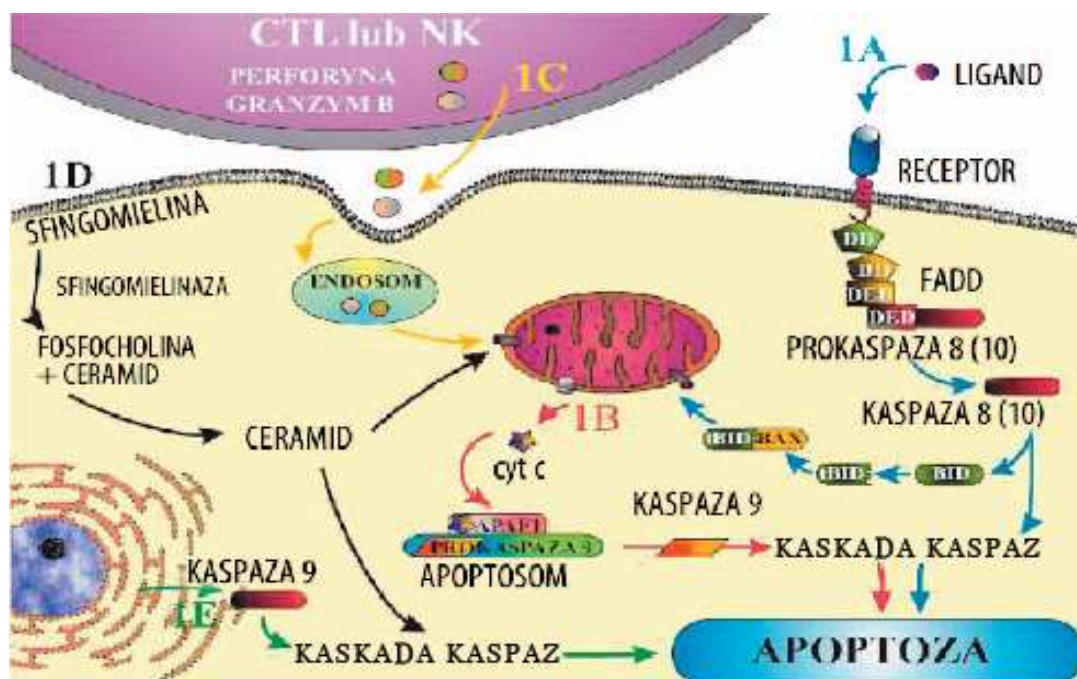
peptydowe za resztą asparaginianową. Ze względu na strukturę, wyróżnia się kaspazy posiadające prodomenę długą lub krótką. Kaspazy wykonawcze apoptozy (kaspaza-3, -6, -7) posiadają prodomenę krótką. Prodomenę długą mają natomiast kaspazy inicjujące apoptozę (kaspaza-2, -8, -9, -10). W obrębie podjednostki długiej występuje domena aktywacji i rekrutacji kaspaz (CARD, ang. *caspase activation and recruitment domain*) lub dwie domeny wykonawcze śmierci (DEDs, ang. *death effector domains*). Mają one istotne znaczenie w indukcji procesu apoptozy, stanowiąc miejsce oddziaływania między kaspazami, białkami adaptorowymi oraz receptorami błonowymi [25, 26].

Czynniki inicjujące proces apoptozy dzielą się na zewnętrzne- oraz wewnątrzkomórkowe [21]. Czynniki zewnątrzkomórkowe działają na drodze aktywacji błonowych receptorów śmierci. Wewnątrzkomórkowe czynniki powodują natomiast indukcję szlaku mitochondrialnego. Do mniej znanych dróg sygnałowych apoptozy, powodowanych zarówno przez czynniki pochodzące z wnętrza, jak i z zewnątrz komórki, należą: szlak pseudoreceptorowy granzym A lub B/perforyny, szlak sfingomielinowo-ceramidowy oraz, związany z siateczką wewnątrzplazmatyczną, szlak indukowany stresem (ryc. 2) [27, 28].

1.4.2.1. Zewnętrzny szlak apoptozy

Zewnątrzpochodny szlak apoptozy jest indukowany poprzez interakcję receptorów śmierci (DRs, ang. *death receptors*) z ich ligandami. Do DRs należą białka z rodziny TNFR (ang. *tumor necrosis factor receptor*). Są one zbudowane z trzech podjednostek: zewnątrzkomórkowej, transbłonowej oraz cytoplazmatycznej, która stanowi domenę śmierci (DD, ang. *death domain*). Do najważniejszych DRs należą: Fas (CD95, APO-1), TNF receptor-1 (TNFR-1), DR-3 (TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1) oraz DR-5 (TRAIL-R2) [29-31]. Związanie liganda z Fas oraz TNFR-1 prowadzi do oligomeryzacji receptorów w DD, co umożliwia ich związanie z C-końcową domeną DD białek adaptorowych: FADD (ang. *Fas-associated death domain*) oraz TRADD (ang. *TNFR-1 associated death domain*) [30]. Białka pośredniczące FADD lub TRADD, poprzez N-końcową podjednostkę DED, łączą się z domeną DED prokaspazy-8, tworząc kompleks DISC (ang. *Death-inducing signaling complex*), co uruchamia kaskadę kaspaz [32, 33]. TNFR-1 oraz DR-3 aktywują kaspazę-8 poprzez białka adaptorowe FADD i TRADD. FADD jest również białkiem pośredniczącym dla DR-4 oraz DR-5 [34], dlatego też jest uważane za uniwersalne białko adaptorowe dla DRs [35]. Kaspaza-8 może indukować proces

apoptozy na drodze dwóch mechanizmów: (a) bezpośredniej aktywacji kaspazy wykonawczej, kaspazy-3 oraz (b) proteolizy proapoptotycznego białka Bid (ang. *BH3 interacting domain death agonist*), w wyniku której dochodzi do powstania skróconej postaci tBid (ang. *truncated Bid*), wiążącej się z białkiem Bax (ang. *BCL2-associated X protein*). Następuje wówczas translokacja powstałego kompleksu do mitochondrium, uwolnienie cytochromu c, aktywując wewnętrzny szlak apoptozy [32].



Ryc. 2. Szlaki apoptozy; 1A- szlak zewnętrzny, 1B- wewnętrzny, 1C- pseudoreceptorowy, 1D- sfingomielinowo-ceramidowy, 1E- indukowany stresem (oryginalna rycina zaczerpnięta z Stępień i wsp., 2007) [33]

1.4.2.2. Wewnętrzny szlak apoptozy

Szlak wewnętrzny apoptozy przebiega z udziałem mitochondrium, dlatego też jest nazywany szlakiem mitochondrialnym. Do jego aktywacji dochodzi w wyniku wzrostu stężenia ROS, stresu oksydacyjnego, uszkodzeń DNA, a także wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} oraz tlenku azotu [36, 37]. Zmiany potencjału błonowego, a w konsekwencji zaburzenia przepuszczalności błony mitochondrium powodują wypłynięcie około 40-stu białek zaangażowanych w proces apoptozy m.in. cytochromu c/Apaf-2, AIFs (ang. *apoptosis-inducing factors*), Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, endonukleazy G, kaspazy-2 oraz kaspazy-9 [38-40]. Uwolnienie cytochromu c do cytozolu powoduje aktywację kaspaz wykonawczych poprzez utworzenie kompleksu cytochrom c/Apaf-1 zwanego apoptosomem [41]. Cytochrom c wiąże się do cytoplazmatycznego białka Apaf-1 dzięki obecności na jego C-końcu domeny WD-40. Na N-końcu łańcucha polipeptydowego

Apaf-1 występuje natomiast domena CARD umożliwiająca przyłączenie prokaspazy 9, a w konsekwencji aktywację kaspaz wykonawczych [33]. Endonukleaza G i AIFs powodują kondensację DNA, podczas gdy Smac/DIABLO oraz Omi/HtrA2 wpływają na aktywację kaspaz: -3, -7 oraz -9 poprzez znoszenie hamującego działania IAPs (ang. *inhibitors of apoptosis*) [38, 39].

Do najliczniejszych oraz najbardziej poznanych czynników regulatorowych apoptozy, wpływających na zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej, należą białka z rodziny Bcl-2 (ang. *B cell lymphoma gene-2*). Wśród nich wyróżnia się zarówno inhibitory apoptozy (m.in. Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1- należące do podrodziny Bcl-2), jak i białka proapoptotyczne (m.in. Bax, Bak, Bok- należące do podrodziny Bax oraz białka należące do podrodziny BH3- Bad, Bik, Bid) [42].

Wewnętrzny szlak apoptozy jest często nazywany zależną od p53 ścieżką mitochondrialną [33]. W odpowiedzi na czynniki stresogenne, białko p53 będące czynnikiem transkrypcyjnym wielu genów zaangażowanych w szlak wewnętrzny, przemieszcza się do mitochondrium i zwiększając przepuszczalność błony mitochondrialnej powoduje uwolnienie cytochromu c. Ponadto, białko p53 może hamować ekspresję inhibitorów apoptozy tj. Bcl-2 [33, 43].

1.4.2.3. Szlak pseudoreceptorowy

Szlak pseudoreceptorowy zaobserwowano w cytotoksycznych limfocytach T i komórkach NK, które wytwarzają perforynę, granzym A (GrA) oraz granzym B (GrB) [44, 45]. GrB indukuje proces apoptozy z udziałem mitochondrium, natomiast GrA z udziałem jądra komórkowego. GrB wnika do komórki na drodze endocytozy, powoduje proteolizę białka Bid do skróconej formy tBid, który ulega translokacji do mitochondrium, powodując uwolnienie cytochromu c [46]. W indukcji apoptozy z udziałem GrA, dochodzi do translokacji jądrowej kompleksu SET podlegającemu proteolizie przez GrA. W konsekwencji, następuje aktywacja DNA-zy przez jeden z uwolnionych składników kompleksu SET. Pocięcie DNA prowadzi do skierowania komórki na drogę apoptozy [47].

1.4.2.4. Szlak sfingomielinowo-ceramidowy

Szlak sfingomielinowo-ceramidowy przebiega w wyniku zwiększenia stężenia ceramidów, w następstwie aktywacji sfingomielinazy, która tnie sfingomielinę na ceramid

oraz fosfocholiny [48]. Ceramidy indukują proces apoptozy poprzez kinazy CAPK (ang. *ceramide-activated protein kinases*) i MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases*) oraz fosfatazę CAPP (ang. *ceramide-activated protein phosphatase*). Ponadto, ceramidy mogą aktywować wewnętrzny szlak apoptozy poprzez zmianę potencjału błony mitochondrialnej i uwolnienie cytochromu c [33].

1.4.2.5. Szlak indukowany stresem

Szlak indukowany stresem przebiega z udziałem siateczki wewnątrzplazmatycznej w wyniku zaburzenia stężenia jonów Ca^{2+} oraz skomasowania białek podlegających nieprawidłowym modyfikacjom posttranslacyjnym. Następuje wówczas aktywacja kaspazy-12, która uruchamia kaskadę kaspaz wykonawczych [28]. Wykazano również, że szlak indukowany stresem może być odpowiedzialny za uruchomienie drogi mitochondrialnej poprzez czynnik białkowy Apaf-1 [49].

1.5. Stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny jest wynikiem zaburzenia równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej, prowadzącego do nadmiernej kumulacji ROS [50]. Wśród ROS wyróżnia się zarówno rodniki tlenowe tj. anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-), rodnik hydroksylowy (OH^\cdot), tlenek azotu (NO^\cdot), jak i połączenia tlenu, które nie są rodnikami tj. nadtlenek wodoru (H_2O_2), kwas podchlorawy (HOCl), tlen singletowy ($^1\text{O}_2$), a także ozon (O_3) [51]. Szczególnie istotne znaczenie ma O_2^- . Powstaje w mitochondriach jako produkt jednoelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego w wyniku niedoskonałego przepływu elektronów przez łańcuch oddechowy. Jest uważany za mało toksyczną formę ROS, jednakże może ulegać dalszym przemianom do reaktywnego OH^\cdot , który natychmiast po powstaniu reaguje z białkami, kwasami nukleinowymi bądź indukuje łańcuchowy proces peroksydacji lipidów [52].

W świetle tych informacji niezwykle istotną rolę odgrywa antyoksydacyjny układ ochrony organizmu (ADS, ang. *antioxidant defense system*), na który składają się dwa systemy: enzymatyczny i nieenzymatyczny, obejmujący antyoksydanty m.in. glutation (GSH), witaminy A, E i C [53, 54]. W systemie enzymatycznym wyróżnia się izoenzymy dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, ang. *superoxide dismutase*), katalazę (CAT, ang. *catalase*), peroksydazę glutationową (GSH-Px, ang. *glutathione peroxidase*), reduktazę glutationową (GR, ang. *glutathione reductase*) oraz transferazę glutationową (GST, ang.

glutathione S-transferase) [53]. Głównym zadaniem ADS jest neutralizacja ROS, ochrona przed uszkodzeniami komórki przez ROS, a także hamowanie łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych [54].

1.5.1. Stres oksydacyjny w komórkach nowotworowych

Prace badawcze nad rolą ROS w procesie kancerogenezy są prowadzone od kilkudziesięciu lat w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie [51]. Wiadomym jest, że wpływ ROS na komórki zależy od ich stężenia i czasu ekspozycji. W warunkach fizjologicznych, małe stężenia ROS utrzymują m.in. równowagę redoks oraz regulują przekazywanie sygnałów w procesie proliferacji komórek [55]. Nadmierna produkcja ROS prowadzi natomiast do indukcji transformacji nowotworowej. Ponadto wykazano, że komórki nowotworowe znajdują się w stanie ciągłego stresu oksydacyjnego. Już w 1977 roku, Swartz i Gutierrez [56] zaobserwowali podwyższony poziom ROS w szczurzej linii komórkowej mięsaka – Walker 256, co zostało wówczas uznane za analityczny artefakt. Jednakże kompleksowy rozwój technik laboratoryjnych umożliwił potwierdzenie występowania stałego stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych poprzez: (a) zwiększoną produkcję ROS, (b) kumulację produktów reakcji, w których pośredniczą ROS, zarówno w komórkach nowotworowych, jak i surowicy oraz moczu, (c) zwiększenie ekspresji enzymów antyoksydacyjnych jako odpowiedź, zachodzącego w komórkach nowotworowych, stresu oksydacyjnego [51].

1.5.1.1. Mechanizmy odpowiedzialne za występowanie stałego stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych

Pomimo występowania ciągłego stresu oksydacyjnego w różnych typach komórek nowotworowych, dokładne mechanizmy mogące tłumaczyć jego powstawanie, pozostają niewyjaśnione [51].

Jednym z potencjalnych mechanizmów odpowiedzialnych za wzmożoną produkcję ROS są zaburzenia przekazywania sygnałów onkogennych w szlakach tj. RAS-Raf, kaskadzie kinaz MAPK, kinazy białkowej PKA (ang. *protein kinase A*) [57]. Wykazano, że allel RAS 2 (Val 19), powodujący konstytutywną aktywację ścieżki cAMP-PKA, zwiększa produkcję ROS, prowadząc do inicjacji procesu nowotworzenia oraz nabywania przez komórki nowotworowe zdolności do inwazji na sąsiednie tkanki i metastazy do odległych organów [57, 58].

Zwiększone stężenie ROS w komórkach nowotworowych może być również wynikiem chronicznego stanu zapalnego. Udowodniono, że m.in. zapalenie żołądka, wątroby, jak również wrzodziejące zapalenie jelita grubego (CU, łac. *colitis ulcerosa*) mogą prowadzić do transformacji nowotworowej [59, 60]. Fragmenty uszkodzonych, objętych procesem zapalnym, komórek powodują rekrutację fagocytów. Dochodzi wówczas do indukcji wzmożonej syntezy ROS, zaburzającej równowagę redoks komórki. Następuje uszkodzenie DNA, białek oraz lipidów, co prowadzi do rozwoju nowotworu. Szczególnie istotną rolę w procesie kancerogenezy przypisuje się interakcji p53-NO[•] [60]. Dalsza wzmożona produkcja ROS w komórkach nowotworowych może być efektem uszkodzeń mitochondrialnego DNA (mtDNA) [51].

mtDNA koduje 13 składników kompleksów enzymatycznych łańcucha oddechowego, będącego głównym miejscem wytwarzania ROS. W komórkach nowotworowych występują często mutacje mtDNA, które powodują dysfunkcje łańcucha oddechowego. Zaburzenia jego funkcjonowania nasilają produkcję ROS. Istnieje więc korelacja pomiędzy występowaniem mutacji w mtDNA a stresem oksydacyjnym w komórkach nowotworowych [51, 61].

Podwyższone stężenie ROS w komórkach nowotworowych może być również wynikiem zwiększonego metabolizmu, co wymaga ciągłego dostarczania ATP. Dochodzi więc do aktywnego działania łańcucha oddechowego wytwarzającego w konsekwencji większe ilości ROS [58].

1.5.2. Stres oksydacyjny a proces apoptozy

Wzmożona produkcja ROS w komórce prowadzi do wykształcenia różnego typu odpowiedzi, w zależności od rodzaju ROS, poziomu oraz czasu trwania stresu oksydacyjnego [51, 62]. Może dojść do chwilowego zatrzymania wzrostu i adaptacji komórek, zwiększenia proliferacji, długotrwałego zatrzymania wzrostu lub starzenia się, indukcji procesu nekrozy lub apoptozy [62].

Szczególnie ważną rolę w indukcji procesu apoptozy odgrywa H₂O₂. Zależnie od jego stężenia, komórki mogą podlegać proliferacji bądź apoptozie. W warunkach fizjologicznych, stężenie H₂O₂ wynosi 5-50 nM. Stopniowy wzrost, do stężenia 0,7 μM indukuje proliferację. Komórka kierowana jest natomiast na drogę apoptozy kiedy stężenie H₂O₂ osiągnie wartość w przedziale 1-3 μM [63].

Wykazano, że podwyższone stężenie ROS może powodować proces apoptozy poprzez zwiększenie przepuszczalności błony mitochondrialnej, następujące w wyniku peroksydacji lipidów. Ponadto, największe ilości $O_2^{\cdot-}$ są generowane w mitochondrium, powodując jego uszkodzenia. Dochodzi wówczas do uwolnienia cytochromu c i aktywacji kaspaz wykonawczych [51].

Badania Sade i Sarin (2004) wykazały indukcję procesu apoptozy w limfocytach T, inkubowanych w warunkach wzmożonego stresu oksydacyjnego. Zaobserwowano podwyższoną ekspresję Bcl-2, oddziałującego z mediatorem śmierci komórki BIM (ang. *Bcl-2-interacting mediator of cell death*) oraz indukowalną syntazą tlenku azotu iNOS (ang. *inducible nitric oxide synthase*), a w konsekwencji proces apoptozy [64].

Zwiększona produkcja ROS może prowadzić do indukcji ścieżki sygnalizacyjnej JNK/SAPK, aktywującej proces transkrypcji oraz posttranslacyjnej modyfikacji białek uczestniczących w apoptozie [65].

Zdolność ROS do indukcji procesu apoptozy daje możliwość eliminowania komórek nowotworowych, „wprowadzając” je, za pomocą środków farmakologicznych, w stan wzmożonego stresu oksydacyjnego [51]. W warunkach długotrwałego stresu oksydacyjnego następuje zużycie mechanizmów adaptacyjnych oraz wyczerpanie zdolności buforowania. Zastosowanie czynnika wzmagającego produkcję ROS może prowadzić do nasilenia stresu oksydacyjnego komórki do takiego poziomu, że zostanie skierowana ona na drogę apoptozy. Obserwacje te mogą mieć potencjalne zastosowanie w selektywnej terapii przeciwnowotworowej [51, 66].

1.6. Metabolizm ksenobiotyków

Biotransformacja ksenobiotyków jest podzielona na reakcje pierwszej fazy, obejmujące utlenianie, redukcję i hydrolizę, oraz reakcje drugiej fazy (syntezy). Główną rolę w metabolizmie ksenobiotyków pierwszej fazy pełnią izoenzymy z rodziny cytochromu P-450 (CYP), wykazujące aktywność wieloczynnościowej monooksygenazy – MFO (ang. *mixed function oxidase*) [67]. Ich ekspresja zachodzi niemal we wszystkich tkankach, jednakże największą aktywność wykazują we frakcji mikrosomalnej wątroby [68]. Są to białka o masie cząsteczkowej 47-55 kDa, które zawierają hem jako grupę prostetyczną [67]. Izoenzymy z rodziny CYP związane są z siateczką wewnątrzplazmatyczną oraz błoną mitochondrialną i katalizują reakcje utleniania. Redukcja żelaza w centrum aktywnym hemu umożliwia przyłączenie dwóch atomów

tlenu cząsteczkowego, gdzie jeden atom służy do utlenienia substratu, a drugi do utworzenia cząsteczki wody. Reakcje utleniania ksenobiotyków mają na celu wprowadzenie do ich hydrofobowej struktury grup polarnych, ułatwiających sprzężanie w drugiej fazie przemian metabolicznych [69]. Reakcje sprzężania polegają na łączeniu się ksenobiotyku lub jego metabolitu z endogennym substratem, występującym zazwyczaj w formie zjonizowanej i łatwiej wydalającym się z moczem lub żółcią [67, 69]. Do reakcji syntezy z ksenobiotykami należą: sprzężanie z kwasem glukuronowym, kwasem siarkowym, glutationem oraz aminokwasami, acetylacja i metylacja. Reakcje sprzężania przebiegają w dwóch etapach: (a) aktywacji substancji endogennych, pod wpływem nośników energii, m.in. adenozy-5'-trifosforanu (ATP), urydino-5'-trifosforanu (UTP), oraz (b) przeniesienia grupy o wysokim potencjale energetycznym, w którym uczestniczą enzymy z klasy transferaz [67], m.in.: UDP-glukuronozylotransferaza (UGTs, ang. *UDP-glucuronosyltransferase*), sulfotransferazy (SULTs, ang. *sulfotransferases*), transferaza glutationowa (GST, ang. *glutathione S-transferase*), aryloamino N-acetyltransferazy (NATs, *arylamine N-acetyltransferases*), katechol-O-metyltransferaza (COMT, ang. *catechol O-methyltransferase*), S-metyltransferaza tiopuryny (TPMT, ang. *thiopurine S-methyltransferase*) [70]. W wyniku reakcji drugiej fazy metabolizmu ksenobiotyków dochodzi do detoksykacji poprzez utratę ich aktywności farmakologicznej i przyspieszenie eliminacji z organizmu [71]. Efektem biotransformacji może być również aktywacja metaboliczna substancji nieczynnej biologicznie do silnie toksycznego metabolitu, co stało się podstawą do poszukiwań leków aktywowanych bezpośrednio w komórkach nowotworowych [68, 71].

1.6.1. Strategie projektowania leków przeciwnowotworowych

Rodzina CYP1 składa się z trzech izoenzymów: CYP1A1, CYP1A2 oraz CYP1B1 [72]. Zarówno CYP1A1, jak i CYP1B1 bierze udział w hydroksylacji estronu do 17-beta-estradiolu oraz w metabolizmie prokancerogenów. Enzymy te często ulegają nadekspresji w ludzkich komórkach nowotworowych, dlatego też ich selektywne inhibitory są tak pożądanym narzędziem terapeutycznym. Drugie podejście wykorzystujące podobieństwo strukturalne do substratu enzymów CYP1A1 i CYP1B1 - estronu, polega na poszukiwaniu leków aktywowanych bezpośrednio w komórce nowotworowej, charakteryzującej się podwyższonym poziomem białka CYP1B1, a którego nie stwierdza się w zdrowych tkankach [68].

1.6.1.1. Mechanizm działania przeciwnowotworowego na drodze inhibicji CYP1 za pośrednictwem receptora AhR

Ekspresja enzymów CYP1 jest regulowana przez receptor węglowodorów arylowych AhR (ang. *aryl hydrocarbon receptor*). Jest to czynnik transkrypcyjny, który wiąże się z szerokim spektrum ksenobiotyków, w tym kancerogenów. Po związaniu z agonistą, receptor AhR łączy się z białkiem zwanym translokazą jądrową – ARNT (ang. *AhR nuclear translocator*) i przemieszcza się do jądra komórkowego. Kompleks AhR/ARNT wiąże się z wybranymi sekwencjami DNA, określanymi jako elementy odpowiedzi na ksenobiotyki – XRE (ang. *xenobiotic response elements*) i daje sygnał do rozpoczęcia procesu transkrypcji wielu genów [73, 74]. Powoduje to m.in. aktywację genów cytochromu *CYP1A1* i *CYP1B1* oraz ich wzmożoną transkrypcję. Enzymy CYP1A1 oraz CYP1B1 indukują wiele prokancerogenów za pośrednictwem receptora AhR. Dlatego też leki działające antagonistycznie w stosunku do AhR, które hamują ekspresję CYP1, wydają się stanowić rozsądną strategię przeciwnowotworową [73].

1.6.1.2. Leki aktywowane bezpośrednio w komórce nowotworowej

Strategie projektowania leków przeciwnowotworowych polegają często na blokowaniu szybkich, niekontrolowanych podziałów komórek nowotworowych, co prowadzi do skierowania ich na drogę apoptozy. W organizmie następują również podziały komórek prawidłowych, których uszkodzenie wywoływane lekami przeciwnowotworowymi jest przyczyną wielu, bardzo poważnych działań ubocznych. Dlatego też poszukiwane są substancje będące pro-lekami, które ulegają metabolicznej aktywacji w komórkach nowotworowych za sprawą specyficznie występujących w nich enzymów [68]. Jednym z enzymów, który może katalizować biotransformację tego typu związków do ich aktywnych form jest CYP1B1 [75]. Jego nadekspresję zidentyfikowano w komórkach nowotworowych pochodzących m.in.: z jajnika, piersi, mózgu, płuc, przetyku, skóry, jelita grubego, jąder oraz węzłów chłonnych [76-78]. Pomimo ekspresji na poziomie mRNA, enzym ten jest niewykrywalny w prawidłowych komórkach pochodzących z tych narządów [77, 79]. Dlatego substraty CYP1B1, które mogłyby być aktywowane do czynnych związków cytotoksycznych bezpośrednio w komórkach nowotworowych, wydają się być obiecującymi narzędziami w selektywnej terapii przeciwnowotworowej.

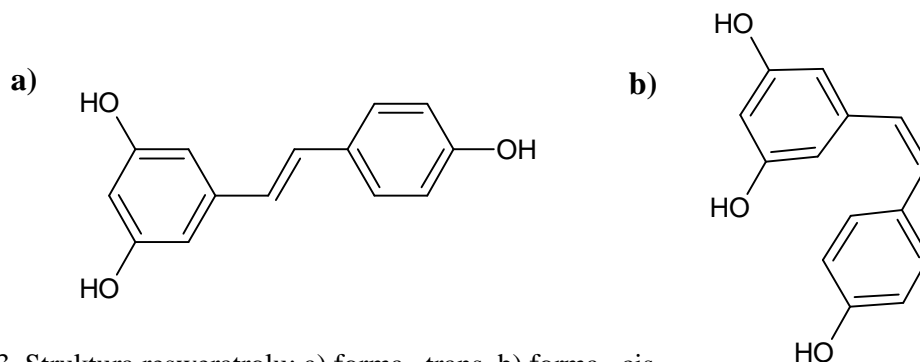
1.7. Resweratrol

Historia stosowania resweratrolu sięga dwóch tysięcy lat. Przypuszcza się, że już wtedy ekstrakt z winogron „darakchasava” był wykorzystywany przez indyjskich zielarzy w leczeniu różnych jednostek chorobowych [80]. W latach siedemdziesiątych XX wieku, zaobserwowano niski wskaźnik zachorowalności Francuzów na choroby układu sercowo-naczyniowego, pomimo diety obfitej w tłuszcze zwierzęce, a więc bogatej także w cholesterol. Za czynnik chroniący osoby stosujące taką dietę uznano czerwone wino, które Francuzi spożywają w umiarkowanych ilościach podczas posiłków. Zjawisko to, nazwane w 1992 roku „Francuskim Paradoksem” naprowadziło naukowców na trop chemoprewencyjnych właściwości resweratrolu [81].

1.7.1. Struktura i źródła resweratrolu

Resweratrol (3,5,4'-trans-trihydroksystylben) jest naturalnie występującym stylbenem, składającym się z dwóch pierścieni fenolowych połączonych mostkiem etylenowym. Jego biosynteza przebiega z udziałem syntazy stylbenowej oraz prekursorów takich jak malonylo-koenzym A oraz p-kumarylo-koenzym A. Występuje w postaci dwóch izomerów geometrycznych: cis i trans (ryc. 3). Forma trans-resweratrolu charakteryzuje się większą stabilnością i aktywnością biologiczną, a pod wpływem promieniowania UV może przechodzić w formę cis [82, 83]. Grupa -OH w pozycji 4' resweratrolu, działająca synergistycznie z grupami hydroksylowymi w pozycjach 3' i 5' może warunkować jego aktywność antyoksydacyjną [84].

Jak dotąd zidentyfikowano cztery naturalne, posiadające grupy hydroksylowe oraz metylowe, analogi trans-resweratrolu: piceatanol (3,5,3',4'-tetrahydroksy-trans-stylben), rapontygenina (3,5,3'-trihydroksy-4'-metoksy-trans-stylben), pinostylben (3,3',4'-trihydroksy-5-metoksy-trans-stylben) oraz pterostylben (3,5-dimetoksy-4'-hydroksy-trans-stylben) [83].



Ryc. 3. Struktura resweratrolu: a) forma– trans, b) forma– cis

Resweratrol jest fitoaleksyną wytwarzaną przez stosunkowo niewiele gatunków roślin w odpowiedzi na stres wywołany między innymi uszkodzeniami mechanicznymi, promieniowaniem UV, infekcją grzybiczą lub bakteryjną. W roku 1940 resweratrol został po raz pierwszy wyizolowany z korzenia ciemżycy białej (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) [85]. W Japonii, w 1963 roku zidentyfikowano go w korzeniu *Polygonum cuspidatum* - rośliny, z której uzyskiwano preparat *ko-jo-kon*. Znajdował on zastosowanie w tradycyjnej medycynie wschodu jako aktywny czynnik wspomagający leczenie m.in. chorób układu sercowo-naczyniowego, zapalenia skóry oraz grzybicy. W winogronach (*Vitis vinifera*), będących najbogatszym źródłem resweratrolu, został wykryty w 1976 roku. Jego syntezę, szczególnie obfitą przy infekcji winogron szarą pleśnią (*Botrytis cinerea*), potwierdzono w epidermie liści oraz skórcie owoców. Nie wykryto natomiast obecności resweratrolu w miąższu winogron [86]. Do chwili obecnej resweratrol został wykryty w ponad 70 gatunkach roślin, m.in.: orzeszkach ziemnych (*Arachis hipogea*), owocach morwy (*Morus spp.*), rdeście japońskim (*Polygonum cuspidatum*), borówce (*Vaccinum spp.*), rdestowcu ostrokończystym (*Reynoutria japonica*), senesowatych (*Cassia spp.*), rzewieniowatych (*Rheum spp.*), eukaliptusie (*Eucalyptus*), sośnie (*Pinus spp.*), wiechlinowatych (*Poa spp.*), jęczmieniu (*Hordeum*), ostnicy (*Stipa*), koniczynowatych (*Trifolium spp.*), chlebowicach (*Artocarpus spp.*), gniotowych (*Gnetum spp.*), piwonii chińskiej (*Poaenonia lactiflora*) [86-89].

1.7.2. Aktywność biologiczna resweratrolu

Resweratrol charakteryzuje szerokie spektrum działania, obejmujące m.in. właściwości antyoksydacyjne, neuro- i kardio- protekcyjne. Resweratrol może także działać jako czynnik opóźniający proces starzenia, przeciwwirusowo, przeciwbakteryjnie, przeciwwirusowo, przeciwzapalnie oraz chemoprewencyjnie. Posiada zdolność hamowania procesu nowotworowego na wszystkich trzech etapach jego rozwoju: inicjacji, promocji oraz progresji. Resweratrol jest także fitoestrogenem [90-92].

Resweratrol odgrywa szczególnie istotną rolę jako czynnik antyoksydacyjny i przeciwzapalny. Stylben ten wykazuje działanie antyoksydacyjne poprzez zmniejszanie produkcji ROS np. w wyniku współzawodnictwa z koenzymem Q oraz zmiatania wolnych rodników produkowanych w mitochondriach [93]. Jego aktywność przeciwutleniająca zmniejsza istotnie występowanie mutagennych modyfikacji oksydacyjnych DNA, a także hamuje peroksydację lipidów, prowadzącą do powstania

produktów aldehydowych zdolnych do tworzenia kancerogennych adduktów z DNA [83]. Losa GA (2003) zaobserwował pod wpływem resweratrolu znaczny spadek zawartości monoaldehydów, będących miernikiem stresu oksydacyjnego, w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC, ang. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) inkubowanych z 2-deoksy-D-rybozą [94]. Olas i wsp. (2005) wykazali w trombocytach krwi zdolność resweratrolu do redukcji stresu oksydacyjnego indukowanego przez cisplatynę oraz koniugat selen-cisplatyna. Resweratrol powodował zmniejszenie syntezy 8-epi prostaglandyny F2 (biomarkera procesu peroksydacji lipidów) oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych, tj.: SOD, CAT, GSH-Px [95]. Ponadto, wykazano dodatnią korelację pomiędzy właściwościami antyoksydacyjnymi i kardioprotekcyjnymi resweratrolu. W modelu niedokrwionego serca - Langerdorffa zaobserwowano zmiatanie wolnego rodnika DPPH (ang. *1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl*) oraz hamowanie oksydacji lipoprotein LDL (ang. *low density lipoprotein*) katalizowanej jonami miedzi [96].

Działanie przeciwzapalne resweratrolu istotnie wpływa na jego wartość jako czynnika chemoprewencyjnego. Resweratrol posiada zdolność hamowania czynników transkrypcyjnych tj. NFκB. Jest również inhibitorem cyklooksygenazy 1 i 2 (COX-1,-2 ang. *cyclooxygenase-1, -2*), enzymów katalizujących syntezę prostaglandyn z kwasu arachidonowego, zależnych od NFκB [83]. Rola resweratrolu, w zespole wyniszczenia nowotworowego (tzw. kacheksji), jako inhibitora NFκB została zbadana przez Wyke i wsp. (2004). U myszy otrzymujących resweratrol zaobserwowano zmniejszenie zdolności wiązania NFκB do DNA oraz atenuację efektów przewlekłego procesu chorobowego [97]. Resweratrol moduluje także ekspresję cytokin prozapalnych. Badania prowadzone na mysim modelu cukrzycy wykazały pod wpływem 3,5,4'-trihydroksystylbenu obniżenie poziomu czynnika martwicy nowotworów TNF (ang. *tumor necrosis factor*) [98].

Zaobserwowano, że resweratrol wpływa na przebieg cyklu komórkowego, jednakże wyniki badań różnią się w zależności od zastosowanego modelu doświadczalnego. Horvath i wsp. (2005) wykazali w linii komórek ostrej białaczki mieloblastycznej HL60, że resweratrol hamuje reduktazę rybonukleotydową (RR, ang. *ribonucleotide reductase*), uczestniczącą w syntezie deoksyrybonukleotydów [99]. Inhibicja RR wynika ze zdolności resweratrolu do zmiatania rodnika tyrozolowego w kluczowej dla jej funkcjonowania podjednostce R2. Podjednostka ta kontrolowana jest przez białko p53, które zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G1. W wyniku inhibicji tego enzymu dochodzi do usunięcia zmutowanych komórek poprzez proces apoptozy [100].

Zhou i wsp. (2009) wykazali natomiast, że resweratrol może wstrzymywać (odwracalnie) cykl komórkowy w fazie S, w czasie której dochodzi do naprawy uszkodzeń DNA. Pomimo, że nie wykazano indukcji procesu apoptozy na drodze tego mechanizmu, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S może stanowić pożyteczną strategię prewencji kancerogeny [101]. 3,5,4'-trihydroksystyben może powodować również obniżanie, zachodzącej tylko w komórkach nowotworowych, ekspresji surwiwiny, która reguluje proces mitozy. Surwiwina należy do białek z rodziny IAPs i hamuje aktywność kaspazy-3, -7 oraz -9 [102].

Resweratrol indukuje proces apoptozy zarówno poprzez: (a) mechanizm zewnątrzkomórkowy, związany z receptorami śmierci DRs, oraz (b) wewnątrzkomórkowy, wywołujący depolaryzację błony mitochondrialnej [103].

Resweratrol posiada zdolność do wywoływania apoptozy zależnej od TRAIL (ang. *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), należącego do rodziny TNFR. Powodowana przez resweratrol selektywna indukcja apoptozy zależnej od TRAIL nie zachodzi w zdrowych fibroblastach, a wyłącznie w komórkach nowotworowych [102,104]. Ponadto, wykazano, że działanie proapoptotyczne resweratrolu jest niezależne od p53, koreluje z zatrzymaniem cyklu komórkowego oraz zmniejszeniem ekspresji surwiwiny [105].

Opisywane w piśmiennictwie wyniki badań nad indukcją przez resweratrol procesu apoptozy zależnego od Fas/CD95 i FasL różnią się w poszczególnych modelach eksperymentalnych. Clement i wsp. (1998) wykazali zdolność resweratrolu do zwiększania ekspresji Fas i FasL w linii komórkowej ostrej białaczki mieloblastycznej HL60 oraz komórkach raka piersi T47D. Potwierdzono również, że proces apoptozy jest indukowany w tych komórkach na drodze mechanizmu zależnego od Fas [106]. W komórkach raka jelita grubego HT-29 i HCT116 wykazano, że resweratrol pomimo, że nie posiada zdolności modulowania ekspresji powierzchniowej Fas, FasL, DR 4 oraz DR5 indukuje proces apoptozy zależnej od Fas. Resweratrol powoduje bowiem redystrybucję Fas, DR 4, DR 5 razem z FADD i prokaspazą 8 do tratw lipidowych. Proces ten związany jest z formowaniem kompleksu inicjującego apoptozę DISC, stymulacją DRs oraz aktywacją kaskady kaspaz, prowadzącą w konsekwencji do apoptozy komórek [107].

Wykazano, że resweratrol posiada również zdolność indukcji procesu apoptozy na drodze mechanizmu wewnątrzkomórkowego. Dorrie i wsp. (2001) zaobserwowali, że powoduje on depolaryzację błony mitochondrialnej w limfocytach B ostrej białaczki

limfoblastycznej, opornych na indukcję apoptozy zależnej od Fas [108]. Podobnie, resweratrol w komórkach siatkówczaka (ang. *retinoblastoma*) powoduje utratę potencjału błony mitochondrialnej, uwolnienie cytochromu c do cytoplazmy oraz aktywację kaspazy-3 i kaspazy-9 [109]. Ponadto, Jiang i wsp. (2005) wykazali w linii komórkowej glejaka U251, że stylben ten indukuje translokację Bax do mitochondrium, powoduje także uwolnienie cytochromu c, aktywację kaspazy-9 i w konsekwencji zapoczątkowuje proces apoptozy [110].

Resweratrol posiada także zdolność do hamowania serynowo-treoninowej kinazy AKT, będącej głównym efektem 3-kinazy fosfatidyloinozytolu – PI3K (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase*) [86]. W linii komórkowej raka prostaty LNCaP, resweratrol hamuje aktywację PI3K indukując w ten sposób proces apoptozy [111]. Ponadto, Sexton i wsp. (2006) zaobserwowali, że resweratrol obniża poziom ufosforylowania AKT w komórkach nowotworowych macicy: HeLa, EN-1078D, HEC-1A, RL95-2 [112]. Wyniki te zostały potwierdzone w linii komórkowej raka piersi MCF-7 poprzez wykazanie redukcji fosforylacji AKT, a także aktywację kaspazy-9 [113]. Obniżenie poziomu fosforylacji AKT przez resweratrol powoduje również redukcję fosforylacji MDM2 (ang. *murine double minute*), negatywnego regulatora p53 [86].

Zaobserwowano, że resweratrol wykazuje zdolność indukcji apoptozy, zarówno zależnej, jak i niezależnej od p53. Działanie proapoptotyczne resweratrolu, zależne od p53, związane jest z aktywacją MAPK. Podczas gdy zastosowanie wyższych stężeń prowadzi do inhibicji transdukcji sygnału, tak użycie małych dawek resweratrolu (1pM-10μM) aktywuje MAPK [114]. Wykazano, że w nowotworowych komórkach prostaty, jajnika, piersi, głowy i szyi, resweratrol indukuje MAPK w wyniku czego następuje fosforylacja p53 [115-118]. Proces fosforylacji seryny 15 w białku p53 może natomiast hamować MDM2 i wpływać w ten sposób na jego stabilizację. Ponadto, zaobserwowano, że w wyniku fosforylacji może dochodzić do acetylacji białka p53. Fosforylacja seryny w pozycji 15 lub 33 indukuje acetylację p53 przez acetylotransferazy: p300/CBP oraz p300/CBP-associated factor (PCAF). Proces acetylacji białka p53 zwiększa specyficzność jego wiązania do DNA [114]. Narayanan i wsp. (2003) wykazali w androgenozależnej linii komórkowej raka prostaty LNCaP, że resweratrol obniża ekspresję PSA (ang. *prostate-specific antigen*), ARA24 (koaktywator AR), NF-κB p65. Prowadzi to do indukcji aktywatorów p53 (ang. *p53-responsive genes*), tj.: PIG7, p21, p300/CBP, a także Apaf-1. Wykazano ponadto, że za proapoptotyczne, zależne od białka p53, działanie resweratrolu w komórkach LNCaP odpowiada głównie indukcja koaktywatora

p300/CBP [119]. Zhang i wsp. (2004) zaobserwowali natomiast w linii komórkowej raka piersi MCF-7, zdolność resweratrolu do aktywacji MAPK i fosforylacji białka p53 w pozycji Ser-15, Ser-20 oraz Ser-392, czego wynikiem jest acetylacja p53 [120].

Dane literaturowe z ostatniego roku, wykazujące zdolność resweratrolu do zwiększania stężenia ceramidów, podkreślają jego wartość jako czynnika proapoptotycznego. Kartal i wsp. (2011), a także Cakir i wsp. (2011) badali zdolność resweratrolu do indukcji apoptozy na drodze szlaku sfingomielinowo-ceramidowego, odpowiednio w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej K-562 [121] oraz ostrej białaczki mieloblastycznej HL60 [122]. Zaobserwowano, że resweratrol powoduje wzrost ekspresji genów uczestniczących w syntezie ceramidów (LASS, ang. *longevity assurance genes*), co skutkuje indukcją apoptozy [121, 122].

Pomimo pozytywnych wyników badań prowadzonych nad aktywnością przeciwnowotworową resweratrolu, możliwość jego klinicznego zastosowania jest ograniczona z uwagi na bardzo niską biodostępność.

1.7.3. Biodostępność i metabolizm resweratrolu

Wchłanianie resweratrolu zachodzi z udziałem jelita czczego i jelita krętego. Przystawalność resweratrolu, obecnego w diecie, zależy od formy (postać związana lub wolna), w jakiej dostaje się do układu pokarmowego. Resweratrol występuje głównie w postaci glikozydu. Proces glikozytacji wpływa na biodostępność resweratrolu ponieważ zwiększa jego rozpuszczalność, ułatwiając wchłanianie z jelit. Resweratrol może również występować, w małych ilościach, w formie niezwiązanej [123].

Wykazane w modelu eksperymentalnym *in vitro* protekcyjne działanie resweratrolu, ograniczane jest *in vivo* przez jego niską biodostępność (ok. 2%) spowodowaną szybką biotransformacją do siarczanów oraz, w mniejszym stopniu, do glukuronianów.

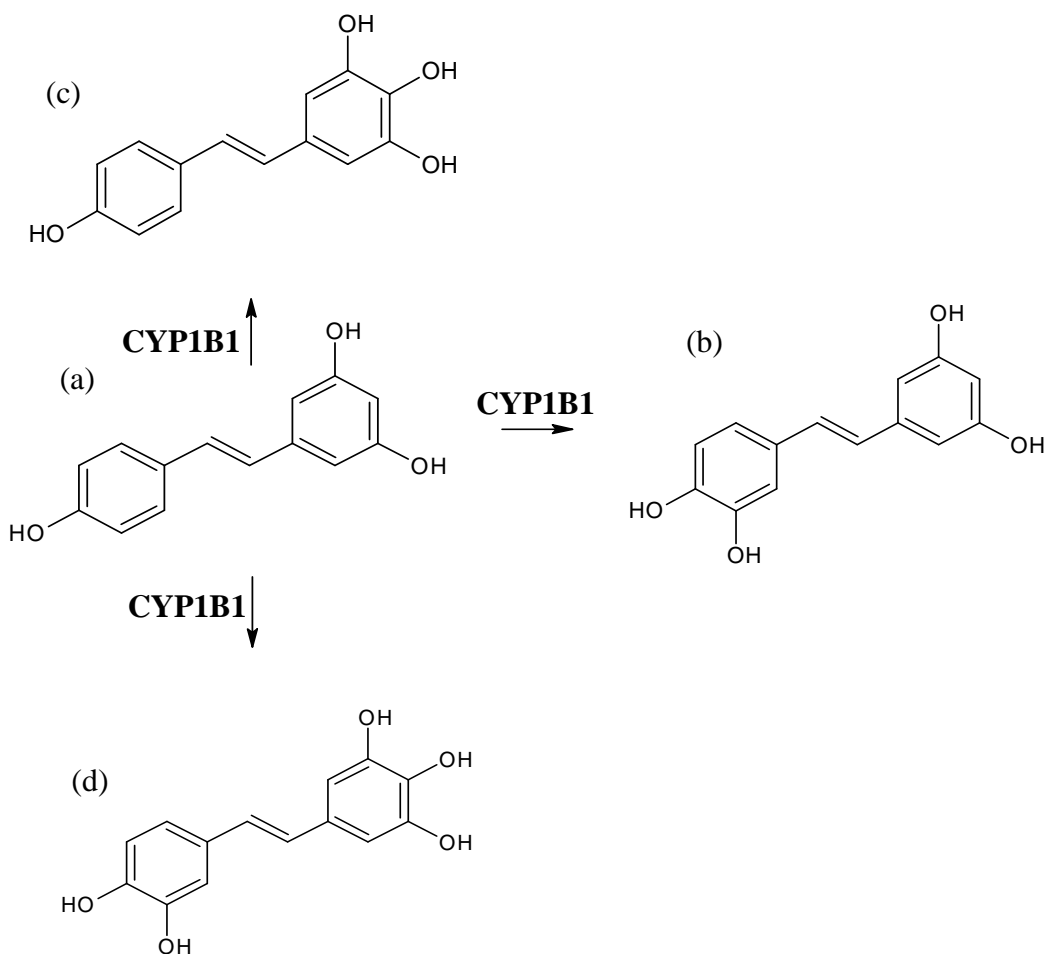
Goldberg i wsp. (2003) wykazali, że absorpcja resweratrolu z różnych matryc żywieniowych jest szybka, czemu towarzyszą wzmożone procesy metaboliczne. Po podaniu doustnym, resweratrol wykryto w surowicy i moczu, głównie w formie siarczanów i glukuronianów, osiągając maksymalne stężenie po upływie ok. 30 minut od momentu jego spożycia. W surowicy wykazano tylko śladowe ilości resweratrolu (10-40 nM) w porównaniu do stężenia, jakie używa się w celu badania jego aktywności biologicznej w warunkach eksperymentalnych *in vitro* (5-100 μ M) [124].

Eksperymenty wykonane na modelu zwierzęcym wskazują na niską biodostępność resweratrolu z powodu jego niemal całkowitego metabolizmu do: trans-resweratrol-3-O-glukuronidu oraz trans-resweratrol-3-O-siarczanu. Po podaniu (dożylnym i doustnym) myszom resweratrolu, stężenie trans-resweratrol-3-O-siarczanu było około trzy razy wyższe niż trans-resweratrol-3-O-glukuronidu. Resweratrol w postaci niezwiązanej występował natomiast w śladowych ilościach [125, 126]. Istotna rola procesu sprzęgania z kwasem siarkowym w metabolizmie resweratrolu została również potwierdzona w modelu szczurzych hepatocytów. Zaobserwowano bowiem, że metabolitem występującym w największym stężeniu jest również trans-resweratrol-3-O-siarczan [127]. Ponadto, badania Miksits i wsp. (2005) wskazały, że enzymami w cytozolu komórek ludzkiej wątroby odpowiedzialnymi za powstawanie trans-resweratrol-3-O-siarczanu są sulfotransferazy SULTs: SULT1A1, SULT1E1, SULT1A2 i 1A3 [128].

Proces sprzęgania z kwasem glukuronowym został prześledzony przez Maier-Salamon i wsp. (2006) w ludzkiej linii raka okrężnicy Caco-2. Metabolizm resweratrolu do trans-resweratrol-4'-O-glukuronidu (G1) i trans-resweratrol-3-O-glukuronidu (G2) katalizowany był głównie przez UGT, odpowiednio UGT1A9 dla G1 oraz UGT1A1 dla G2. Metabolitem o największym stężeniu był jednak monosiarczan. Zaobserwowano, że przy wyższych dawkach resweratrolu, powstawanie trans-resweratrol-3-O-siarczanu było hamowane. Ponadto, wykazano korelację pomiędzy procesem metabolizmu resweratrolu a jego ilością transportowaną przez warstwę komórek Caco-2. Zaobserwowano, że w przypadku zahamowania metabolizmu bądź wysycenia dróg metabolicznych, ilość transportowanego resweratrolu przez monowarstwę Caco-2 wzrastała 3,5-krotnie przy stężeniu resweratrolu 200 μ M. Wskazuje to na zależną od stężenia biotransformację resweratrolu w komórkach Caco-2. Należy więc rozważyć wykorzystanie takiej zależności w organizmie ludzkim, ze względu na zwiększenie biodostępności resweratrolu podanego doustnie [129].

Potter i wsp. (2002) wykazali, że metabolizm resweratrolu na drodze hydroksylacji zachodzi w komórkach nowotworowych z udziałem CYP1B1, którego ekspresja na poziomie białka nie występuje w komórkach zdrowych, a jedynie transformowanych nowotworowo. Wykazano obecność trzech metabolitów: piceatanolu (3,5,3',4'-tetrahydroksystylbenu), 3,4,5,4'-tetrahydroksystylbenu oraz 3,4,5,3',4'-pentahydroksystylbenu (ryc. 4). Metabolitem występującym w największym stężeniu był piceatanol - stylben poznany już wcześniej jako silny czynnik hamujący proliferację komórek nowotworowych. Wykazanie, że resweratrol jest biotransformowany do

substancji o potwierdzonej aktywności przeciwnowotworowej przez CYP1B1 stanowiło podwaliny nowego mechanizmu działania chemoprewencyjnego resweratrolu [130]. Piver i wsp. (2004) wykazali, że metabolizm resweratrolu, oprócz CYP1B1, zachodzi również z udziałem dwóch pozostałych enzymów z rodziny CYP1: CYP1A1 oraz CYP1A2. Zmniejszenie ilości powstających metabolitów resweratrolu w wyniku zastosowania inhibitorów CYP1A2 może świadczyć o jego kluczowym znaczeniu w biotransformacji resweratrolu do tetrahydroksystylbenu i piceatanolu [131].



Ryc. 4. Metabolizm (a) resweratrolu przez CYP1B1 do trzech metabolitów: (b) piceatanolu, (c) 3,4,5,4'-tetrahydroksystylbenu oraz (d) 3,4,5,3',4'-pentahydroksystylbenu

Wykazano, że resweratrol może wywierać działanie przeciwnowotworowe poprzez inhibicję enzymów z rodziny CYP, odpowiadających za biotransformację prokancerogenów. Już w 1999 roku Ciolino i wsp. zaobserwowali zdolność resweratrolu do hamowania ekspresji CYP1A1 poprzez oddziaływanie z miejscem wiązania AhR do promotora genu kodującego CYP1A1 [132]. Resweratrol może również powodować

inhibicję CYP1B1 (aktywatora prokancerogenów) na drodze opisanego powyżej procesu hydroksylacji do piceatanolu - metabolitu, który hamuje CYP1B1 [86].

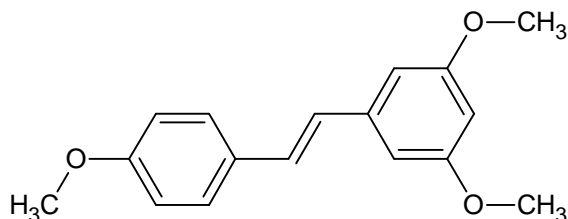
Szerokie spektrum działania chemoprewencyjnego resweratrolu jest ograniczone przez jego niską biodostępność. Badania nad możliwością zwiększenia biodostępności resweratrolu doprowadziły do syntezy nowych analogów, charakteryzujących się często silniejszym działaniem przeciwnowotworowym, jak i lepszymi parametrami farmakokinetycznymi.

1.7.4. Pochodne resweratrolu

Biologiczna aktywność resweratrolu, a także jego pochodnych zależy przede wszystkim od: (a) liczby i położenia grup hydroksylowych oraz metylowych, (b) występowania wiązań wodorowych, (c) stereoizomerii, oraz (d) występowania wiązań podwójnych [133].

1.7.4.1. Metylowe pochodne resweratrolu

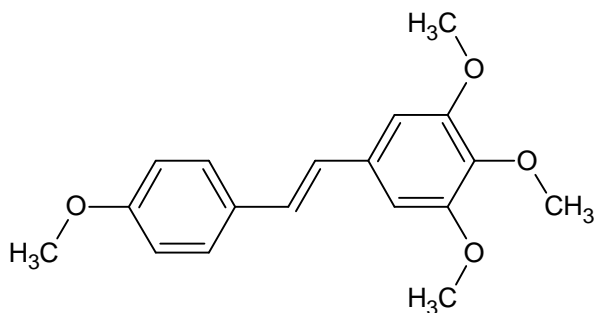
Przyłączenie grupy metylowej do struktury stylbenu powoduje zwiększenie lipofilności, a także biodostępności cząsteczki. Prowadzone badania nad zależnością pomiędzy strukturą cząsteczki a jej aktywnością biologiczną wykazały, że obecność grup metylowych w pozycji 3, 5 oraz 3, 4, 5 pierścienia fenyłowego może zwiększać działanie proapoptotyczne stylbenu [134]. Metylowe pochodne resweratrolu wydają się zatem być obiecującym narzędziem zarówno w profilaktyce, jak i leczeniu chorób nowotworowych. Badania nad aktywnością biologiczną 3,5,4'-trimetoksystylbenu wykazały, że jest silniej działającym, w porównaniu do resweratrolu, związkiem o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym [135-137]. Efekt działania 3,5,4'-trimetoksystylbenu (ryc. 5) w ludzkiej linii komórkowej raka okrężnicy Caco-2, jest 100-krotnie wyższy niż resweratrolu. Jego działanie cytotoksyczne wynika ze zmniejszania wewnątrzkomórkowej puli poliamin alifatycznych oraz zahamowania polimeryzacji tubulin [138].



Ryc. 5. Struktura 3,5,4'-trimetoksystylbenu

Pan i wsp. (2008) wykazali, że działanie 3,5,4'-trimetoksystylbenu jest silniejsze od resweratrolu, w dwóch pozostałych liniach komórkowych raka jelita grubego: HT29 ($IC_{50}=81,31 \mu M$) i COLO 205 ($IC_{50}=6,25 \mu M$) oraz komórkach raka prostaty PC3 ($IC_{50}=42,71 \mu M$). Jego działanie proapoptotyczne potwierdzono w komórkach COLO 205 poprzez uwalnianie cytochromu c, aktywację kaspaz oraz fragmentację DNA [136]. W badaniach Weng i wsp. (2009) wykazano zdolność 3,5,4'-trimetoksystylbenu do indukcji apoptozy również na drodze mechanizmu wewnątrzkomórkowego. W modelu eksperymentalnym *in vitro* raka płuca potwierdzono obniżenie potencjału błony mitochondrialnej, wzrost proporcji Bax/Bcl-2, aktywację kaspazy-9 i -3 [139]. Ponadto, 3,5,4'-trimetoksystylben wykazuje zdolność hamowania inwazji komórek gruczolakoraka płuca w wyniku fosforylacji JNK oraz p38 [140]. W modelu eksperymentalnym *in vitro* ludzkich linii limfoidalnych TK6 oraz NH32 z wyłączonym genem p53 (-/-) udowodniono, że działanie proapoptotyczne 3,5,4'-trimetoksystylbenu jest niezależne od p53 i prowadzi do aktywacji kaspazy-3 w obu badanych liniach komórkowych [141].

Wykazana zdolność 3,5,4'-trimetoksystylbenu do indukcji procesu apoptozy w komórkach nowotworowych przyczyniła się do syntezy nowej pochodnej resweratrolu: 3,4,4',5-tetrametoksystylbenu (3,4,4',5-TMS/ DMU-212) [142]. Wprowadzenie czterech grup metylowych, w wyniku zastąpienia grup hydroksylowych w strukturze resweratrolu oraz dodania jednej grupy metylowej w pozycji 4 pierścienia fenylowego (ryc. 6), prowadzi do zwiększenia biodostępności stylbenu [143].



Ryc. 6. Struktura 3,4,4',5-tetrametoksystylbenu

Badania Sale i wsp. (2004) wykazały, że stężenie podawanego w dawce $240 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ resweratrolu i 3,4,4',5-TMS było porównywalne w płucach i nerkach ($AUC_{0-120}=1,5 \text{ ang. area under the curve}$), w przedziale czasowym 0-120 minut. Stężenie 3,4,4',5-TMS było natomiast wyższe w mózgu, jelicie cienkim oraz błonie śluzowej jelita grubego. Struktura

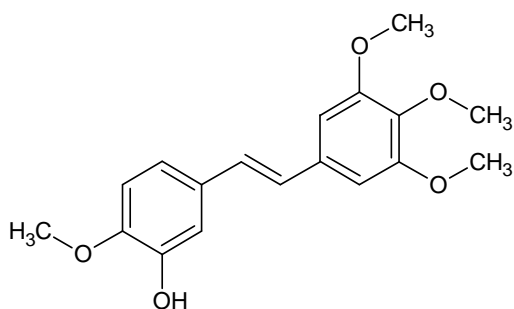
3,4,4',5-TMS warunkuje większą lipofilność, czego efektem jest zdolność przenikania bariery krew-mózg i biodostępność w mózgu. Wartości AUC dla 3,4,4',5-TMS w jelicie cienkim i okrężnicy były, w porównaniu do resweratrolu, 10- i 7-krotnie wyższe. Większa biodostępność spowodowana jest tym, że 3,4,4',5-TMS nie ulega reakcjom sprzęgania z kwasem siarkowym i glukuronowym z powodu obecności grup metylowych. 3,4,4',5-TMS jest natomiast biotransformowany do czterech głównych hydroksylowych oraz metylowych metabolitów: 3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystylben (DMU-214), 4'-hydroksy-3,4,5-trimetoksystylben (DMU-281), 4-hydroksy-3,5,4'-tri-metoksystylben (DMU-291) oraz 3-hydroksy-4,5,4'-trimetoksystylben (DMU-807) (ryc. 7) [143].

W modelu eksperymentalnym *in vivo* wykazano, że zamiana w cząsteczce resweratrolu grup hydroksylowych na metylowe oraz wprowadzenie dodatkowej grupy metylowej w pozycji 4 powoduje zniesienie hamowania ekspresji COX. Zaobserwowano jednakże zachowanie zdolności do modyfikowania poziomu prostaglandyny E2 (PGE-2, ang. *prostaglandin E2*). Wykazano, że 3,4,4',5-TMS powoduje obniżenie poziomu PGE-2, który koreluje ze zmniejszeniem rozmiarów guza [144].

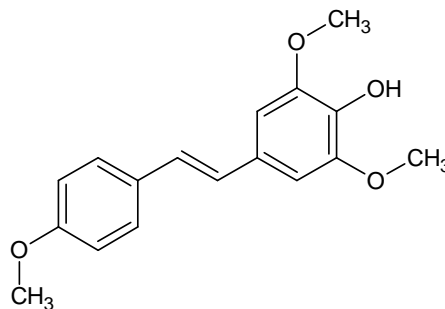
3,4,4',5-TMS hamuje proliferację nowotworowych linii komórkowych, nie wywierając wpływu na komórki zdrowe. IC₅₀ w linii komórkowej ludzkich fibroblastów WI38 wynosiło 50 µM, podczas gdy w komórkach transformowanych nowotworowo WI38VA wartość ta była 100-krotnie niższa. Udowodniono, że 3,4,4',5-TMS wykazuje zdolność indukcji procesu apoptozy wyłącznie w linii komórkowej WI38VA poprzez: (a) zwiększenie proporcji transkryptów Bax/Bcl-2, (b) wzrost poziomu białka p53 oraz Bax, (c) aktywację kaspaz, oraz (d) fragmentację DNA. W porównaniu do resweratrolu, powoduje on dużo szybciej agregację mitochondriów wokół jądra komórkowego. Obraz morfologiczny komórek WI38VA uległ zmianie już po trzech godzinach inkubacji. Zdolność 3,4,4',5-TMS do selektywnego działania proapoptotycznego, wyłącznie w komórkach nowotworowych może więc być wynikiem aktywacji szlaku wewnątrzkomórkowego [145].

3,4,4',5-TMS w ludzkich liniach komórkowych raka piersi MCF-7 oraz MDA-MB-435 wykazuje także silniejsze, w porównaniu do resweratrolu, działanie cytotoksyczne. Istotną różnicą wykazaną przez Ma i wsp. (2007) w indukcji procesu apoptozy jest zwiększona zdolność 3,4,4',5-TMS do wywoływania polimeryzacji tubuliny. Działanie 3,4,4',5-TMS w stężeniu 2,5µM jest porównywalne do efektów uzyskiwanych przez chemioterapeutyki w 4-krotnie wyższym stężeniu, tj. paklitaksel. Wyniki badań wskazują, że 3,4,4',5-TMS

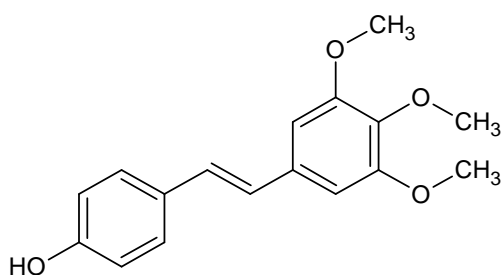
jest związkiem o potencjalnym, wielokierunkowym działaniu przeciwnowotworowym [146].



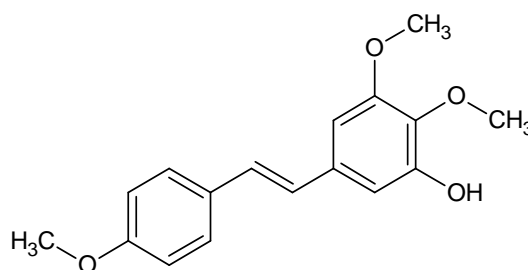
DMU-214



DMU-291



DMU-281

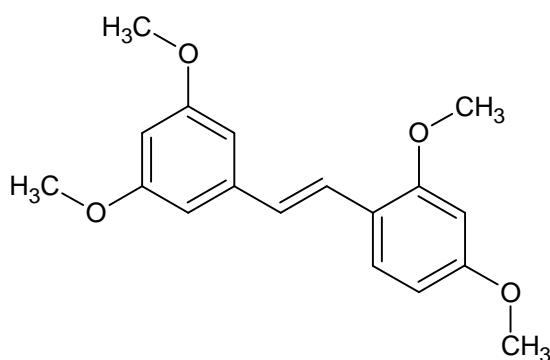


DMU-807

Ryc. 7. Metabolity 3,4,4',5-tetrametoksystylbenu

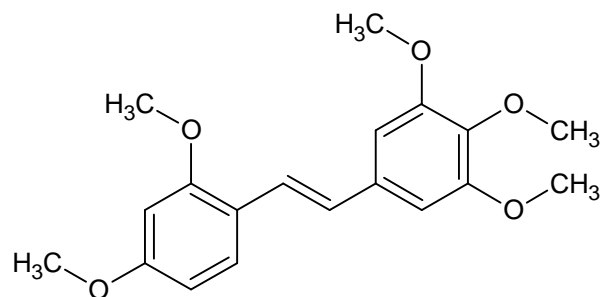
Przyłączenie grupy metylowej w pozycji 2 pierścienia fenyłowego może powodować zwiększenie selektywnego działania przeciwnowotworowego stylbenu jako inhibitora CYP1B1 [147]. Badania nad zdolnością 2,2',4,6'-tetrametoksystylbenu do hamowania CYP1B1 wykazały 175-krotnie większe działanie selektywne względem CYP1B1, w porównaniu do CYP1A1. Potwierdzono także, że zdolność 2,2',4,6'-tetrametoksystylbenu do hamowania CYP1B1 była 85-krotnie wyższa niż CYP1A2. Badany związek powodował obniżenie zarówno ekspresji, jak i aktywności CYP1B1, stając się cennym narzędziem, pomocnym w zdefiniowaniu właściwości tego izoenzymu [148]. Chun i wsp. (2001) wykazali, że selektywność działania 2,3',4,5'-tetrametoksystylbenu (TMS) (ryc. 8) w stosunku do CYP1B1 była 50-krotnie wyższa, w porównaniu do CYP1A1. Ponadto zaobserwowano, że jego zdolność inhibicji CYP1B1 była 500 razy wyższa niż CYP1A2 [149]. Wyniki badań Kim i wsp. (2002) również udowadniają, że zastąpienie w cząsteczce resweratrolu grupy hydroksylowej grupą

metylową w pozycji 2, zwiększa selektywność działania w stosunku do CYP1B1, w porównaniu do pozostałych izoenzymów CYP1. Wykazano, że TMS był najsilniej działającym inhibitorem CYP1B1 [150]. CYP1B1 został wykryty w 70% analizowanych prób guzów piersi. Ze względu na jego udział w procesie hydroksylacji estrogenów, będącym kluczowym etapem powstawania nowotworów zależnych od tych hormonów, metylowe analogi resweratrolu, tj. TMS są potencjalnym narzędziem w terapii nowotworów piersi. Chun i wsp. (2005) wykazali korelację pomiędzy proapoptotycznym działaniem TMS, a jego zdolnością do inhibicji CYP1B1 w ludzkiej linii komórkowej raka piersi MCF-7 [151]. Badania Park i wsp. (2007) przeprowadzono natomiast na nowotworowych komórkach piersi MCF-7 z wtórnie wytworzoną opornością na tamoxifen. Wykazano, że TMS powoduje zahamowanie polimeryzacji tubuliny oraz formowania mikrotubul, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, a w konsekwencji apoptozę. TMS hamuje również aktywność kinazy MAPK, FAK (ang. *focal adhesion kinase*), AKT i p38. Indukcja apoptozy dotyczyła 80%-90% komórek nowotworowych po 48 godzinach hodowli. Wyniki badań wskazują, że TMS może być związkiem wykorzystywanym w terapii przeciwnowotworowej kobiet, u których rozwinęła się oporność na hormonoterapię [147].



Ryc. 8. Struktura 2,3',4,5'-tetrametoksystylbenu

Opisywane w piśmiennictwie wyniki badań nad zdolnością metylowych pochodnych resweratrolu tj. TMS (2,3',4,5'-tetrametoksystylben) oraz 3,4,4',5-TMS (3,4,4',5-tetrametoksystylben) do indukcji procesu apoptozy, wskazują na ich potencjalne zastosowanie jako skutecznych związków chemoprewencyjnych. W świetle tych danych zsyntetyzowano związek 2,3',4,4',5'-pentametoksystylben (PMS), będący hybrydą TMS i 3,4,4',5-TMS (ryc. 9) [152].



Ryc. 9. Struktura 2,3',4,4',5'-pentametoksystylbenu

Badania Li i wsp. (2009) wykazały, że PMS indukuje proces apoptozy w ludzkiej linii komórkowej raka okrężnicy HT-29. Udowodniono jego zdolność do rozszczepienia polimerazy PARP (ang. *poly ADP-ribose polymerase*) oraz fragmentacji DNA. PMS zwiększa także polimeryzację mikrotubul, w wyniku czego dochodzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2/M i procesu apoptozy zależnego od kaspaz. Wykazano, że PMS jest zdolny do indukcji apoptozy poprzez aktywację kaspazy-3, -7, -8 oraz kaspazy-9, czemu towarzyszy obniżenie poziomu fosforylacji Akt [152]. Ponadto, Li i wsp. (2010) zbadali działanie chemoprewencyjne PMS w modelu eksperymentalnym *in vivo* kancerogenezy jelita grubego wywołanej przez AOM (ang. *azoxymethane*) oraz DSS (ang. *dextran sodium sulphate*). PMS podawany przez okres 16 tygodni myszom Balb/c w dawce 50 mg/kg m. c. hamował proliferację komórek raka okrężnicy, indukując jednocześnie proces apoptozy. Zaobserwowano niższy poziom fosforylacji AKT, inaktywację β -kateniny oraz obniżenie poziomu iNOS. Prowadzone równoległe badania *in vitro* na mysiej linii komórkowej gruczolakoraka jelita grubego Colon 26 również wykazały proapoptotyczne działanie PMS na drodze hamowania fosforylacji AKT oraz inaktywacji β -kateniny. Uzyskane wyniki w mysim modelu AOM/DSS mogą stanowić podwaliny skierowania PMS do dalszych badań klinicznych [134].

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Wśród wielu związków pochodzenia naturalnego wykazujących właściwości przeciwnowotworowe, szczególnie istotną rolę odgrywa resweratrol. Związek ten, zaklasyfikowany jako fitoaleksyna, posiada zdolność hamowania procesu nowotworowego na wszystkich trzech etapach jego rozwoju: inicjacji, promocji oraz progresji. Wykazuje ponadto właściwości antyoksydacyjne, przeciwmiażdżycowe i neuroprotektoryjne. Najbogatszym źródłem resweratrolu w diecie człowieka są winogrona oraz czerwone wino, którego działanie kardioprotekcyjne związane jest, jak się uważa, z zawartością tego naturalnego stylbenu. Pomimo intensywnych badań prowadzonych nad biologiczną aktywnością resweratrolu, jego zastosowanie jako czynnika chemoprewencyjnego jest często poddawane w wątpliwość z uwagi na bardzo niską biodostępność. Badania nad możliwością zwiększenia biodostępności resweratrolu doprowadziły do syntezy nowych pochodnych, charakteryzujących się często nie tylko lepszymi parametrami farmakokinetycznymi, ale i silniejszym działaniem przeciwnowotworowym. Wprowadzenie grup metylowych do pierścienia fenyloвого może zwiększać stabilność stylbenu, czyniąc go mniej podatnym na działanie enzymów II fazy biotransformacji ksenobiotyków i opóźniając w ten sposób eliminację z organizmu. Zmiana podstawowej struktury stylbenu poprzez przyłączenie grup metylowych może prowadzić również do zwiększonej lipofilności, biodostępności oraz selektywności działania przeciwnowotworowego. W świetle przytoczonych danych, można stwierdzić, że poszukiwanie metylowych analogów resweratrolu jest uzasadnioną próbą wytypowania potencjalnie skutecznych środków chemoprewencyjnych.

Celem pracy jest wykazanie działania przeciwnowotworowego, wybranego spośród 12 pochodnych, metylowego analogu resweratrolu w modelach eksperymentalnych *in vitro* oraz *in vivo*.

Celem części eksperymentalnej *in vitro* jest:

- wyselekcjonowanie odpowiedniego metylowego analogu resweratrolu o najwyższej aktywności cytotoksycznej,
- wybór nowotworowej linii komórkowej o największej i najmniejszej wrażliwości na wybraną metylową pochodną resweratrolu,
- próba wyjaśnienia mechanizmu działania przeciwnowotworowego wybranej metylowej pochodnej resweratrolu poprzez indukcję procesu apoptozy na drodze:

1. zmian ekspresji genów, których produkty białkowe uczestniczą w regulacji szlaku receptorowego i mitochondrialnego apoptozy,
2. obniżenia ekspresji mRNA i białka izoform cytochromu P450: CYP1B1 oraz CYP1A1,
3. indukcji stresu oksydacyjnego.

Celem części eksperymentalnej *in vivo* jest weryfikacja działania przeciwnowotworowego wybranego metylowego analogu resweratrolu w modelu mysich ksenograftów SCID, którym zostały wszczepione, najbardziej wrażliwe na wybrany związek, ludzkie komórki nowotworowe. Cel został zrealizowany poprzez porównanie rozmiarów guza pomiędzy grupą kontrolną a grupą badaną, otrzymującą wyselekcjonowaną metylową pochodną resweratrolu.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Odczynniki i sprzęt

3.1.1. Hodowla komórek

Materiał:

- trzy ludzkie linie komórkowe raka piersi: MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-157,
- dwie ludzkie linie komórkowe raka jelita grubego: LOVO, DLD-1,
- dwie ludzkie linie komórkowe raka jajnika: A-2780, SKOV-3,
- dwie ludzkie linie komórkowe raka płuc: CALU-1, A-549,
- dwie ludzkie linie komórkowe raka szyjki macicy: HeLa, C33A (tab. 1).

Badane związki:

- 3,4,4',5'-tetrametoksystylben (3,4,4',5'-TMS), 3,3',4,5'-tetrametoksystylben (3,3',4,5'-TMS), 3,3',5,5'-tetrametoksystylben (3,3',5,5'-TMS), 3',4,4',5-tetrametoksystylben (3',4,4',5-TMS), 2',3,4,4'-tetrametoksystylben (2',3,4,4'-TMS), 2',3,4,4',5'-pentametoksystylben (2',3,4,4',5'-PMS), 2',3,3',4-tetrametoksystylben (2',3,3',4-TMS), 2',3,3',4,4'-pentametoksystylben (2',3,3',4,4'-PMS), 3,4',5-trimetoksystylben (3,4',5-tMS), 3,4,4',5-tetrametoksystylben (3,4,4',5-TMS), 3,3',4,5,5'-pentametoksystylben (3,3',4,5,5'-PMS), 3,3',4,4',5,5'-heksametoksystylben (3,3',4,4',5,5'-HMS) (tab. 2).

Odczynniki:

- DMEM, RPMI, McCoy's, F-12 K, ABAM (100 U/ml penicyliny, 1mg/ml streptomycyny, 100 U/ml nystatyny), L-glutamina, płodowa surowica bydlęca FBS (ang. *fetal bovine serum*), PBS (ang. *phosphate buffered saline*), trypsyna-EDTA, dimetylosulfotlenek DMSO (ang. *dimethyl sulfoxide*), Trypan blue (Sigma-Aldrich, USA).

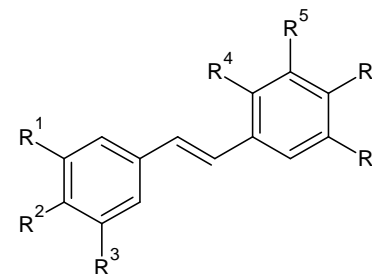
Sprzęt:

- płytki do hodowli komórkowych 6-, 24-, 96-dołkowe, butelki hodowlane o pow. 25 cm², 75 cm² i 175 cm², polipropylenowe probówki wirówkowe 15 ml i 50 ml, płytki Petriego ϕ 10 cm (Corning Inc., USA),
- pipety Pasteura (Medlab, Polska),
- pipety 10 ml i 25 ml (BD Biosciences, USA),
- probówki do zamrażania komórek (Nalgene Comp., USA),

- pompa próżniowa Biochem-VaccuCenter BVC 21 (Vaccubrandt, Niemcy),
- komora laminarna Bio-Ban 48 (Dow Chem. Comp., Włochy),
- inkubator, model 490-1CE (LabLine Instruments Inc., USA),
- mikroskop świetlny TS 100, kamera Digital Sight Camera System (Nikon, Japonia).

Tab. 1. Badane linie komórkowe

Ludzka linia komórkowa:	Pochodzenie linii komórkowej	Hodowla komórkowa, rodzaj	Cecha charakterystyczna linii komórkowej	Medium hodowlane
- raka piersi MCF-7	Tkanka nabłonkowa izolowana z wysięku płucnego	adherentna	- ekspresja receptora estrogenowego, ER+ - brak ekspresji kaspazy 3	DMEM+10%FBS+2,5mM L-glutamina
- raka piersi MDA-MB-231	Tkanka nabłonkowa izolowana z wysięku płucnego	adherentna	- brak ekspresji receptora estrogenowego, ER- - ekspresja TGF α	RPMI+10%FBS+2,5mM L-glutamina
- raka piersi MDA-MB-157	Tkanka nabłonkowa izolowana ze szpiku kostnego	adherentna	- brak ekspresji receptora estrogenowego, ER- - ekspresja onkogenu WNT7B	RPMI+10%FBS+2,5mM L-glutamina
- raka jelita grubego LoVo	Tkanka nabłonkowa izolowana z węzła chłonnego	adherentna	- ekspresja onkogenów: c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, Myb, sis, fos	DMEM+10%FBS+2,5mM L-glutamina
- raka jelita grubego DLD-1	Tkanka nabłonkowa izolowana z gruczolaka okrężnicy	adherentna	- ekspresja p53, mutacja C241T skutkująca zamianą seryny na fenyloalaninę	DMEM+10%FBS+2,5mM L-glutamina
- raka jajnika SKOV-3	Tkanka nabłonkowa izolowana z wodobrzusza	adherentna	- oporność na działanie TNF, cisplatyny oraz adriamycyny - wrażliwa na paklitaksel	DMEM+10%FBS+2,5mM L-glutamina
- raka jajnika A-2780	Tkanka nabłonkowa izolowana z guza jajnika	adherentna	- wrażliwa na doksorubicynę, taksol, etopozyd, winkrystynę	DMEM+10%FBS+2,5mM L-glutamina
- raka płuc CALU-1	Tkanka nabłonkowa izolowana z opłucnej	adherentna	- ekspresja onkogenu K-ras	McCoy's+10%FBS+2,5mM Lp glutamina
- raka płuc A-549	Tkanka nabłonkowa izolowana z gruczolaka płuca	adherentna	- synteza nienasyconych kwasów tłuszczowych prowadząca do rozkładu cytydino-difosfocholiny	F-12K+10%FBS+2,5mM L-glutamina
- raka szyjki macicy HeLa	Tkanka nabłonkowa izolowana z gruczolaka szyjki macicy	adherentna	- zawierają sekwencje wirusa HPV-18 - niska ekspresja p53 - prawidłowy profil ekspresji genu supresorowego pRB	DMEM+10%FBS+2,5mM L-glutamina
- raka szyjki macicy C33A	Tkanka nabłonkowa izolowana z gruczolaka szyjki macicy	adherentna	- brak sekwencji wirusa HPV-18 - zwiększona ekspresja p53 - nieprawidłowy profil ekspresji pRB	DMEM+10%FBS+2,5mM L-glutamina



Tab. 2. Struktura badanych metylowych pochodnych resweratrolu

Nazwa związku	Poz. 3 (=R ¹)	Poz. 4 (=R ²)	Poz. 5 (=R ³)	Poz. 2' (=R ⁴)	Poz. 3' (=R ⁵)	Poz. 4' (=R ⁶)	Poz. 5' (=R ⁷)
3,4,4',5'-TMS	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃
3,3',4,5'-TMS	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃
3,3',5,5'-TMS	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃
3',4,4',5-TMS	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H
2',3,4,4'-TMS	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H
2',3,4,4',5'-PMS	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃
2',3,3',4-TMS	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H
2',3,3',4,4'-PMS	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H
3,4',5-tMS	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H
3,4,4',5-TMS	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H
3,3',4,5,5'-PMS	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃
3,3',4,4',5,5'-HMS	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃

3.1.2. Test MTT

Odczynniki:

- DMEM, FBS, ABAM, MTT, DMSO (Sigma-Aldrich, USA).

Sprzęt:

- wyrząsarka płytek DTS-4 (Sky Line, Łotwa),
- czytnik płytek Elx-800 (BioTek, USA).

3.1.3. Test ELISA

Odczynniki:

- Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, kit w skład którego wchodzi: przeciwciało anty-histon znakowane biotyną, przeciwciało anty-DNA sprzężone z HRP, kontrola pozytywna, bufor do inkubacji, bufor lizujący, bufor do substratu, substrat ABTS w tabletkach, roztwór ABTS STOP, płytki z streptawidyną (Roche Diagnostics, Niemcy),
- PBS (Sigma-Aldrich, USA).

Sprzęt:

- wyrząsarka płytek DTS-4 (Sky Line, Łotwa),
- czytnik płytek Elx-800 (BioTek, USA).

3.1.4. Oznaczenie aktywności kaspazy 3 oraz 7

Odczynniki:

- Caspase-Glo[®] 3/7 Assay Kit (ProMega, USA),
- płytki 96-dołkowe (Corning Inc., USA).

Sprzęt:

- luminescencyjny system wizualizacji IVIS[®] Spectrum (Xenogen, USA)

3.1.5. Detekcja stresu oksydacyjnego przy użyciu diocjanu 2'-7'-dichlorofluorescyny (H₂DCF-DA)

Odczynniki:

- H₂DCF-DA, Hank's balanced salt solution (HBSS) (Sigma-Aldrich, USA),
- etanol (POCh, Polska).

Sprzęt:

- mikroskop fluorescencyjny z odwróconą fazą TS 100, kamera Digital Sight Camera System (Nikon, Japonia).

3.1.6. Cytometria przepływowa**Odczynniki:**

- PBS, jodek propidyny, rybonukleaza A (Sigma-Aldrich, USA),
- etanol (POCh, Polska).

Sprzęt:

- cytometr przepływowy FACSCanto (Becton Dickinson Biosciences, USA).

3.1.7. Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja**Odczynniki:**

- TRIzol G (Applichem, Niemcy),
- chloroform, izopropanol, etanol (POCh, Polska),
- Quant-iTTM RNA Assay Kits (Invitrogen, USA),
- zestaw do odwrotnej transkrypcji, w skład którego wchodzi: 5xFirst Strand Buffer, 0,1 M DTT, odwrotna transkryptaza SuperScriptTM II Reverse Transcriptase 200 U/μl, inhibitor rybonukleaz Rnase OUT 40 U/μl (Invitrogen, USA),
- heksamery, oligo-dT, dNTP 25mM (Novazym, Polska).

Sprzęt:

- probówki 0,2 ml oraz 1,7 ml (Axygen, USA),
- QubitTM Fluorometer (Invitrogen, USA),
- termoblok TS-100C (Biosan, Łotwa).

3.1.8. Amplifikacja cDNA**3.1.8.1. Amplifikacja cDNA za pomocą metody RT-qPCR (ang. *Real-time quantitative PCR*)****Odczynniki:**

- LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics, Niemcy).

Startery:

Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN, Warszawa
(tab. 3).

Sondy:

Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche Diagnostics, Niemcy) (tab. 3).

Sprzęt:

- LightCycler® Instrument 480 Multiwell Plate 96 (Roche Diagnostics, Niemcy),
- płytki LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Roche Diagnostics, Niemcy).

Tab. 3. Startery i sondy wykorzystane w reakcji RT-qPCR

Gen	Sekwencja (kierunek 5'-3')	Nr sondy	Nr NCBI	Produkt (pz)
CYP1A1	5' ggggcgttgtctttgtaa 3' 5' tgggttgacccatagcttct 3'	59	NM_000499.3	64 pz
CYP1B1	5' ggcattagagtcaactacacaaaagc 3' 5' gaatggcaagtgccaaaaa 3'	61	NM_000104.3	67 pz
AhR	5' ggaggttgagagccaag 3' 5' acggagtctcggctattgc 3'	19	NM_001621.4	62 pz
ACTB	5' aagtccttgccatcctaaaa 3' 5' atgctatcacctcccctgtg 3'	55	NM_001101.3	91 pz
GAPDH	5' ctctgctctcctgttegac 3' 5' acgaccaaaccggtgactc 3'	60	NM_002046.3	112 pz

3.1.8.2. Amplifikacja cDNA za pomocą metody PCR-array**Odczynniki:**

- LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics, Niemcy),
- RealTime ready Human Apoptosis Panel 96, (Roche Diagnostics, Niemcy).

Sprzęt:

- LightCycler® Instrument 480 Multiwell Plate 96 (Roche Diagnostics, Niemcy).

3.1.9. SDS-PAGE i Western blotting**Odczynniki:**

- RIPA (Sigma-Aldrich, USA),
- Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad, USA),

- przeciwciała: przeciwciało królicze I-rzędowe anti-CYP1B1 (rabbit polyclonal IgG, sc-32882), przeciwciało królicze I-rzędowe anti-CYP1A1 (rabbit polyclonal IgG, sc-20772), przeciwciało mysie I-rzędowe anti-AhR (mouse monoclonal IgG_{2b}, sc-133088), przeciwciało II-rzędowe skierowane przeciw γ -globulinie króliczej, skoniugowane z peroksydazą chrzanową (goat anti-rabbit IgG-HRP, sc-2004), przeciwciało II-rzędowe skierowane przeciw γ -globulinie mysiej, skoniugowane z peroksydazą chrzanową (rabbit anti-mouse IgG-HRP, sc-3589), anti- β -aktyna (goat polyclonal IgG-HRP, sc-1616), (SantaCruz Biotechnology, USA),
- żel PAA (Sigma-Aldrich, USA),
- Immun-Blot PVDF Membrane (Bio-Rad, USA)
- klisza rentgenowska (Kodak, USA),
- Super Signal West Femto (Thermo Scientific, USA).

Sprzęt:

- Mini-PROTEAN Electrophoresis System (Bio-Rad, USA).

3.1.10. Transfekcja komórek raka jajnika A-2780

Odczynniki:

- plazmid pcDNA 3.1 (zeo-) – Luc, zawierający gen lucyferazy pod kontrolą promotora CMV,
- plazmid kontrolny pcDNA 3.1 (zeo-) – GFP,
- Lipofectamine LTX, PLUS reagent (Invitrogen, USA),
- Zeocin (Invitrogen, USA).

Sprzęt:

- płytki 96-, 48-, 24-, 6- dołkowe, płytki Petriego ϕ 10 cm (Corning Inc., USA),
- luminescencyjny system wizualizacji IVIS® Spectrum (Xenogen, USA).

3.1.11. Model eksperymentalny mysich ksenograftów SCID (ang. *severe combined immunodeficiency*)

Materiał:

- komórki A-2780 transfekowane plazmidem pcDNA 3.1 (zeo-) – Luc,
- myszy SCID (samce, n=10).

Odczynniki:

- lucyferyna (Potassium Luciferin, 1g) (Gold Biotechnology, USA),
- płyn wziewny do znieczulenia ogólnego Forane (Abbott, USA).

Opis zwierząt:

Myszy z wrodzonym defektem odporności SCID, pozbawione funkcjonalnych limfocytów B i T.

Pochodzenie:

Autosomalna, recesywna mutacja genu *scid* została wykryta w 1980 roku we wsobnym szczepie (C.BKa-Ighb/Icr, znanym jako C.B-17). Myszy SCID są to homozygoty z mutacją SCID, które określone zostały jako koizogeniczna linia szczepu C.B-17.

Kolor sierści: Albino

Wiek: 7 tygodni

Kraj pochodzenia: Niemcy

Sprzęt do wizualizacji guza:

- luminescencyjny system wizualizacji IVIS® Spectrum (Xenogen, USA).

3.1.12. Oprogramowanie

- KC Junior v 1.4.1.8 - program sterujący czytnikiem BioTek Elx-800,
- ChemSketch Freeware 11, Advanced Chemistry Development,
- MS Excel 2007,
- GraphPad v. 5.0 - program użyty do sporządzenia wykresów oraz analizy statystycznej, (GraphPad Prism Software, USA),
 - Nikon Basic Research, Nikon Imaging Software, program użyty do cyfrowej analizy zdjęć z mikroskopu Nikon TS100 (Nikon, Japonia),
- Living Image 3.1 Caliper Life Sciences 2007, program współpracujący z luminescencyjnym systemem wizualizacji IVIS® Spectrum (Xenogen, USA).

3.2. Metody

3.2.1. Hodowla komórek

Komórki (tab. 1) hodowano w butelkach o powierzchni 25 cm², 75 cm² lub 175 cm². Optymalne warunki hodowlane, tj. temperatura 37°C, 100% wilgotność i 5% CO₂, utrzymywano przy pomocy inkubatora - model 490-1CE (LabLine Instruments Inc., USA).

Jako medium hodowlane zastosowano, zależnie od rodzaju komórek, pożywkę DMEM, RPMI, McCoy's lub F-12 K uzupełnioną o 2,5 mM L-glutaminę oraz 10% FBS. W celu uniknięcia zakażenia hodowli, do medium dodawano mieszaninę antybiotyków i antymykotyku (ABAM, 100 U/ml penicyliny, 1mg/ml streptomycyny, 100 U/ml nystatyny).

Po uzyskaniu pożądanej liczby, komórki przemywano dwukrotnie buforem fosforanowym PBS, a następnie odtrawiano od podłoża za pomocą 10% trypsyny/EDTA. Działanie trypsyny hamowano poprzez dodanie FBS.

Komórki zliczano z użyciem komory Bürkera i mikroskopu świetlnego, a następnie rozcieńczano do odpowiedniego stężenia. Pasaże komórek przeprowadzano w warunkach jałowych, w komorze z przepływem laminarnym. W celu wykonania testu MTT, testu ELISA oraz oznaczenia aktywności kaspazy 3 i 7, komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe (Corning Inc., USA), w liczbie 20 000 komórek/dołek. W przypadku detekcji stresu oksydacyjnego, komórki wysiewano na płytki Petriego ϕ 10 cm (Corning Inc., USA) w ilości 1 miliona komórek/dołek. W doświadczeniach, w których określano natomiast wpływ 3,4,4',5-TMS na ekspresję badanych genów, komórki wysiewano na płytki 6-dołkowe (Corning Inc., USA), w liczbie 1 miliona komórek/dołek. Komórki A-2780, które wszczepiono myszom transgenicznym SCID hodowano w butelkach 175 cm² (Corning Inc., USA) do momentu uzyskania liczby 30 milionów (3 mln/1 mysz).

3.2.2. Ocena cytotoksyczności badanych związków za pomocą testu MTT

Test MTT opiera się na zdolności dehydrogenazy mitochondrialnej, w żywych komórkach, do redukcji pomarańczowej soli tetrazolowej (MTT) do fioletowego formazanu.

Komórki (tab. 1) wysiewano na płytki 96-dołkowe (Corning Inc., USA), w ilości 20 000 komórek/dołek. Po upływie 24 godz. i 72 godz. ściągano medium i dodawano roztwory badanych związków (tab. 2) o stężeniu 10 μ M. Po 24- i 72- godzinnej inkubacji,

medium z badanymi związkami ściągano, a następnie dodawano 150 μ l medium oraz 20 μ l MTT w PBS o stężeniu 5mg/ml. Po upływie 4 godz. komórki wirowano 3 min./200xg/21°C, ściągano dodany uprzednio roztwór MTT, po czym dodawano 200 μ l DMSO (Sigma-Aldrich, USA). Absorbancję mierzono z użyciem czytnika płytek Elx-800 (BioTek, USA), przy długości fali 570 nm (długość fali referencyjnej – 650 nm). Do dalszych etapów badań wybrano 3,4,4',5-TMS oraz wyselekcjonowano linię komórkową o największej wrażliwości na badany związek: linię raka jajnika-A2780, a także linię komórkową wywodzącą się z tego samego nowotworu-SKOV3, charakteryzującą się dużo mniejszą wrażliwością na 3,4,4',5-TMS. Komórki A-2780 oraz SKOV-3 wysiewano na płytki 96-dołkowe (Corning Inc., USA), w ilości 20 000 komórek/dołek. Po upływie 24 godz. ściągano medium i dodawano 3,4,4',5-TMS o stężeniu: 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M. Po upływie 24 godzin oraz 72 godzin od momentu dodania 3,4,4',5-TMS, ściągano medium z 3,4,4',5-TMS, a następnie dodawano 150 μ l medium oraz 20 μ l MTT rozpuszczonego w PBS o stężeniu 5mg/ml. Po upływie 4 godz. komórki wirowano 3 min./200xg/21°C, ściągano dodany uprzednio roztwór MTT, po czym dodawano 200 μ l DMSO (Sigma-Aldrich, USA). Absorbancję mierzono z użyciem czytnika płytek Elx-800 (BioTek, USA), przy długości fali 570 nm (długość fali referencyjnej – 650 nm).

3.2.3. Ocena zdolności 3,4,4',5-TMS do indukcji apoptozy

Zdolność 3,4,4',5-TMS do indukcji apoptozy w komórkach A-2780 oraz SKOV-3 określano z wykorzystaniem zestawu Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics, Polska). Test opiera się na enzymatycznej reakcji immunoprecypitacji z wykorzystaniem mysich przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciw DNA i histonom. Pozwala to na oznaczenie mono- i oligonukleosomów we frakcji cytozolowej lizatów komórkowych. Lizat nanoszony jest na płytkę ze streptawidyną, po czym dodaje się mieszaninę przeciwciał anti-DNA i anti-histony. Podczas inkubacji przeciwciała anti-histony wiążą się z histonową komponentą nukleosomów, tworząc immunokompleks z umieszczoną na płytce biotynylowaną streptawidyną. Jednocześnie przeciwciało anti-DNA znakowane peroksydazą chrzanową (HRP, ang. *hourse radish peroxidase*) łączy się z komponentą DNA nukleosomów. Ostatnim etapem jest pomiar spektrofotometryczny umożliwiający określenie ilości powstałych kompleksów anti-histony: histony oraz anti-DNA: DNA.

Komórki A-2780 oraz SKOV-3 wysiewano na płytki 96-dołkowe (Corning Inc., USA), w ilości 20 000 komórek/dołek. Po upływie 24 godz. ściągano medium i dodawano roztwór 3,4,4',5-TMS w DMEM o stężeniu 5 μ M oraz 10 μ M. Komórki inkubowano z badanym związkami przez 24 godz., po czym ściągano supernatant w celu oznaczenia ilości komórek nekrotycznych, a komórki zawieszano w 200 μ l buforu lizującego i inkubowano przez 30 minut. Płytki z lizatem wirowano (200x g, 10 min., 21°C), po czym pobierano 20 μ l supernatantu i przenoszono na płytkę znakowaną streptawidyną. Do każdego dołka dodano 80 μ l przygotowanego uprzednio immunoreagentu (4 μ l przeciwciała anti-histon znakowanego biotyną: Anti-histone-biotin; 4 μ l przeciwciała anti-DNA sprzężonego z HRP: Anti-DNA-POD; 72 μ l buforu do inkubacji: Incubation Buffer). Płytkę wytrząsano przez 2 godz. (300 rpm, 21°C) w celu związania przeciwciał, po czym usuwano supernatant i przemywano trzykrotnie buforem do inkubacji. Dodano wówczas po 100 μ l roztworu ABTS w celu identyfikacji związanych przeciwciał i wytrząsano przez 20 min. (300 rpm, 21°C). Zatrzymywano następnie reakcję poprzez dodanie 100 μ l roztworu ABTS Stop Solution. Absorbancję mierzono z wykorzystaniem czytnika płytek Elx-800 (BioTek, USA), przy długości fali $\lambda=405$ nm i $\lambda=490$ nm, wobec mieszaniny zawierającej 100 μ l roztworu ABTS oraz 100 μ l roztworu ABTS Stop Solution jako tło. Ilość komórek apoptotycznych oraz ilość komórek nekrotycznych wyrażono za pomocą współczynnika EF (ang. *enrichment factor*), obliczonego wg wskazań producenta.

3.2.4. Oznaczenie aktywności kaspazy 3 oraz 7

Metoda opiera się na luminescencyjnej reakcji lucyferazy, której nasilenie jest wprost proporcjonalne do aktywności kaspazy 3 oraz 7.

Komórki A-2780 oraz SKOV-3 wysiewano na płytki 96-dołkowe (Corning Inc., USA), w ilości 20 000 komórek/dołek. Po upływie 24 godz. ściągano medium i dodawano roztwór 3,4,4',5-TMS o stężeniu 5 μ M oraz 10 μ M. Komórki inkubowano przez 24 godz., po czym ściągano medium z badanym związkiem i dodawano odczynnik Caspase-Glo[®] 3/7 (Promega, USA). Komórki delikatnie wytrząsano (300 rpm, 21°C), inkubowano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej, a następnie mierzono luminescencję z wykorzystaniem systemu wizualizacji IVIS[®] Spectrum (Xenogen, USA).

3.2.5. Detekcja stresu oksydacyjnego przy użyciu H₂DCF-DA

Metoda opiera się na zdolności esteraz wewnątrzkomórkowych do hydrolizy grup acetylowych H₂DCF-DA, w wyniku której powstaje 2',7'-dichlorodihydrofluoresceina (H₂DCF). H₂DCF, ulegając utlenieniu, przekształca się w fluorescencyjny produkt - 2',7'-dichlorofluoresceinę (DCF), będącą markerem stresu oksydacyjnego.

Komórki A-2780 oraz SKOV-3 wysiewano na płytce Petriego ϕ 10 cm (Corning Inc., USA) w ilości 1 miliona komórek/dołek. Po upływie 24 godz. ściągano medium i przemywano dwukrotnie komórki buforem HBSS (Sigma-Aldrich, USA). Następnie dodawano do komórek 1 ml HBSS i 10 μ l H₂DCF-DA rozcieńczonego buforem HBSS w stosunku 1:100. Po półgodzinnej inkubacji bez dostępu światła, komórki ponownie przemywano dwukrotnie buforem HBSS, po czym dodawano: (1) 1 ml HBSS i 1 μ l 3,4,4',5-TMS o stężeniu 5 μ M, (2) 1 ml HBSS i 1 μ l 3,4,4',5-TMS o stężeniu 10 μ M. Do próby kontrolnej dodano 1 ml HBSS i 1 μ l DMSO (Sigma-Aldrich, USA). Komórki inkubowano przez 30 min., po czym zmierzono intensywność fluorescencji w poszczególnych próbach.

3.2.6. Cytometria przepływowa

Komórki A-2780 oraz SKOV-3 wysiewano na płytce Petriego ϕ 10 cm (Corning Inc., USA) w liczbie 1 miliona komórek/dołek. Po upływie 24 godz. ściągano medium i dodawano roztwór 3,4,4',5-TMS w DMEM o stężeniu 5 μ M i 10 μ M. Po 24 godzinnej inkubacji, komórki odtrawiano, przemywano dwukrotnie buforem PBS (Sigma-Aldrich, USA), a następnie zawieszano w 70% etanolu (POCH, Polska) w celu utrwalenia komórek. Przygotowane w ten sposób próby przechowywano w temp. -20°C do momentu dalszej analizy. Po rozmrożeniu, próby wirowano przez 10 min. 3000 obr./min., po czym powstały osad przemywano dwukrotnie buforem PBS i ponownie wirowano. Do otrzymanego osadu komórek dodawano wówczas 5 μ l roztworu jodku propidyny (Sigma-Aldrich, USA) oraz 2 μ l RNAzy A (Sigma-Aldrich, USA). Po półgodzinnej inkubacji mierzono fluorescencję przy długości fali wzbudzenia = 535 nm i długości fali emisji = 617 nm.

3.2.7. Izolacja RNA

Całkowity RNA izolowano według zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego i Sacchi [153]. Po inkubacji z 3,4,4',5-TMS komórki poddawano lizie mieszaniną fenolu i izotiocyanianu guanidyny (1 ml) (TRIitydG, Applichem). Do prób dodawano następnie chloroform w objętości równej 1/5 objętości odczynnika TRIitydG (200 μ l). Próby intensywnie mieszano i inkubowano 5 minut na lodzie, po czym wirowano przez 15 minut, w temperaturze 4°C, 15000xg. W wyniku wirowania próby rozdzielały się na trzy warstwy; (1) fazę wodną (zawierającą RNA), (2) fazę pośrednią (interfazę, zawierającą DNA) oraz (3) fazę fenolowo-chloroformową (zawierającą białka i struktury subkomórkowe). Do dalszej izolacji pobierano 500 μ l fazy wodnej i przenoszono do nowych probówek. RNA wytrącano przez dodanie izopropanolu (POCh, Polska) w stosunku objętościowym 1:1. Próby mieszano i umieszczano w temperaturze -80°C. Po upływie 24 godz. wytrącony RNA wirowano 15 minut, 4°C, 15000xg. Usuwano supernatant, a powstały osad RNA przemywano dwukrotnie schłodzonym 75% etanolem (POCh, Polska), po czym wirowano 15 minut, 4°C, 15000xg, a następnie suszono. RNA rozpuszczano w 20 μ l wody dejonizowanej, wolnej od RNaz. Przygotowany w ten sposób RNA wykorzystywano jako matrycę do syntezy cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji, do której użyto 1 μ g całkowitego RNA. Stężenie RNA oznaczano fluorymetrycznie z wykorzystaniem zestawu Quant-iT™ RNA Assay Kits (Invitrogen, USA).

3.2.8. Odwrotna transkrypcja

Całą procedurę wykonywano pod komorą laminarną na lodzie. Objętość RNA jaką wzięto do przepisania na cDNA poszczególnych prób przeliczono na 1 μ g. Do 1 μ g RNA dodawano 4 μ l 2,5 mM dNTP (Novazym, Polska), 0,5 μ l oligo(dT) (Novazym, Polska) oraz 0,5 μ l losowych heksamerów (Novazym, Polska). Próby mieszano, wirowano i umieszczano na 5 minut w 65°C w termobloku TS-100C (Biosan, Łotwa) w celu denaturacji RNA. Próby wirowano, umieszczano na lodzie i dodawano następujące składniki: 4 μ l pięciokrotnie stężonego buforu First Strand Buffer (Invitrogen, USA), 2 μ l DTT 0,1 M (Invitrogen, USA), 0,5 μ l odwrotnej transkryptazy SuperScript™ II Reverse Transcriptase 200 U/ μ l (Invitrogen, USA) oraz 0,25 μ l inhibitora rybonukleaz Rnase OUT 40 U/ μ l (Invitrogen, USA). Próby wytrząsano, a następnie krótko wirowano i umieszczano w termobloku. Syntezę cDNA przeprowadzano przez 50 minut w temp.

37°C. W celu zatrzymania reakcji próby inkubowano przez 15 min. w temp. 65°C. Uzyskany cDNA służył jako matryca do reakcji RT-qPCR.

3.2.9. Amplifikacja cDNA

3.2.9.1. Amplifikacja cDNA za pomocą metody RT-qPCR

Poziom ekspresji genów CYP1A1, CYP1B1 oraz AhR oznaczano techniką RT-qPCR za pomocą aparatu LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Niemcy) oraz oprogramowania LightCycler Software 1.5.

Do reakcji użyto polimerazę typu *hot-start*, niewykazującej aktywności poniżej 75°C. Do aktywacji enzymu dochodzi w czasie 10 minutowej preinkubacji w temperaturze 95°C. Etap ten ma na celu oderwanie grup blokujących aktywność enzymu (grupy te są nietrwałe w wysokiej temperaturze). Zastosowanie układu *hot-start* zapobiega powstawaniu nieswoistych produktów w trakcie przygotowywania mieszaniny reakcyjnej. Zmiany ilości przyrastającego produktu monitorowano poprzez pomiar sygnału fluorescencji emitowanej przez sondy zastosowane w reakcji. Użycie sond hydrolizujących (typu *TaqMan*) znakowanych fluorescencyjnie umiejscowionych pomiędzy parą starterów PCR, rozwiązuje problem nieswoistości fluorescencyjnej obecnej przy zastosowaniu barwnika SYBR Green I. W metodzie *TaqMan* wykorzystuje się swoistą dla amplifikowanego fragmentu DNA sondę, wyznakowaną na końcach cząsteczkami fluorochromów. Na końcu 5' sondy znajduje się barwnik reporterowy, a na końcu 3' cząsteczka wygaszająca fluorescencję. Kiedy sonda jest nienaruszona, wygaszacz znajdujący się blisko reportera tłumi jego fluorescencję. Podczas reakcji PCR sonda zostaje zdegradowana dzięki aktywności 5' nukleazowej polimerazy. Rozdział obu fluorochromów umożliwia emisję fluorescencji przez reporter. Wzrost fluorescencji monitorowany jest po każdym zakończonym cyklu elongacyjnym. Poziom fluorescencji jest wprost proporcjonalny do ilości powstającego produktu.

Dzięki pomiarom fluorescencji możliwe jest monitorowanie przebiegu reakcji RT-qPCR, w której wyróżnia się trzy fazy. W pierwszym etapie nie obserwuje się przyrostu ilości produktu. W fazie logarytmicznego wzrostu (faza II) obserwuje się bardzo szybki przyrost fluorescencji. Moment, w którym reakcja amplifikacji wchodzi w tę fazę (*C_p*, ang. *crossing point*) zależy wyłącznie od początkowej ilości matrycy. W fazie III (faza

plateau) następuje zahamowanie przyrostu ilości produktu w wyniku wyczerpania się substratów reakcji amplifikacji.

Reakcje RT-qPCR przeprowadzano na płytkach 96-dołkowych (Roche Diagnostics, Niemcy), z wykorzystaniem zestawu LightCycler480 Probes Master (Roche Diagnostics, Niemcy).

Skład mieszaniny reakcyjnej (10µl):

- 5µl LightCycler480 Probes Master,
- 1µl starterów (tab. 3),
- 1µl sondy (tab. 3),
- 1µl cDNA,
- 2µl H₂O.

Program amplifikacji:

- denaturacja wstępna – 95° C, 10 min. (aktywacja polimerazy),
- oznaczenie ilościowe – 50 cykli:
 - denaturacja – 95° C, 10s (rozdzielenie nici DNA),
 - przyłączanie starterów – 60° C, 30s,
 - wydłużanie starterów (synteza nici komplementarnej) – 72° C, 2s,
- chłodzenie aparatu 40°C, 30s.

W ocenie ekspresji posługiwano się względną metodą ilościową (ang. *relative quantification*) umożliwiającą ustalenie względnej różnicy między badanymi próbkami (krotności wzrostu, zmiany ilości specyficznego cDNA po zastosowaniu 3,4,4',5-TMS). Wyniki oznaczeń ilościowych badanych cDNA normalizowano względem standardów wewnętrznych, czyli cDNA genów konstytutywnych, których ekspresja jest względnie stała i nie podlega regulacji pod wpływem badanych substancji. Jako standard wewnętrzny zastosowano cDNA genów kodujących dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH, ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) oraz beta-aktynę (ACTB, ang. *beta actin*).

3.2.9.2. Amplifikacja cDNA za pomocą metody PCR-array

PCR-array jest metodą ilościowego oznaczenia DNA, opartą na RT-qPCR. PCR-array pozwala na jednoczesne monitorowanie zmian ilości kilkudziesięciu, a nawet kilkuset produktów PCR w czasie trwania reakcji.

Poziom ekspresji panelu genów pro- i antyapoptotycznych został oznaczony techniką PCR-array za pomocą aparatu LightCycler 480 Instrument (Roche Diagnostics, Niemcy) oraz oprogramowania LightCycler Software 1.5.

Reakcję PCR-array przeprowadzano na komercyjnie przygotowanych płytkach 96-dołkowych RealTime ready Human Apoptosis Panel 96 (Roche Diagnostics, Niemcy), służącej do analizy 84 wybranych genów pro- i antyapoptotycznych. Standardy wewnętrzne stanowiły cDNA 7 genów konstytutywnych. W każdym dołku płytki znajdowała się odpowiednio dobrana sonda, komplementarna do sekwencji danego genu oraz startery w kierunku 5'→3' oraz 3'→5'. Do każdego dołka naniesiono 10 µl mieszaniny reakcyjnej, której skład był zawsze taki sam dla analizy ekspresji genów danej próby:

- 20 µl cDNA (0,2 µl na 1 reakcję),
- 480 µl LightCycler 480 Probes Master (4,8 µl na 1 reakcję)
- 500 µl wody (5 µl na 1 reakcję)

Reakcję przeprowadzono według protokołu zalecanego przez producenta (Roche Diagnostics, Niemcy):

- denaturacja wstępna – 95° C, 10 min. (aktywacja polimerazy)
- oznaczenie ilościowe – 60 cykli:
 - denaturacja – 95° C, 10s (rozdzielenie nici DNA)
 - przyłączanie starterów – 60° C, 30s
 - wydłużanie starterów (synteza nici komplementarnej) – 72° C, 2s
- chłodzenie aparatu 40°C, 30s.

W ocenie ekspresji wykorzystywano względną metodę ilościową. Wyniki ilościowych oznaczeń badanych cDNA normalizowano względem 7 standardów wewnętrznych: ACTB, GAPDH, beta-2-mikroglobulina B₂M (ang. *beta-2-microglobulin*), fosforybozylo-transferazy hipoksantyno-guaninowej HPRT1 (ang. *hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase*), RPL13A (ang. *60S ribosomal protein L13A*), 18S (ang. *18S ribosomal RNA*), YWHAZ (ang. *14-3-3 protein zeta/delta*).

3.2.10. SDS-PAGE i Western blotting

W celu izolacji białka komórki A-2780 oraz SKOV-3 przemywano 2-krotnie PBS, a następnie dodawano roztworu RIPA (Sigma-Aldrich, USA). Po godzinnej inkubacji na lodzie lizat przenoszono do probówek 1,5 ml i przechowywano w -20°C. Stężenia białka

w lizatach oznaczano fluorymetrycznie z wykorzystaniem zestawu Quant-iT™ Protein Assay Kits (Invitrogen, USA).

Białka rozdzielano zgodnie z ich masą przy zastosowaniu elektroforezy w warunkach denaturujących SDS-PAGE w 10% żelu poliakrylamidowym, a następnie identyfikowano przy pomocy swoistych przeciwciał.

Do próbek 1,5 ml podawano odpowiednią objętość białka przeliczoną na 30µg, 3µl 6x stężonego buforu denaturującego i uzupełniano wodą do końcowej objętości 18 µl. W celu denaturacji białka próby poddawano inkubacji w termobloku w temperaturze 99°C przez 10 minut, po czym krótko wirowano. Białka poddawano rozdzielowi elektroforetycznemu w 10% żelu poliakrylamidowym. Elektroforezę przeprowadzano w buforze glicynowym przy napięciu 120V. Czas rozdziału wynosił 1,5 godziny. Rozdzielone białka zostały następnie przeniesione na membranę z polifluorku winylidenu- PVDF (ang. *polyvinylidene fluoride*) przy napięciu 15V i stabilizacji natężenia prądu 300mA, w buforze do transferu przez okres 1,5 godziny. Wydajność transferu sprawdzano barwiąc błonę za pomocą odczynnika Ponceau S (Sigma-Aldrich, USA) celem uwidocznienia poszczególnych frakcji białek. Barwnik zlewano, błonę przemywano wodą dejonizowaną, a następnie blokowano roztworem 5% odtłuszczonego mleka w buforze 1x TBST (Tris-Buffered Saline + Tween 20) przez 12 godz. w temp. +4°C. Detekcję białek przeprowadzono poprzez inkubację z odpowiednimi przeciwciałami I i II rzędowymi dla CYP1A1, CYP1B1 i Ahr (Santa Cruz Biotechnology, USA). Wykorzystano następujące stężenia przeciwciał I-rzędowych 1:1000 oraz II-rzędowych 1:10 000. Detekcję białek wykonano przy użyciu zestawu Super Signal West Femto (Thermo Scientific, USA). Wizualizację wyników przeprowadzono przy pomocy kliszy rentgenowskich Kodak. Wyniki normalizowano względem poziomu białka β-aktyny.

3.2.11. Transfekcja komórek raka jajnika A-2780

Transfekcja komórek raka jajnika A-2780 została wykonana przez dr Elżbę Kwiatkowską-Borowczyk w Katedrze Biotechnologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Linia komórkowa raka jajnika A-2780 została zmodyfikowana wektorem pcDNA 3.1 (zeo-) – Luc, niosącym gen lucyferazy (*luc*) oraz gen oporności na antybiotyk zeocynę (*zeo*). Ponadto, w celu zbadania wydajności transfekcji wykorzystano plazmid kontrolny

pcDNA 3.1 (zeo-) – GFP (ang. *green fluorescent protein*). Aby określić minimalne stężenie zeocyny (Zeocin, Invitrogen), niezbędnej do selekcji komórek transfekowanych, natywne komórki A-2780 zostały wysiane na płytkę 6-dołkową, w ilości 300 000/ dołek. Po upływie 24 godzin, medium ściągano i dodawano zeocynę w zakresie stężeń: 0, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/ml. Oceny morfologicznej komórek dokonano po 72-godzinnej inkubacji z zeocyną. Obserwowano, że stężenie zeocyny powyżej 400 µg/ml powodowało odklejanie komórek A-2780. Do dalszego etapu badań - selekcji komórek transfekowanych wytypowano stężenie zeocyny 300 µg/ml.

Komórki raka jajnika A-2780 transfekowano z wykorzystaniem odczynnika Lipofectamine LTX, PLUS Reagent (Invitrogen, USA) zgodnie z protokołami załączonymi przez producentów. Komórki A-2780 wysiano na dwie płytki 6-dołkowe, w liczbie 300 000 komórek/dołek. Po upływie 24 godz. medium ściągano, a komórki przemywano 2-krotnie PBS. Następnie dodawano 2,5 µg plazmidowego DNA (plazmid pcDNA 3.1 (zeo-) – Luc, pierwsza płytka; plazmid kontrolny pcDNA 3.1 (zeo-) – GFP, druga płytka) do 0,5 ml medium DMEM, po czym dodano 2,5 µl PLUS Reagent i delikatnie wymieszano. Po upływie 5 min. dodano 10 µl Lipofectamine LTX, dokładnie wymieszano i inkubowano 30 min. w temp. pokojowej. Przygotowaną w ten sposób mieszaninę nanoszono kroplami na komórki. Po upływie 24 godz., za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego określono wydajność transfekcji na poziomie 50%, po czym komórki pasażowano w stosunku 1:10 na płytki Petriego φ 10 cm. W celu wyselekcjonowania komórek transfekowanych, hodowlę komórek prowadzono w medium DMEM z dodatkiem zeocyny (300 µg/ml). Po upływie 14 dni wyselekcjonowane klony przenoszono na płytkę 96-dołkową. Po osiągnięciu konfluencji 90%, komórki pasażowano na płytkę 48-dołkową, następnie 24- i 6- dołkową. Po uzyskaniu pożądanej konfluencji komórki przenoszono na płytki Petriego φ 10 cm.

3.2.12. Model eksperymentalny mysich ksenograftów SCID

Metoda mysich ksenograftów SCID umożliwia przyżyciową, nieinwazyjną ocenę rozwoju guza i kontrolowanie odpowiedzi komórek nowotworowych na ksenobiotyki.

Komórki A-2780 transfekowane plazmidem pcDNA 3.1 (zeo-) – Luc, zawieszono w buforze PBS (30 mln./1 ml) wszczepiano podskórnie myszom SCID w ilości 3 mln/1 sztukę. Po upływie 14 dni, potwierdzono rozwój guzów z wykorzystaniem urządzenia IVIS® Spectrum (Xenogen, USA), wyposażonego w czułą kamerę CCD umożliwiającą

detekcję pojedynczych fotonów. Dzięki temu metoda ta pozwala na określenie wielkości guza oraz wizualizację nie tylko metastazy spontanicznej z guza pierwotnego, ale również wykrycie mikrorozsiewów komórek nowotworowych (mikrometastazy).

Eksperyment, od momentu osiągnięcia objętości guza 170 mm^3 (dzień 14), prowadzony był przez okres 20 dni. Myszy (10 sztuk) podzielono na dwie grupy: kontrolną ($n=5$), otrzymującą *vehiculum* (40% roztwór cyklodekstryny) oraz grupę badaną ($n=5$), traktowaną dwa razy w tygodniu 3,4,4',5-TMS (stężenie 100 mg/kg m. c.). W celu monitorowania zmian rozmiarów guza, dwa razy w tygodniu myszy otrzymywały dootrzewnowo $200 \mu\text{l}$ lucyferyny/1 sztukę (Gold Biotechnology, USA) rozpuszczonej w PBS ($15 \text{ mg lucyferyny/1 ml PBS}$), po czym zwierzęta usypiano za pomocą płynu wziewnego do znieczulenia ogólnego Forane (Abbott, USA) i robiono zdjęcia. Objętość guzów obliczano na podstawie wzoru: $V=LxW^2/2$, gdzie V – objętość guza, L – średnia długość, W – średnia szerokość.

3.2.13. Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programu GraphPad v.5.0 oraz Microsoft Excel 2007.

Prezentowane wyniki doświadczeń stanowią średnią ($\pm\text{SEM}$) pomiarów uzyskanych z trzech oddzielnych powtórzeń każdego eksperymentu (np. hodowli i pomiarów poziomu mRNA metodą RT-qPCR lub PCRarray). Wartość średniej z prób kontrolnych przyrównywano do 100%. Do oszacowania wpływu 3,4,4',5-TMS na poziom ekspresji badanych genów zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (*one-way ANOVA*). Ponadto, wszystkie wyniki analizowano testem post-hoc Student-Newman-Keuls. Różnice między próbami przyjęto za statystycznie istotne na poziomie istotności:

ns dla $p>0,05$ (brak istotności statystycznej)

*dla $p<0,05$

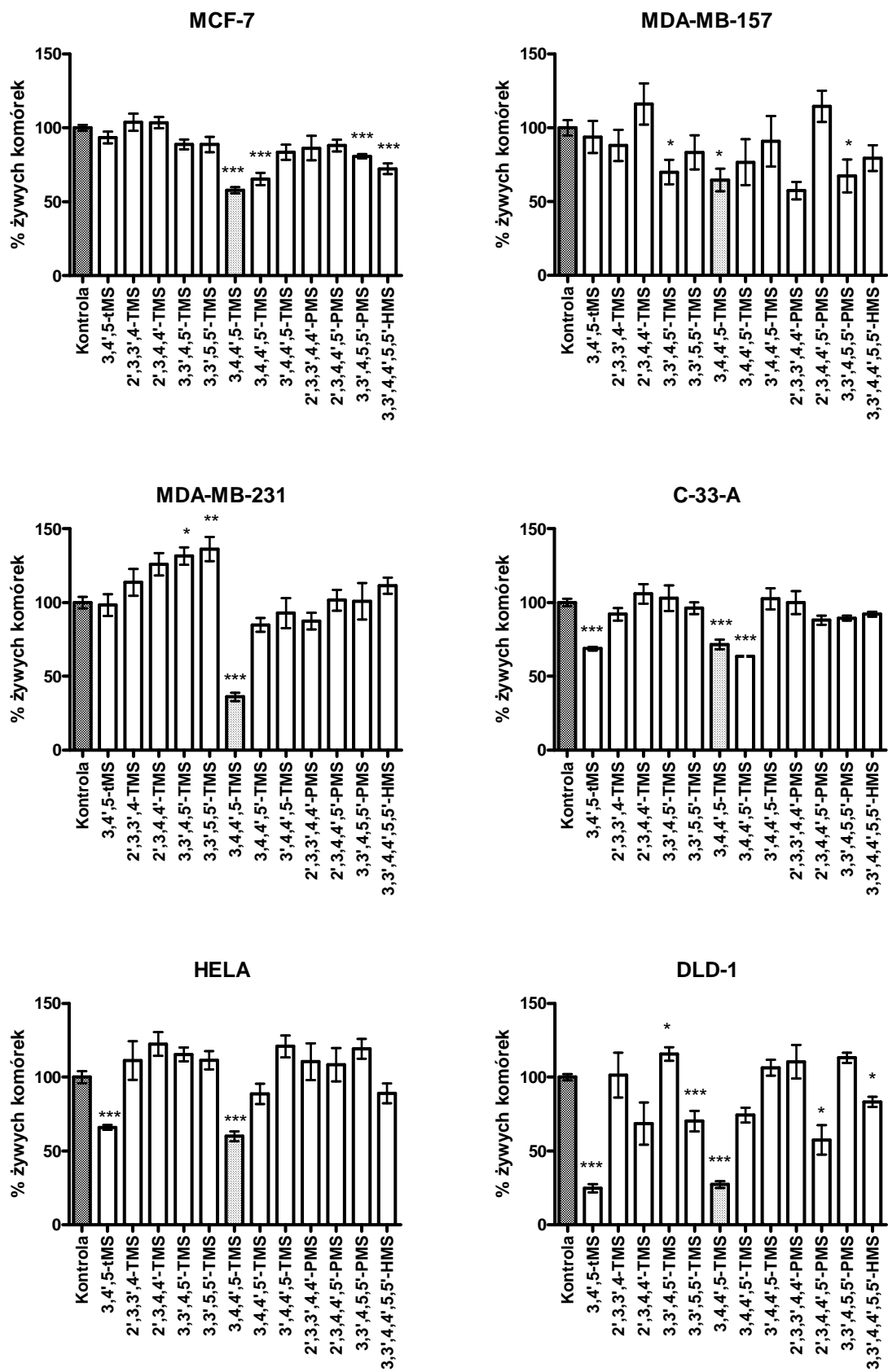
**dla $p<0,01$

***dla $p<0,001$.

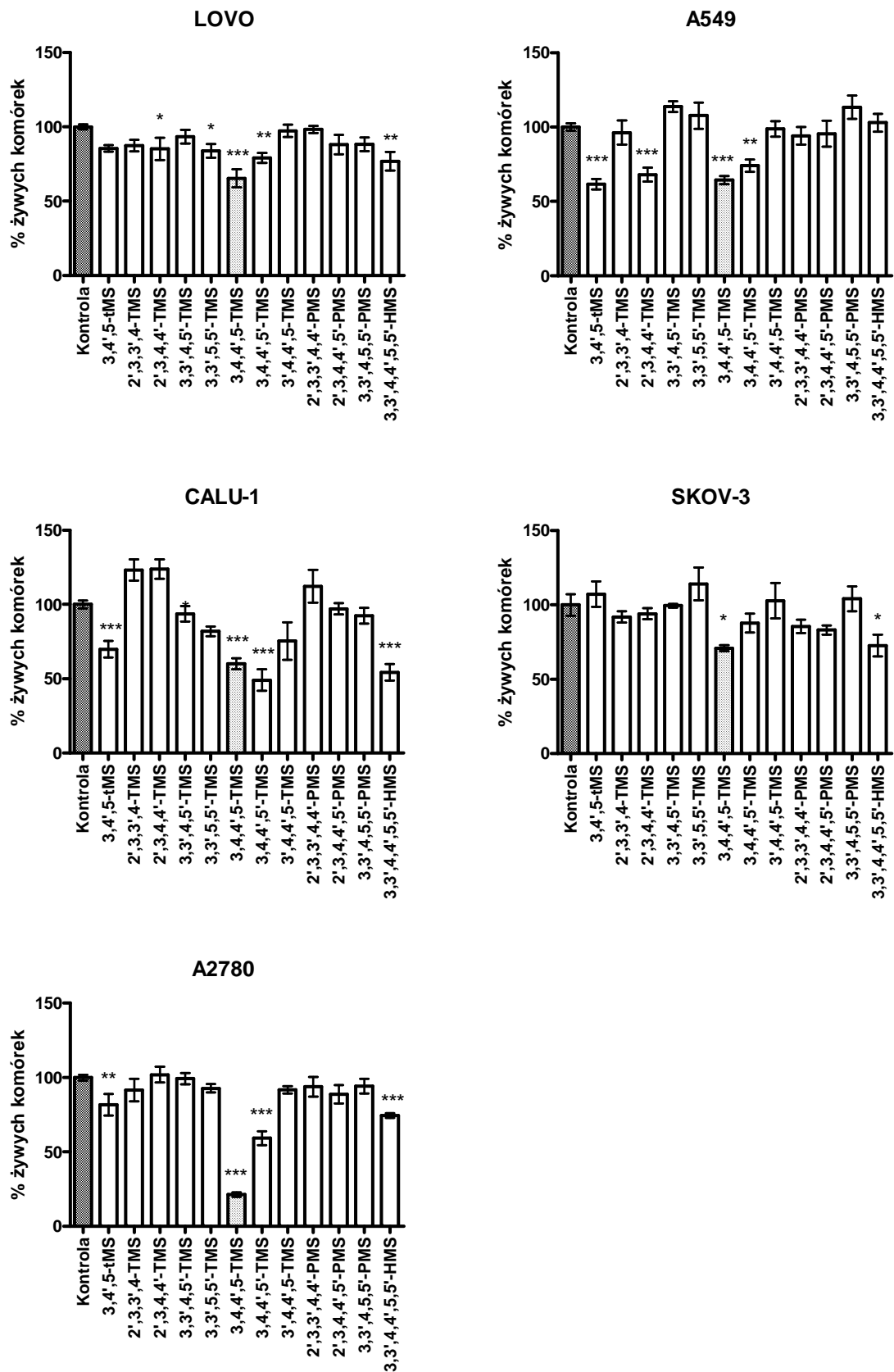
4. WYNIKI

4.1. Ocena cytotoksyczności metyloowych pochodnych resweratrolu wobec nowotworowych linii komórkowych

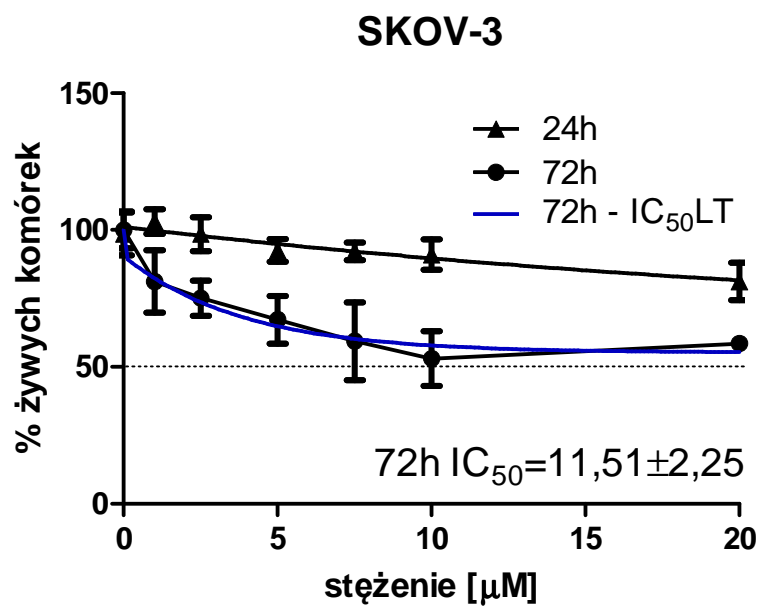
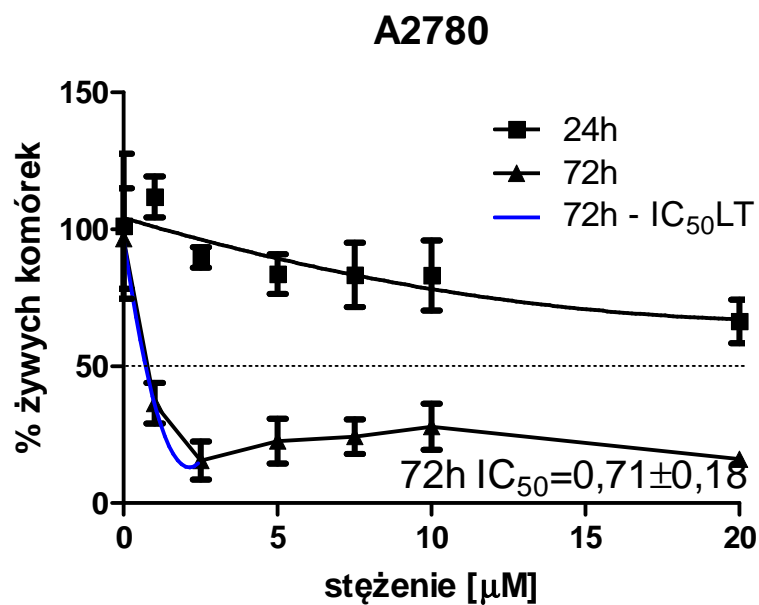
Wpływ 12 metyloowych pochodnych resweratrolu (tab. 2) na żywotność wybranych linii komórkowych raka: płuca, jelita, piersi, szyjki macicy oraz jajnika (tab. 1) określono testem MTT w trzech niezależnych eksperymentach, a wyniki przedstawiono w formie wykresów (ryc. 10, 11). Wykazano cytotoksyczne działanie 3,4',5-tMS na linie komórkowe raka szyjki macicy: HeLa i C33A, raka płuca: A-549 i CALU-1, raka jajnika A-2780 oraz raka okrężnicy DLD-1. Obniżoną żywotność: (a) komórek raka okrężnicy DLD-1 i LOVO, (b) komórek raka jajnika A-2780 i SKOV-3, (c) komórek raka piersi MCF-7, oraz (d) komórek raka płuca CALU-1 obserwowano pod wpływem 3,3',4,4',5,5'-HMS. Najwyższą aktywność cytotoksyczną wobec wszystkich badanych linii komórkowych wykazano dla 3,4,4',5-TMS. Do dalszych badań wybrano linię komórkową o największej wrażliwości na badany związek: linię komórkową raka jajnika A-2780 ($IC_{50}=0,71\pm 0,18 \mu M$), a także linię komórkową wywodzącą się z tego samego nowotworu SKOV3 ($IC_{50}=11,51\pm 2,25 \mu M$), charakteryzującą się dużo mniejszą wrażliwością na 3,4,4',5-TMS (ryc. 12).



Ryc. 10. Przeżywalność komórek raka piersi: MCF-7, MDA-MB-157, MDA-MB-231; komórek raka szyjki macicy: C33A, HeLa; komórek raka okrężnicy DLD-1 po 72 godzinach inkubacji z 12 metylowymi pochodnymi resweratrolu o stężeniu 10 μ M. Wyniki, stanowiące średnią z trzech doświadczeń (\pm SEM), porównywano do próby kontrolnej. *** $P < 0,001$; * $P < 0,01$; $P < 0,05$



Ryc. 11. Przeżywalność komórek raka okrężnicy: LOVO; komórek raka płuca: A549, CALU-1; komórek raka jajnika: SKOV-3, A-2780 po 72 godzinach inkubacji z 12 metylowymi pochodnymi resweratrolu o stężeniu 10 μ M. Wyniki, stanowiące średnią z trzech doświadczeń (\pm SEM), porównywano do próby kontrolnej. ***P< 0,001; **P<0,01; *P<0,05

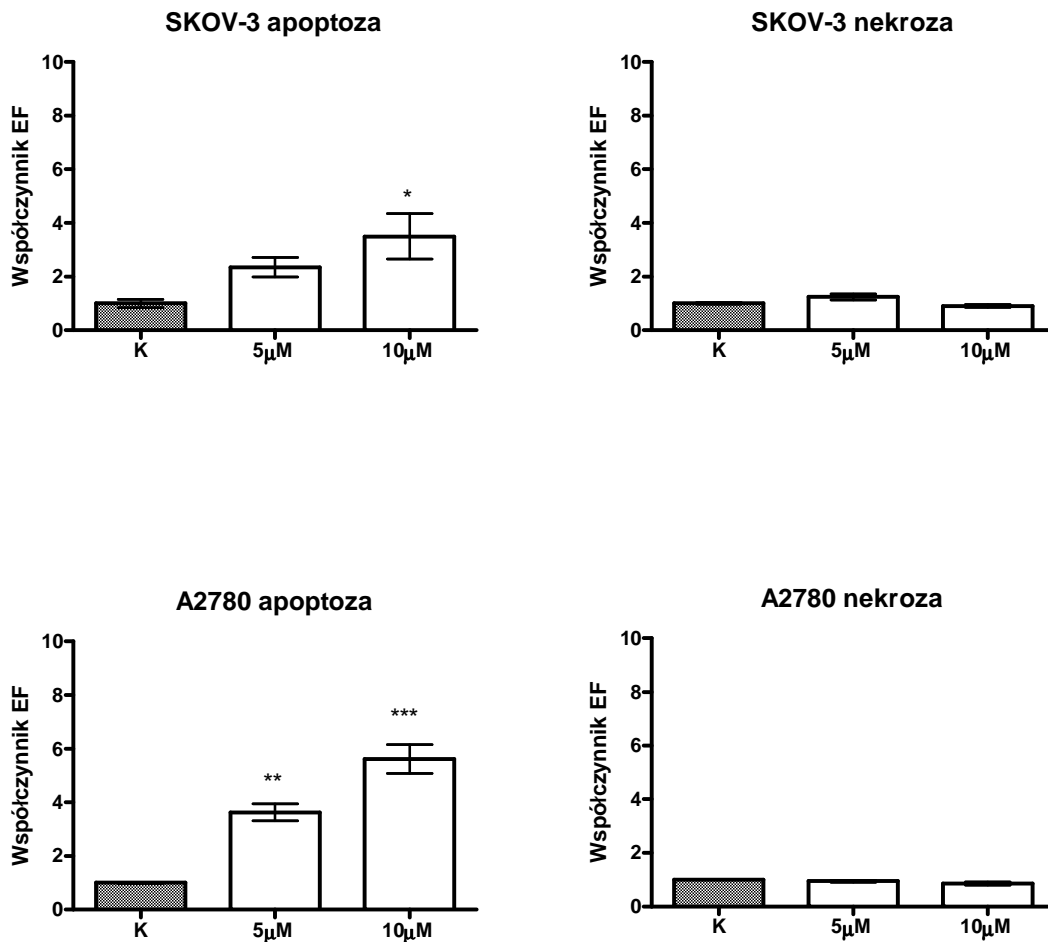


Ryc. 12. Przeżywalność komórek raka jajnika: SKOV-3 i A-2780 po 24 oraz 72 godzinach inkubacji z 3,4,4',5-TMS w zakresie stężeń 0-20 µM. Wartość IC₅₀ obliczona dla inkubacji 72 h; średnia z trzech niezależnych eksperymentów ± SEM

4.2. Ocena zdolności 3,4,4',5-TMS do indukcji apoptozy w komórkach raka jajnika

W celu wyjaśnienia mechanizmu cytotoksycznego działania 3,4,4',5-TMS poprzez ocenę jego zdolności do indukcji apoptozy wykorzystano test ELISA w trzech niezależnych eksperymentach, a wyniki przedstawiono w formie wykresu (ryc. 13). Działanie proapoptotyczne badanego związku wykazano poprzez wartość współczynnika EF wyrażającą liczbę komórek apoptotycznych.

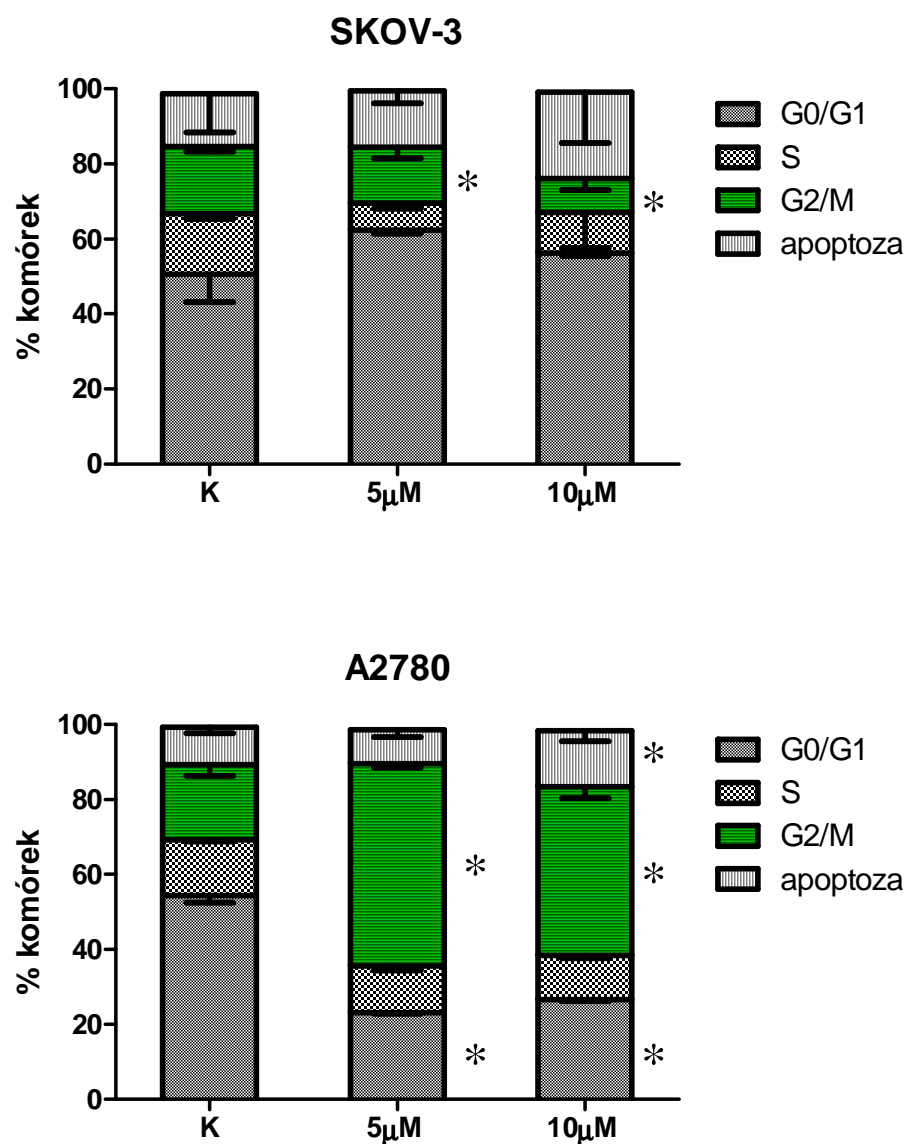
Zdolność 3,4,4',5-TMS do indukcji apoptozy wykazano zarówno w linii komórkowej A-2780, jak i SKOV-3. Statystycznie znamienne efekt proapoptotyczny 3,4,4',5-TMS ($P < 0,05$) w komórkach SKOV-3 zaobserwowano jedynie dla stężenia $10 \mu\text{M}$ ($\text{EF} = 3,5$). W linii komórkowej A-2780 wykazano silniejsze, statystycznie istotne ($P < 0,001$) działanie proapoptotyczne 3,4,4',5-TMS ($\text{EF} = 5,62$) dla stężenia $10 \mu\text{M}$, w porównaniu do niższego stężenia $5 \mu\text{M}$ ($\text{EF} = 3,63$ $P < 0,01$). Ponadto, określono wpływ 3,4,4',5-TMS na proces nekrozy w komórkach A-2780 oraz SKOV-3 poprzez obliczenie współczynnika EF wyrażającego ilość komórek nekrotycznych. W obu liniach komórkowych raka jajnika nie obserwowano zmian liczby komórek nekrotycznych pod wpływem 3,4,4',5-TMS.



Ryc. 13. Indukcja procesu apoptozy i nekrozy w liniach komórkowych SKOV-3 i A-2780
 Wyniki, stanowiące średnią z trzech doświadczeń (\pm SEM), porównywano do próby kontrolnej.
 *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$

4.3. Wpływ 3,4,4',5-TMS na aktywność proliferacyjną komórek raka jajnika

Aktywność proliferacyjną linii komórkowej A-2780 oraz SKOV-3 pod wpływem 3,4,4',5-TMS oznaczono za pomocą cytometrii przepływowej w trzech niezależnych eksperymentach, a wyniki przedstawiono w formie wykresu (ryc. 14). Pod wpływem 3,4,4',5-TMS o stężeniu 5 μM oraz 10 μM wykazano w fazie G2/M znaczący wzrost liczby komórek A-2780, a obniżenie liczby komórek SKOV-3. W przypadku linii komórkowej A-2780 obserwowano wzrost liczby komórek apoptotycznych.

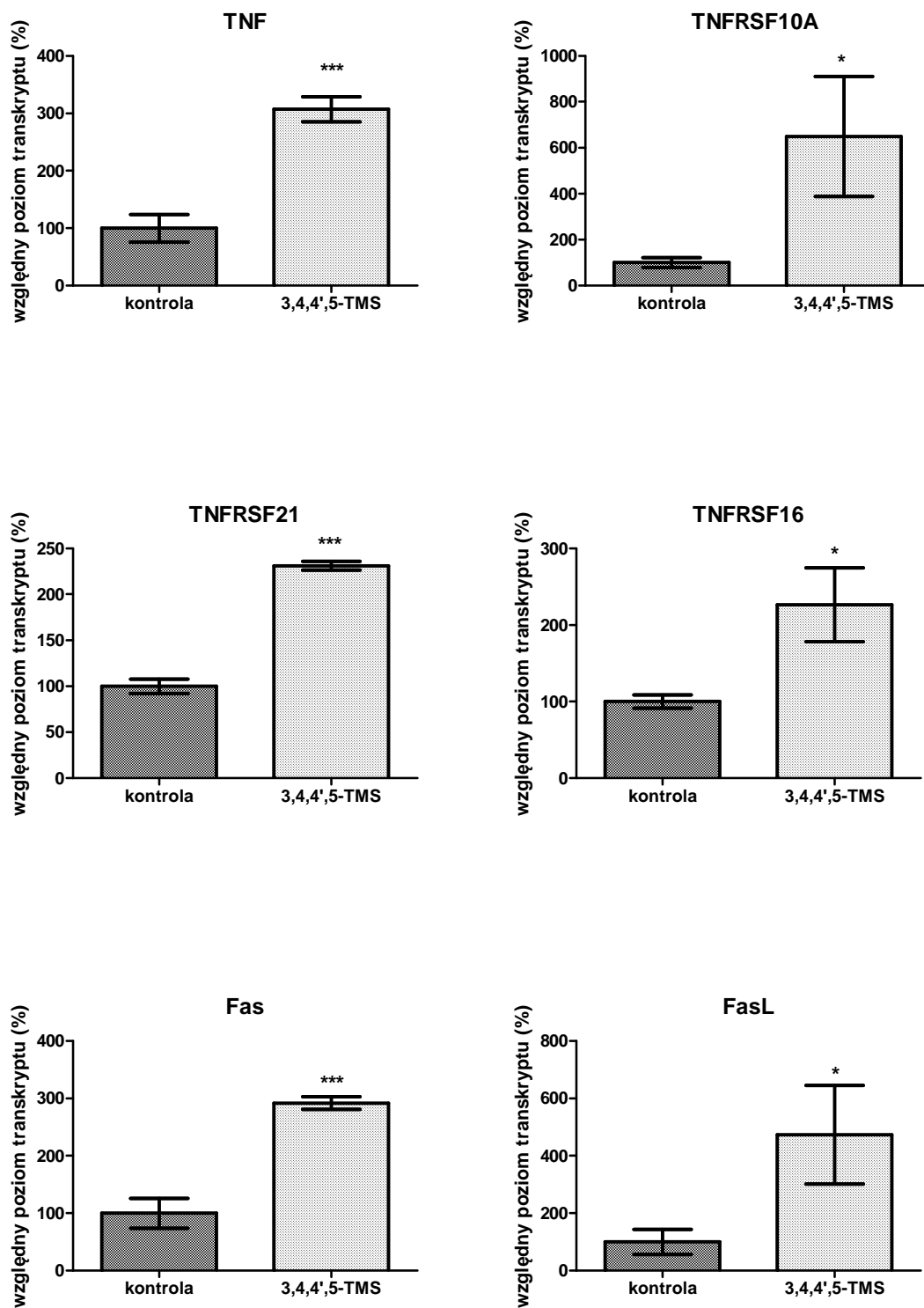


Ryc. 14. Liczba komórek raka jajnika SKOV-3 oraz A-2780 pod wpływem 5 μM oraz 10 μM 3,4,4',5-TMS w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. * $P < 0,05$

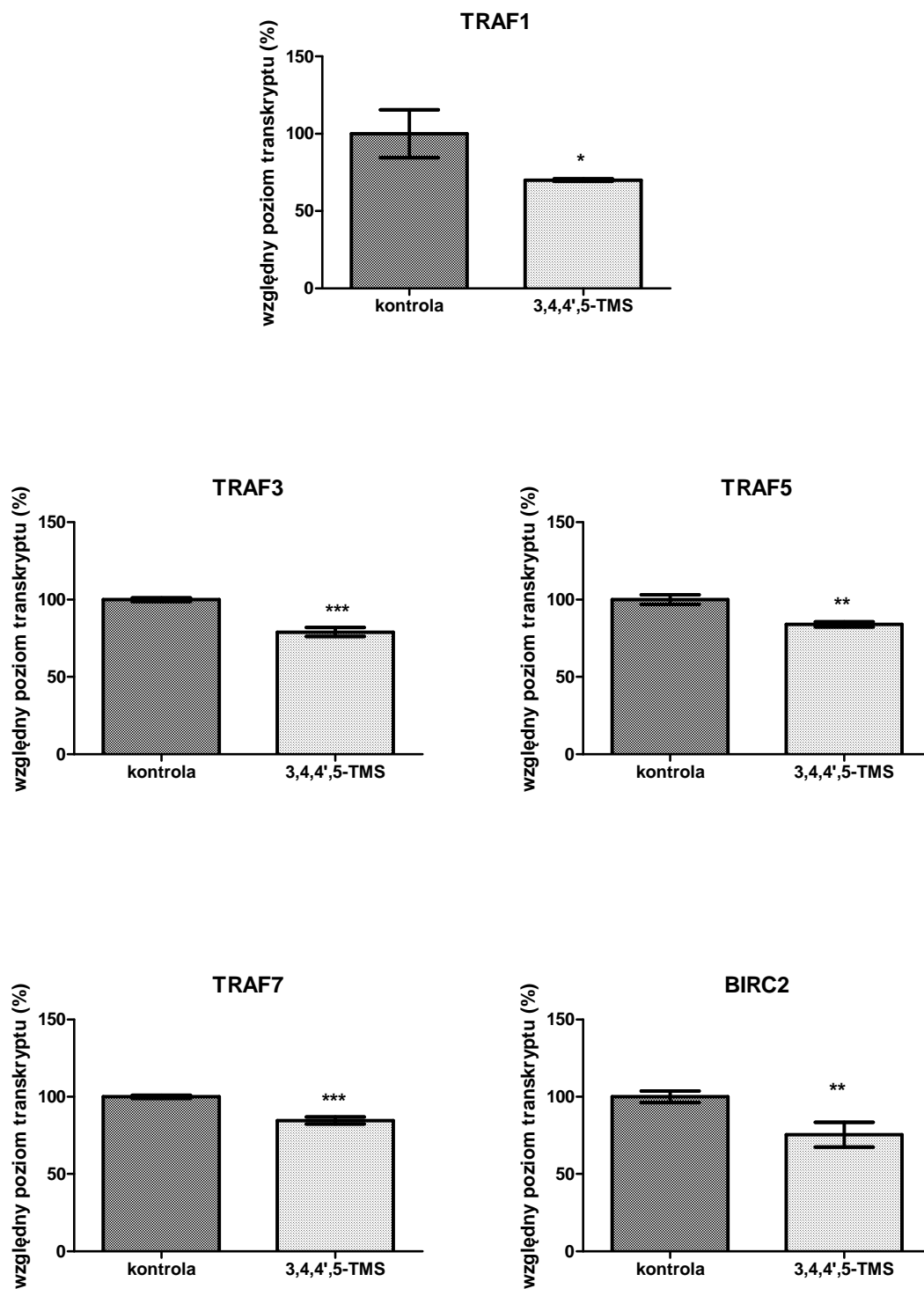
4.4. Wpływ 3,4,4',5-TMS na ekspresję genów pro- i antyapoptotycznych w liniach komórkowych raka jajnika

Wpływ 3,4,4',5-TMS na ekspresję genów pro- i antyapoptotycznych w komórkach A-2780 oraz SKOV-3 oznaczono metodą PCRarray w trzech niezależnych eksperymentach.

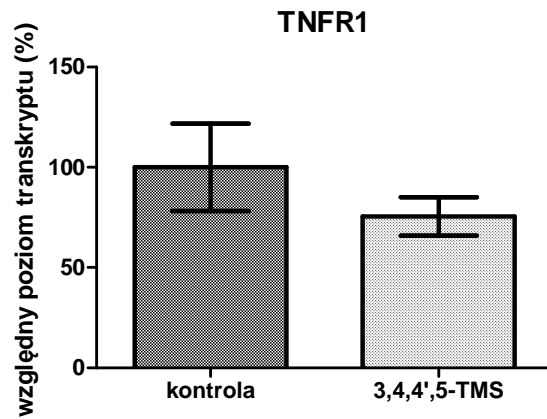
W wyniku 24-godzinnej inkubacji komórek A-2780 z 3,4,4',5-TMS o stężeniu 10 μ M zaobserwowano zmianę profilu ekspresji genów, których produkty białkowe uczestniczą w indukcji procesu apoptozy na drodze mechanizmu zewnątrzkomórkowego. Wykazano wzrost ekspresji genów proapoptotycznych: *TNF*, *TNFRSF10A* (ang. *tumor necrosis factor receptor superfamily*), *TNFRSF21*, *TNFRSF16*, *Fas*, *FasL* (ryc. 15) oraz obniżenie poziomu ekspresji genów antyapoptotycznych: *TRAF1* (ang. *TNF receptor-associated factor*), *TRAF3*, *TRAF5*, *TRAF7*, *BIRC2* (ang. *baculoviral IAP repeat containing 2*) (ryc. 16). Ponadto zaobserwowano nieistotny statystycznie spadek ekspresji proapoptotycznego genu *TNFR1* (ryc. 17). Po 24 godzinach inkubacji linii komórkowej SKOV-3 z 3,4,4',5-TMS o stężeniu 10 μ M wykazano zmiany poziomu ekspresji genów, których produkty białkowe uczestniczą w indukcji szlaku mitochondrialnego apoptozy. Zaobserwowano wzrost ekspresji genów proapoptotycznych *Bax*, *Apaf-1*, *p53* (ryc. 18) oraz spadek ekspresji genów antyapoptotycznych: *Bcl-2*, *Bcl2l10/Bcl-B*, *NF κ B* (ryc. 19).



Ryc. 15. Wpływ 3,4,4',5-TMS na ekspresję genów proapoptotycznych
 Komórki A-2780 inkubowano przez 24 godziny z 10 μ M 3,4,4',5-TMS lub 10 μ M DMSO (próba kontrolna). Wpływ badanej substancji na poziom transkryptów *TNF*, *TNFRSF10A*, *TNFRSF21*, *TNFRSF16*, *Fas*, *FasL* określono metodą PCRarray i normalizowano względem średniej 7 genów referencyjnych. Wyniki, stanowiące średnią z trzech doświadczeń (\pm SEM), porównywano do próby kontrolnej. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$

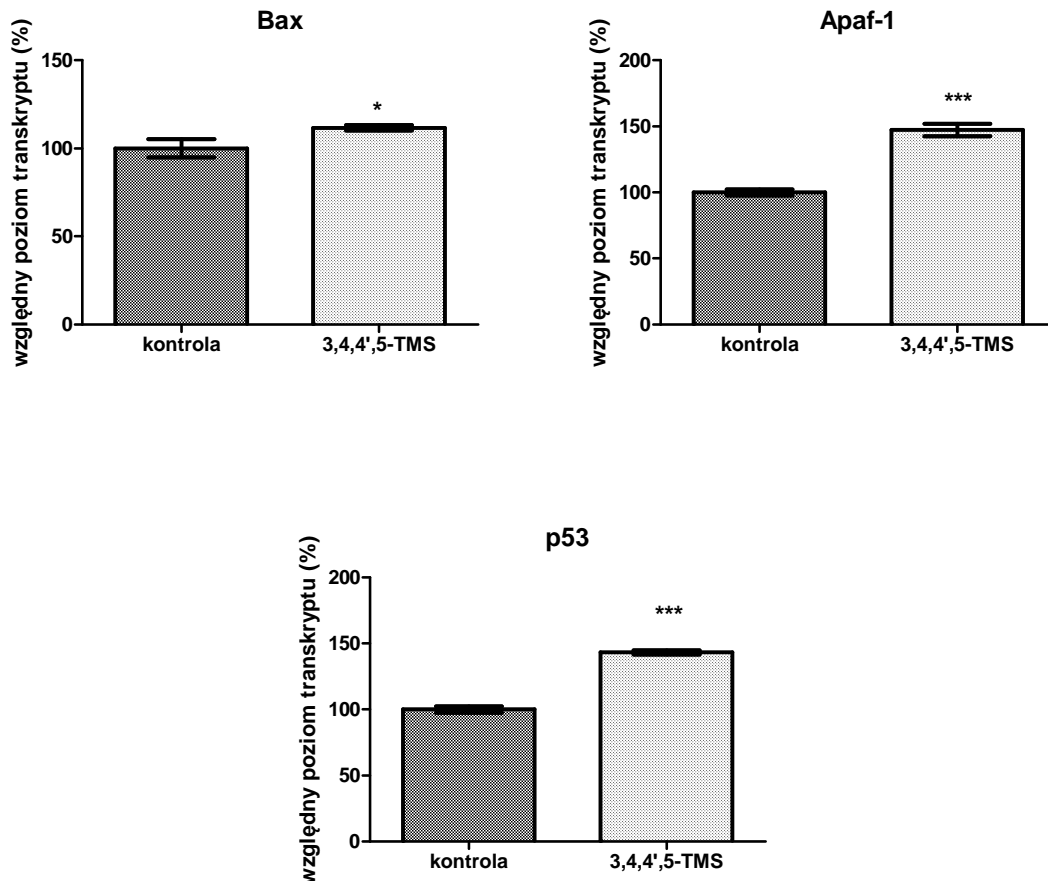


Ryc. 16. Wpływ 3,4,4',5-TMS na ekspresję genów antyapoptotycznych
 Komórki A-2780 inkubowano przez 24 godziny z 10 μ M 3,4,4',5-TMS lub 10 μ M DMSO (próba kontrolna). Wpływ badanej substancji na poziom transkryptów *TRAF1*, *TRAF3*, *TRAF5*, *TRAF7*, *BIRC2* określono metodą PCRarray i normalizowano względem średniej 7 genów referencyjnych. Wyniki, stanowiące średnią z trzech doświadczeń (\pm SEM), porównywano do próby kontrolnej. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$



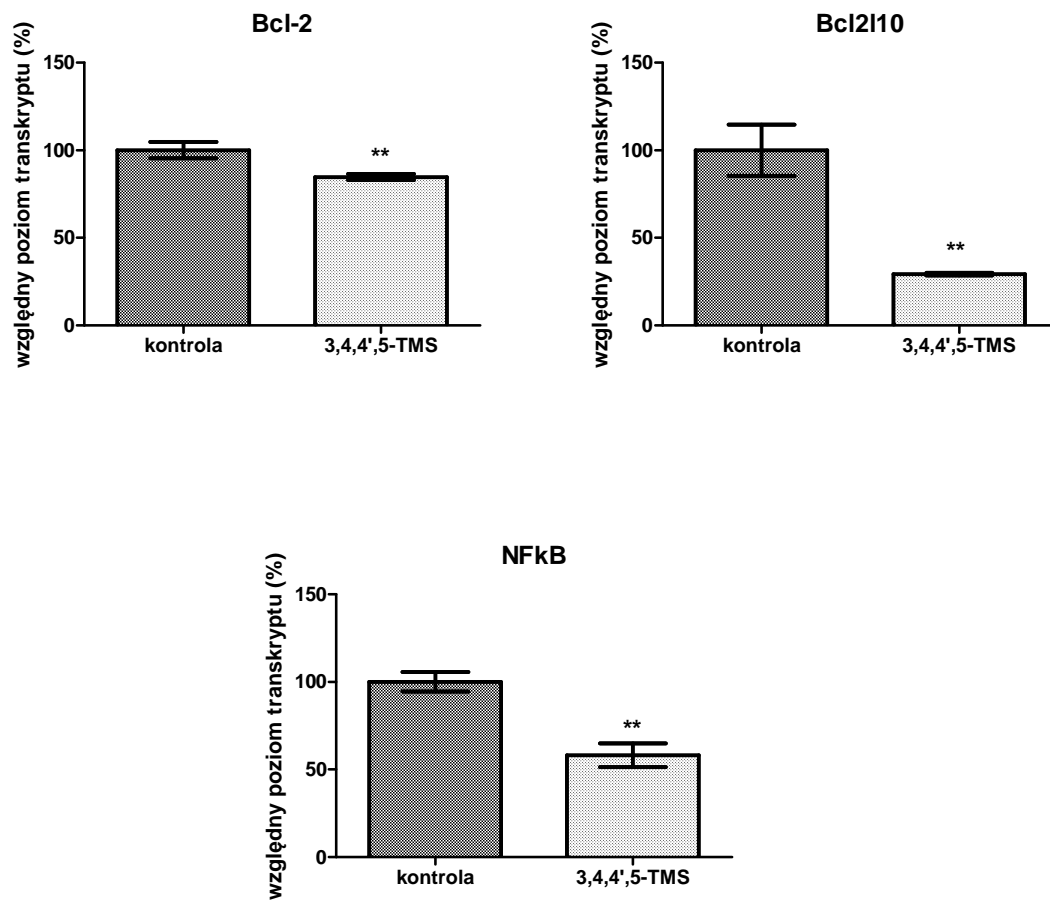
Ryc. 17. Wpływ 3,4,4',5-TMS na ekspresję genu *TNFR1*

Komórki A-2780 inkubowano przez 24 godziny z 10 μM 3,4,4',5-TMS lub 10 μM DMSO (próba kontrolna). Wpływ badanej substancji na poziom transkryptu *TNFR1* określono metodą PCRarray i normalizowano względem średniej 7 genów referencyjnych. Wyniki, stanowiące średnią z trzech doświadczeń ($\pm\text{SEM}$), porównywano do próby kontrolnej.



Ryc. 18. Wpływ 3,4,4',5-TMS na ekspresję genów proapoptotycznych

Komórki SKOV-3 inkubowano przez 24 godziny z 10 μM 3,4,4',5-TMS lub 10 μM DMSO (próba kontrolna). Wpływ badanej substancji na poziom transkryptów *Bax*, *Apaf-1* i *p53* określono metodą PCRarray i normalizowano względem średniej 7 genów referencyjnych. Wyniki, stanowiące średnią z trzech doświadczeń ($\pm\text{SEM}$), porównywano do próby kontrolnej. *** $P < 0,001$; * $P < 0,05$

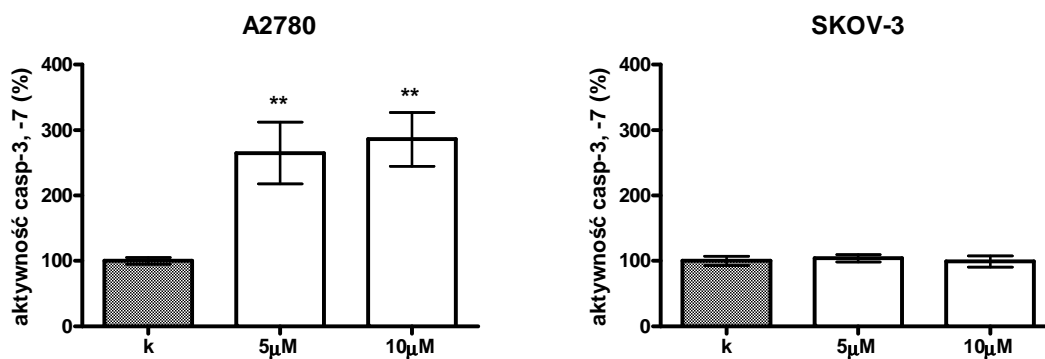


Ryc. 19. Wpływ 3,4,4',5-TMS na ekspresję genów antyapoptotycznych
 Komórki SKOV-3 inkubowano przez 24 godziny z 10 μ M 3,4,4',5-TMS lub 10 μ M DMSO (próba kontrolna). Wpływ badanej substancji na poziom transkryptów *Bcl-2*, *Bcl2l10*, *NFkB* określono metodą PCRarray i normalizowano względem średniej 7 genów referencyjnych. Wyniki, stanowiące średnią z trzech doświadczeń (\pm SEM), porównywano do próby kontrolnej. **P<0,01

4.5. Ocena wpływu 3,4,4',5-TMS na aktywność kaspazy 3 oraz 7

Zdolność 3,4,4',5-TMS do aktywacji kaspazy 3 oraz 7 w komórkach raka jajnika A-2780 oraz SKOV-3 określono testem Caspase-Glo[®] 3/7 w trzech niezależnych eksperymentach, a wyniki przedstawiono w formie wykresu (ryc. 20).

W linii komórkowej A-2780 wykazano istotny statystycznie wzrost aktywności kaspazy 3 oraz 7 pod wpływem 3,4,4',5-TMS w stężeniach 5 μ M oraz 10 μ M ($P < 0,01$). Nie zaobserwowano natomiast zwiększenia aktywności tych dwóch, kluczowych dla procesu apoptozy, enzymów w linii komórkowej SKOV-3.



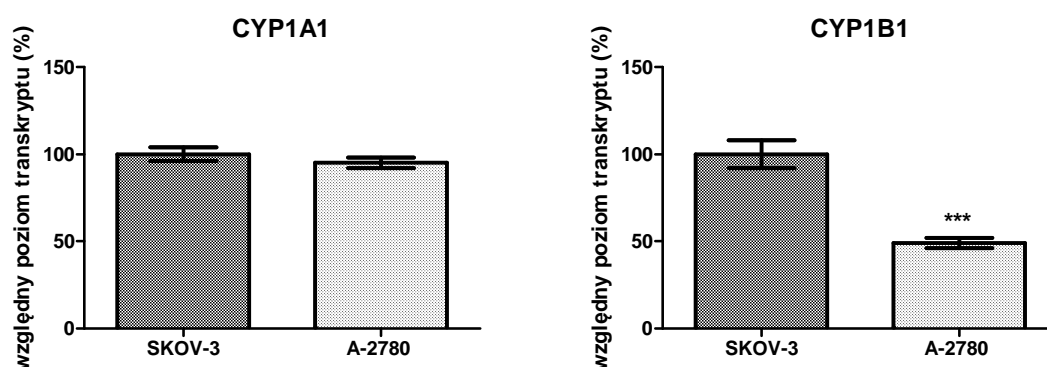
Ryc. 20. Wpływ 3,4,4',5-TMS na aktywność kaspazy -3, -7

Komórki A-2780 oraz SKOV-3 inkubowano przez 24 godziny z 5 μ M, 10 μ M 3,4,4',5-TMS lub 5 μ M, 10 μ M DMSO (próba kontrolna). Wyniki, stanowiące średnią z trzech doświadczeń (\pm SEM), porównywano do próby kontrolnej. ** $P < 0,01$

4.6. Porównanie ekspresji CYP1A1 i CYP1B1 w liniach komórkowych raka jajnika A-2780 oraz SKOV-3

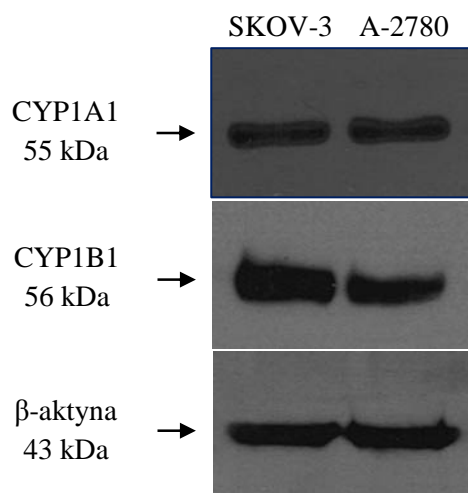
Analizę poziomu transkryptów *CYP1A1* i *CYP1B1* w komórkach A-2780 oraz SKOV-3 przeprowadzono z wykorzystaniem metody RT-qPCR w trzech niezależnych eksperymentach, a wyniki przedstawiono w formie wykresu (ryc. 21). Wykazano, że poziom mRNA *CYP1A1* jest zbliżony w badanych liniach komórkowych. Ekspresja genu *CYP1B1* jest natomiast niższa o połowę w linii komórkowej A-2780, w porównaniu do SKOV-3.

Analizę poziomu białka CYP1A1, CYP1B1 w komórkach A-2780 oraz SKOV-3 przeprowadzono z wykorzystaniem techniki Western blotting (ryc. 22). Uzyskane wyniki zostały potwierdzone na poziomie białka. Obserwowano niższą ekspresję białka CYP1B1 w komórkach A-2780, w odniesieniu do SKOV-3. Ponadto wykazano podobny poziom białka CYP1A1 w obu liniach komórkowych raka jajnika.



Ryc. 21. Profil ekspresji genów *CYP1A1* i *CYP1B1* w liniach komórkowych SKOV-3 oraz A-2780

Poziom transkryptów *CYP1A1* i *CYP1B1* normalizowano względem średniej z 2 genów referencyjnych (*GAPDH*, *ACTB*). *** $P < 0,001$



Ryc. 22. Porównanie poziomu ekspresji białek CYP1A1 i CYP1B1

Lizaty komórkowe SKOV-3, A-2780 rozdzielano elektroforetycznie i analizowano za pomocą techniki Western blotting z wykorzystaniem przeciwciał anti-CYP1A1, anti-CYP1B1 oraz anti-β-aktyna (jako kontroli).

4.6.1. Wpływ 3,4,4',5-TMS na ekspresję genów *CYP1A1*, *CYP1B1*, *AhR* w komórkach raka jajnika

Wpływ 3,4,4',5-TMS na poziom transkryptów *CYP1A1*, *CYP1B1* oraz *AhR* w komórkach A-2780 oraz SKOV-3 oznaczono metodą RT-qPCR w trzech niezależnych eksperymentach, a wyniki przedstawiono w formie tabeli (tab. 4).

W wyniku 24-godzinnej inkubacji komórek A-2780 z 3,4,4',5-TMS o stężeniu 10 μM zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA *CYP1A1* o 50%, *CYP1B1* o 78% oraz nieznaczny spadek ekspresji genu *AhR* (16%). W linii komórkowej SKOV-3, po 24 godzinach inkubacji z 10 μM 3,4,4',5-TMS wykazano mniejsze, w porównaniu do komórek A-2780, obniżenie poziomu transkryptów *CYP1A1* (15%) oraz *CYP1B1* (41%). Poziom mRNA *AhR* uległ podwyższeniu, jednakże prezentowany wynik jest nieistotny statystycznie.

Tab. 4. Wpływ 3,4,4',5-TMS na ekspresję genów *CYP1B1*, *CYP1A1*, *AhR* w liniach komórkowych raka jajnika

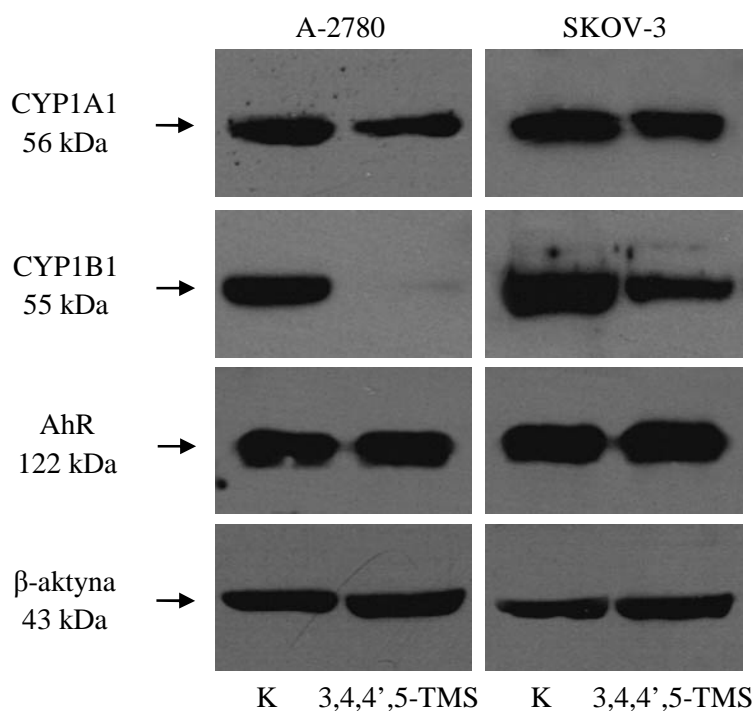
Poziom transkryptów *CYP1A1*, *CYP1B1*, *AhR* normalizowano względem średniej z 2 genów referencyjnych (*GAPDH*, *ACTB*). ***P<0,001; **P<0,01; *P<0,05; ns- nieistotny statystycznie.

Gen	A-2780	SKOV-3
CYP1A1	↓ 50% (***)	↓ 15 % (*)
CYP1B1	↓ 78% (**)	↓ 41% (*)
AhR	↓ 16% (*)	↑ 32% (ns)

4.6.2. Wpływ 3,4,4',5-TMS na ekspresję białek CYP1A1, CYP1B1, AhR w komórkach raka jajnika

W celu potwierdzenia, że ekspresja genów *CYP1A1*, *CYP1B1*, *Ahr* w komórkach A-2780 oraz SKOV-3 uległa zmianie po 24-godzinnej inkubacji z 10 μ M 3,4,4',5-TMS, przeprowadzono analizę lizatów białkowych techniką Western blotting (ryc. 23).

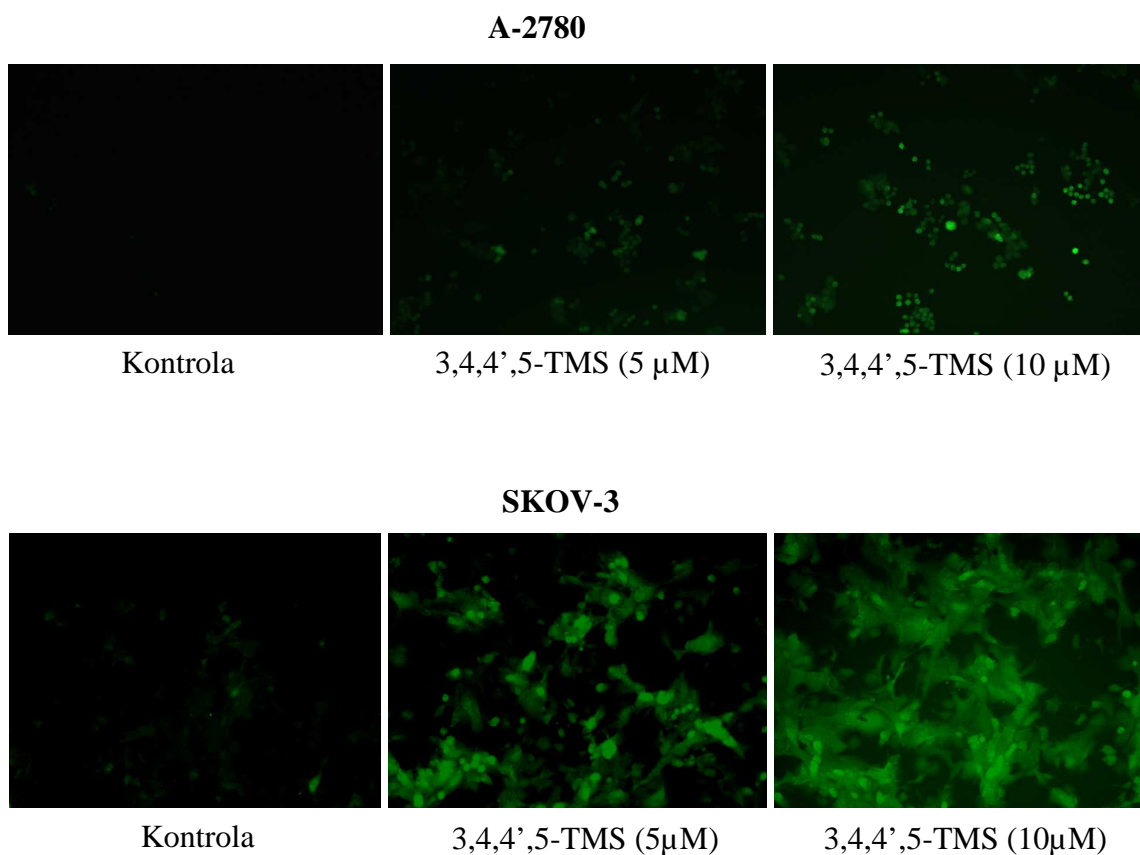
W wyniku rozdzielania elektroforetycznego lizatów białkowych oraz analizy Western blotting z użyciem przeciwciał anti-CYP1A1, anti-CYP1B1, anti-AhR, uzyskano sygnały, których lokalizacje odpowiadają masie cząsteczkowej CYP1A1 (56 kDa), CYP1B1 (55 kDa), AhR (122 kDa). W linii komórkowej SKOV-3 wykazano pod wpływem 3,4,4',5-TMS obniżenie poziomu białka CYP1A1 oraz CYP1B1. W komórkach A-2780 również obserwowano zdolność badanego związku do obniżenia ekspresji białka CYP1A1. Ponadto wykazano całkowite wyciszenie ekspresji białka CYP1B1. Poziom białka AhR nie uległ natomiast zmianie zarówno w komórkach SKOV-3, jak i A-2780.



Ryc. 23. Wpływ 3,4,4',5-TMS na ekspresję białek CYP1A1, CYP1B1 oraz AhR
Lizaty komórkowe SKOV-3 i A-2780, uzyskane po 24-godzinnej inkubacji z 3,4,4',5-TMS o stężeniu 10 μ M rozdzielano elektroforetycznie oraz analizowano za pomocą techniki Western blotting z wykorzystaniem przeciwciał anti-CYP1A1, anti-CYP1B1, anti-AhR i anti- β -aktyna (jako kontroli).
K - komórki inkubowane z DMSO.

4.7. Detekcja stresu oksydacyjnego w komórkach raka jajnika z wykorzystaniem H₂DCF-DA

W celu potwierdzenia indukcji stresu oksydacyjnego przez 3,4,4',5-TMS komórki A-2780 oraz SKOV-3 inkubowano z H₂DCF-DA, po czym dodawano badany związek w stężeniu 5 μM i 10 μM (ryc. 24). W komórkach SKOV-3 wykazano większe nasilenie stresu oksydacyjnego, w porównaniu do A-2780. W obu liniach komórkowych obserwowany stres oksydacyjny wzrastał wraz ze zwiększeniem stężenia 3,4,4',5-TMS.

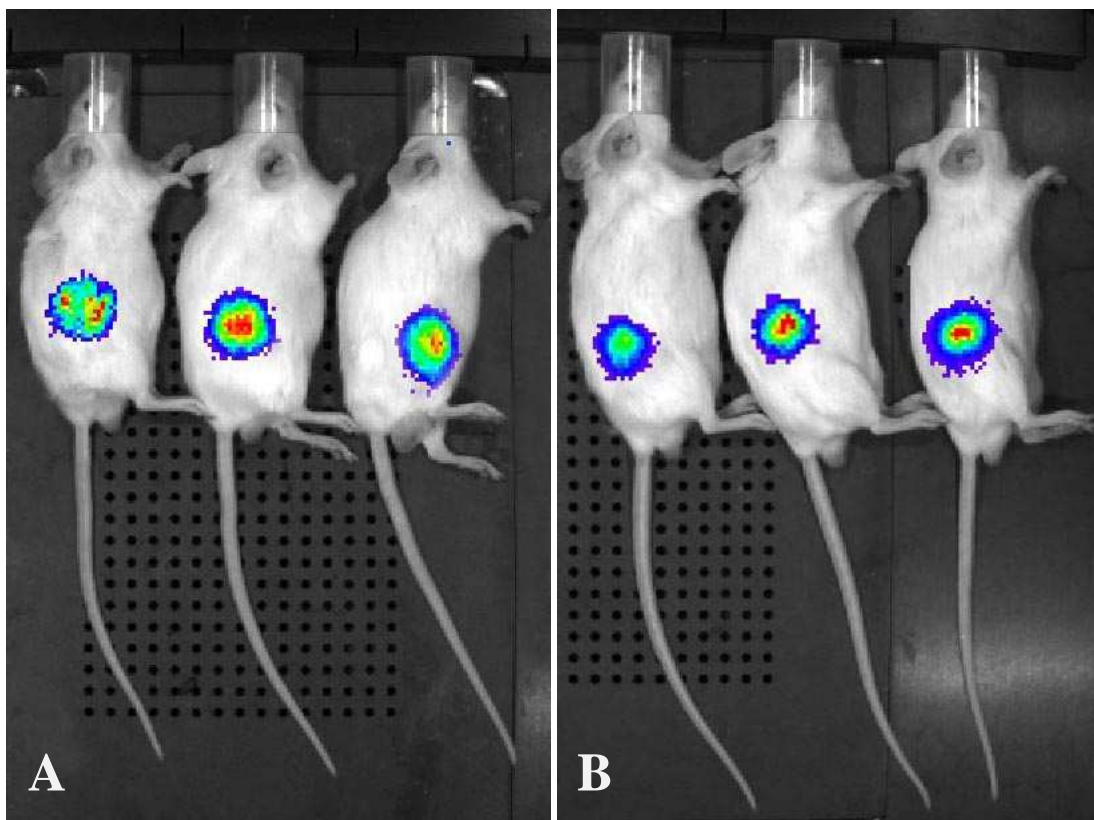


Ryc. 24. Indukcja stresu oksydacyjnego pod wpływem 3,4,4',5-TMS o stężeniu 5 μM i 10 μM w linii komórkowej raka jajnika A-2780 oraz SKOV-3

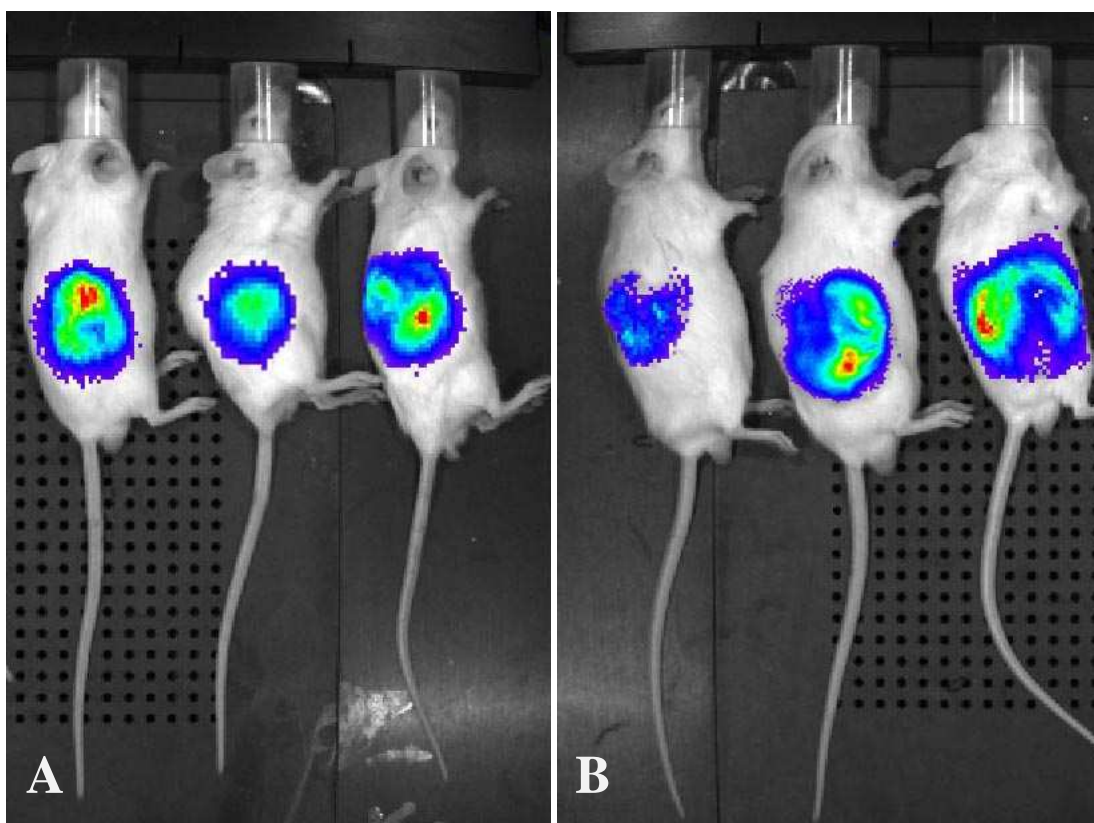
4.8. Ocena działania przeciwnowotworowego 3,4,4',5-TMS w modelu mysich ksenograftów SCID

Weryfikacji działania przeciwnowotworowego 3,4,4',5-TMS dokonano w modelu eksperymentalnym mysich ksenograftów SCID, którym wszczepiono komórki A-2780. Po upływie 14 dni od momentu wszczęcia komórek A-2780, guzy osiągnęły średnio rozmiar 170 mm³. Oceny działania przeciwnowotworowego 3,4,4',5-TMS dokonano poprzez porównanie rozmiaru guzów w grupie kontrolnej (n=5) oraz grupie badanej (n=5) otrzymującej 3,4,4',5-TMS w stężeniu 100 mg/kg m.c.

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w rozmiarze guzów pomiędzy grupą kontrolną, a grupą badaną (ryc. 25, 26).



Ryc. 25. Przykładowe zdjęcia myszy SCID po 14 dniach od momentu wszepienia komórek A-2780, wykonane w celu potwierdzenia rozwoju guza w: a) grupie kontrolnej, b) grupie badanej



Ryc. 26. Przykładowe zdjęcia myszy SCID po 20 dniach od momentu rozwoju guza: a) grupa kontrolna otrzymująca vehiculum, b) grupa badana otrzymująca 3,4,4',5-TMS (100 mg/kg m. c.)

5. DYSKUSJA

W Polsce, podobnie jak na całym świecie, nowotwory złośliwe stanowią drugą po chorobach układu krążenia przyczynę zgonów, a zachorowania z powodu nowotworów złośliwych wśród osób poniżej 65 roku życia mają tendencję wzrostową. Zjawisko to jest szczególnie widoczne w populacji kobiet, u których do najczęściej diagnozowanych chorób nowotworowych należą nowotwory piersi, szyjki macicy oraz jajnika. Około 90% nowotworów jajnika stanowią gruczolakoraki, wśród których wyróżnia się kilka podtypów [2]. Nowotwory te różnią się nie tylko budową histologiczną, ale również sposobem rozrostu i wynikającym z niego rokowaniem. Pomimo, że około 2/3 pacjentek z zaawansowaną chorobą odpowiada na pierwszą linię chemioterapii, 5-letnie przeżycie wynosi zaledwie ok. 30%. U większości dochodzi do wznowy choroby (średni czas do nawrotu to 18 miesięcy, a mediana przeżycia całkowitego - 24 miesiące) [154, 155].

W ciągu ostatnich lat pojawiły się liczne doniesienia o substancjach roślinnych, posiadających właściwości chemoprewencyjne [12]. Wśród wielu związków pochodzenia naturalnego wykazujących zdolności hamowania procesu nowotworowego szczególne miejsce zajmuje resweratrol. Aktualna wiedza na temat przeciwnowotworowej aktywności resweratrolu oraz molekularnych podstaw takiego działania została zebrana w obszernych pracach przeglądowych opublikowanych w ostatnich latach [156]. Z uwagi na niską biodostępność resweratrolu, możliwość jego zastosowania jako czynnika chemoprewencyjnego jest często poddawana w wątpliwość [86]. Dlatego też prowadzone są obecnie badania mające na celu syntezę nowych analogów o lepszych parametrach farmakokinetycznych oraz silniejszym działaniu przeciwnowotworowym. Związkami wykazującymi takie właściwości są – testowane w ramach pracy doktorskiej – metylowe pochodne resweratrolu [157].

W wyniku badań skryningowych 12 metylowych analogów resweratrolu, przeprowadzonych na 11 liniach komórkowych, wyselekcjonowano związek o najwyższej aktywności cytotoksycznej 3,4,4',5-TMS. Linią komórkową o największej wrażliwości na 3,4,4',5-TMS jest ludzka linia komórek raka jajnika A-2780 ($IC_{50}=0,71\pm 0,18 \mu M$). Jednakże wykazano również, że linia komórkowa wywodząca się z tego samego nowotworu SKOV-3 charakteryzuje się dużo mniejszą wrażliwością na badany związek ($IC_{50}=11,51\pm 2,25 \mu M$). Tę obserwację może tłumaczyć fakt, że komórki SKOV-3, w porównaniu do linii komórkowej A-2780, są bardziej odporne na działanie cytostatyków standardowo stosowanych w terapii przeciwnowotworowej raka jajnika [158, 159].

Potwierdzeniem tego są wyniki badań Yellepeddi i wsp. (2011), którzy wykazali, że aktywność cytotoksyczna cisplatyny jest dużo większa w komórkach A-2780 ($IC_{50}=26,99\pm 2,11 \mu M$) niż w linii komórkowej SKOV-3 ($69,66\pm 5,67 \mu M$) [160].

Przeprowadzona w rozprawie doktorskiej ocena działania cytotoksycznego 3,4,4',5-TMS na linii komórkowe raka jajnika A-2780 oraz SKOV-3 umożliwia określenie liczby martwych komórek pod wpływem badanego związku. Zastosowany test MTT nie pozwala jednak na rozróżnienie komórek apoptotycznych od nekrotycznych. W celu wyjaśnienia mechanizmu cytotoksycznego działania 3,4,4',5-TMS, poprzez ocenę jego zdolności do indukcji apoptozy, wykonano test ELISA. Test ten umożliwia również określenie liczby komórek apoptotycznych i nekrotycznych. Wyniki tej części badań wykazały zdolność 3,4,4',5-TMS do indukcji apoptozy zarówno w linii komórkowej A-2780, jak i SKOV-3. Cytotoksyczne działanie 3,4,4',5-TMS można więc wiązać z jego zdolnością do indukcji apoptozy. Spostrzeżenia te są zgodne z wynikami Gossiau i wsp. (2005) [145] oraz Ma i wsp. (2008) [146]. Wykazano bowiem, że obniżenie żywotności komórek raka płuca WI38VA [145], a także komórek raka piersi MCF-7 i MDA-MB-435 [146] pod wpływem 3,4,4',5-TMS wiąże się z jego zdolnością do indukcji apoptozy [145, 146]. W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że wyższa aktywność cytotoksyczna 3,4,4',4-TMS ($IC_{50}=0,71\pm 0,18 \mu M$) w komórkach A-2780 wiąże się z silniejszym działaniem proapoptotycznym ($EF=5,62$), w porównaniu do linii komórkowej SKOV-3 ($IC_{50}=11,51\pm 2,25 \mu M$; $EF=3,5$). Wyniki te potwierdzają spostrzeżenia Ma i wsp. (2008) w modelu linii komórkowej raka piersi [146]. 3,4,4',5-TMS obniżał żywotność zarówno komórek MDA-MB-435, jak i MCF-7. Zaobserwowano jednak, że aktywność cytotoksyczna badanego związku jest dużo wyższa w linii komórkowej MDA-MB-435, w porównaniu do MCF-7. Wykazano, że większa wrażliwość komórek MDA-MB-435 na cytotoksyczne działanie 3,4,4',5-TMS koreluje z bardziej nasilonymi parametrami procesu apoptozy [146]. Regulacja procesu apoptozy jest powiązana z proliferacją, różnicowaniem i transformacją nowotworową komórek [161]. Dlatego też badania mechanizmu proapoptotycznego działania 3,4,4',5-TMS były prowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej równoległe z oceną aktywności proliferacyjnej komórek raka jajnika pod wpływem badanego związku. W linii komórkowej A-2780 (bardziej wrażliwej na działanie 3,4,4',5-TMS) obserwowano zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M. Ma i wsp. (2008) potwierdzili w komórkach raka piersi MDA-MB-435 oraz MCF-7 proapoptotyczne działanie 3,4,4',5-TMS m.in. na drodze blokowania cyklu komórkowego w fazie G2/M. Wykazano jednak, że wyższe stężenia badanego związku

powodowały zniesienie zablokowania fazy G2/M, ale tylko w komórkach MCF-7 (bardziej opornych na indukcję apoptozy przez 3,4,4',5-TMS) [146]. W niniejszej pracy obserwowano, że 3,4,4',5-TMS powoduje zmniejszenie liczby komórek SKOV-3 (mniej wrażliwych na działanie 3,4,4',5-TMS) w fazie G2/M. Spostrzeżenia te może tłumaczyć fakt, że obniżona wrażliwość komórek na indukcję procesu apoptozy tj. SKOV-3 prowadzi często nie tylko do wydłużenia ich życia czy utrwalenia mutacji, ale także do wystąpienia zaburzeń cyklu komórkowego [161]. W wyniku badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej wykazano również, że 3,4,4',5-TMS powoduje zwiększenie ilości komórek SKOV-3 w fazie G0/G1, jednakże nie jest to wynik istotny statystycznie. Ma i wsp. (2008) porównali aktywność przeciwnowotworową 3,4,4',5-TMS oraz resweratrolu w komórkach MDA-MB-435 i MCF-7. Wykazano dużo słabsze działanie cytotoksyczne i proapoptotyczne resweratrolu [146], zatrzymującego cykl komórkowy w fazie G0/G1 [100, 146]. Obserwacje te mogą sugerować, że mniejsza aktywność 3,4,4',5-TMS w linii komórkowej SKOV-3 wiąże się z odmienną aktywnością proliferacyjną, w porównaniu do komórek A-2780. Istotna rola blokowania fazy G2/M w mechanizmie działania proapoptotycznego została ponadto wykazana w badaniach nad innymi metylowymi analogami resweratrolu takimi jak: 2,3',4,5'-tetrametoksystylben [147] czy 2,3',4,4',5'-pentametoksystylben [152].

Proces apoptozy, w zależności od rodzaju komórki oraz czynnika indukującego, może przebiegać w różny sposób angażując odmienne organelle komórkowe. Dwie najlepiej poznane ścieżki to szlak zewnętrzny, inaczej zwany receptorowym oraz wewnętrzny – mitochondrialny. Do pozostałych dróg sygnałowych apoptozy należą szlak pseudoreceptorowy granzym A lub B/perforyny, szlak sfingomielinowo-ceramidowy oraz szlak indukowany stresem [21]. Złożoność procesu apoptozy może sugerować istnienie również innych czynników, których znaczenie nie jest jeszcze poznane. Jak dotąd nie wyjaśniono wszystkich zależności pomiędzy szlakami sygnałowymi. Jednoczesna analiza genów, których produkty białkowe są zaangażowane w proces apoptozy na drodze mitochondrialnej oraz receptorowej może zatem dać szerszy wgląd w mechanizm działania badanego związku. W niniejszej pracy przeprowadzono analizę ekspresji panelu 84 genów pro- i antyapoptotycznych. Badanie to miało na celu wskazanie genów charakterystycznych dla szlaku poprzez który 3,4,4',5-TMS indukuje proces apoptozy w komórkach raka jajnika. Wyniki wskazują, że profil ekspresji tych genów jest wyraźnie różny w linii komórkowej SKOV-3, w porównaniu do A-2780. W komórkach SKOV-3 obserwowano zmieniony poziom ekspresji genów, charakterystycznych dla mechanizmu

wewnątrzkomórkowego apoptozy. Wyniki badań Gosslau i wsp. (2005) [145] oraz Ma i wsp. (2008) [146] potwierdzają zdolność 3,4,4',5-TMS do indukcji apoptozy drogą mitochondrialną. Mitochondria zawierają czynniki proapoptotyczne, których uwolnienie może nastąpić m.in. pod wpływem Bax. W niniejszej pracy wykazano w linii komórkowej SKOV-3, pod wpływem 3,4,4',5-TMS, wzrost poziomu transkryptu *Bax* oraz *Apaf-1*, których produkty białkowe odgrywają kluczową rolę w indukcji szlaku wewnątrzkomórkowego. Bax aktywuje bowiem otwieranie kanałów anionowych zależnych od napięcia (VDAC, ang. *voltage dependent anion channel*) zewnętrznej błony mitochondrialnej, co prowadzi do utraty jej potencjału i uwolnienia cytochromu c [162]. Apaf-1, wiążąc się natomiast do cytochromu c, wchodzi w skład apoptosomu [163]. Na straży tego procesu stoi jednak Bcl-2, który wykazuje działanie antyapoptotyczne m.in. poprzez zapobieganie uwalnianiu cytochromu c [164]. Nadekspresja białka Bcl-2 w komórkach nowotworowych może zatem powodować ich oporność na chemioterapeutyki poprzez hamowanie procesu apoptozy [165, 166]. Wykazanemu w pracy doktorskiej wzrostowi ekspresji genów proapoptotycznych towarzyszyło obniżenie poziomu transkryptów *Bcl-2* oraz *Bcl2l10*. Nadekspresja *Bcl2l10*, podobnie jak Bcl-2 zapobiega procesowi apoptozy poprzez hamowanie uwalniania cytochromu c z mitochondrium [167]. Można zatem stwierdzić, że 3,4,4',5-TMS moduluje w linii komórkowej SKOV-3 ekspresję genów, których produkty białkowe kontrolują przepuszczalność błony mitochondrialnej, a więc i regulują proces apoptozy zachodzący na drodze mechanizmu wewnątrzkomórkowego. Wyniki prezentowane w niniejszej pracy potwierdzają obserwacje Gosslau i wsp. (2005) [145]. 3,4,4',5-TMS powodował w linii komórkowej raka płuca WI38VA obniżenie ekspresji Bcl-2, a wzrost ekspresji Bax oraz stosunku Bax/Bcl-2, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Wykazano również, że proces apoptozy zachodzący na drodze mitochondrialnej w komórkach WI38VA jest zależny od p53. Zaobserwowano, że obniżonej ekspresji Bcl-2 oraz podwyższonej ekspresji Bax towarzyszył wzrost poziomu p53 [145]. Spostrzeżenia te potwierdzają wyniki prezentowane w rozprawie doktorskiej. Wykazano bowiem, że badany związek powoduje wzrost ekspresji *p53*, przy jednoczesnym wzroście ekspresji *Bax* oraz obniżeniu poziomu transkryptu *Bcl-2*. Wyniki sugerują, że 3,4,4',5-TMS w komórkach SKOV-3 reguluje zależnie od p53 profil ekspresji genów, których produkty białkowe kontrolują przepuszczalność błony mitochondrialnej.

Do inhibitorów apoptozy indukowanej zarówno na drodze mechanizmu wewnątrzkomórkowego, jak i receptorowego należy m.in. czynnik transkrypcyjny NFκB

[168]. W niniejszej rozprawie doktorskiej obserwowano, że badany związek powoduje istotny spadek ekspresji *NFκB* w linii komórkowej SKOV-3. Wyniki te potwierdzają liczne badania nad aktywnością biologiczną resweratrolu, wskazujące na jego rolę jako inhibitora *NFκB* [169-171]. Linia komórkowa raka jajnika SKOV-3 charakteryzuje się opornością m.in. na działanie TNF [159]. Spostrzeżenia te mogą tłumaczyć fakt, że w przypadku linii komórkowej SKOV-3 nie obserwowano zmiany profilu ekspresji genów charakterystycznych dla mechanizmu zewnątrzkomórkowego apoptozy. Wykazanie więc obniżonego poziomu transkryptu *NFκB* w komórkach SKOV-3 potwierdza wcześniejsze spostrzeżenia, że 3,4,4',5-TMS wpływa na poziom ekspresji genów związanych z apoptozą na drodze mitochondrialnej. W przeciwieństwie do komórek SKOV-3, w linii komórkowej A-2780 wykazano, że 3,4,4',5-TMS moduluje ekspresję genów, których produkty białkowe kontrolują apoptozę na drodze mechanizmu zewnątrzkomórkowego. Kluczowe znaczenie w tym procesie odgrywa m.in. TNF, cytokina indukująca proces apoptozy poprzez związanie z receptorem śmierci TNFR1 [172]. W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano w linii komórkowej A-2780 pod wpływem 3,4,4',5-TMS znaczący wzrost poziomu tylko jednego transkryptu *TNF*. Poziom mRNA *TNFR1* uległ natomiast obniżeniu (wynik nieznamiennej statystycznie). Obserwowano jednak podwyższenie ekspresji *FasL*, równie istotnego induktora zewnątrzkomórkowego jak *TNF*. Zwiększonej ekspresji *FasL* towarzyszył wzrost ekspresji receptora śmierci *Fas*. Jak dotąd nie pojawiły się w piśmiennictwie doniesienia na temat indukcji apoptozy zależnej od Fas przez 3,4,4',5-TMS oraz pozostałe metylowe pochodne resweratrolu. Jednakże badania prowadzone nad biologiczną aktywnością związku macierzystego - resweratrolu wykazały, że posiada on zdolność do indukcji apoptozy zależnej od Fas [106, 173, 174]. Clement i wsp. (1998) zaobserwowali, że resweratrol powoduje w liniach komórkowych HL60 oraz T47D wzrost ekspresji Fas i FasL. Wykazano ponadto, że proces apoptozy zachodzi na drodze zewnątrzkomórkowej, zależnej od Fas [106]. Su i wsp. (2005) [173] oraz Atten i wsp. (2005) [174] również obserwowali zdolność resweratrolu do indukcji apoptozy drogą receptorową, zależną od Fas [173, 174]. W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że podwyższonej ekspresji *Fas* i *FasL* towarzyszy wzrost aktywności kaspaz wykonawczych: 3 oraz 7. Ponadto badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej wykazują wzrost ekspresji genów proapoptotycznych *TNFRSF16*, *TNFRSF10A* oraz *TNFRSF21*, wchodzących w skład rodziny TNF. Spostrzeżenia te mogą zatem sugerować, że 3,4,4',5-TMS, podobnie jak resweratrol, indukuje w komórkach A-2780 proces apoptozy zależnej od Fas na drodze

mechanizmu zewnątrzkomórkowego. Jednakże wynik ten wymaga potwierdzenia poprzez analizę poziomu ekspresji białka.

Charakterystyczną cechą białek wchodzących w skład rodziny TNF jest aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF κ B, który – jak powszechnie wiadomo – bierze udział m.in. w hamowaniu procesu apoptozy. W aktywacji NF κ B przez białka z rodziny TNF pośredniczy sześć białek TRAF, jednak dokładny mechanizm ich działania nie został jak dotąd poznany [175]. TRAF1 hamuje apoptozę na poziomie receptorów błonowych poprzez wiązanie z inhibitorem apoptozy IAP1/BIRC2, który wykazuje zdolność hamowania aktywności kaspaz wykonawczych 3 i 7 [176]. W niniejszej rozprawie doktorskiej obniżonej ekspresji *TRAF1* towarzyszył spadek poziomu transkryptu *BIRC2* (ryc. 16). Pomimo, że nie obserwowano zmiany poziomu transkryptu *NF κ B* (wynik nieprezentowany), wykazano zwiększenie aktywności kaspaz wykonawczych: 3 oraz 7. Ponadto wykazano obniżenie poziomu ekspresji genów antyapoptotycznych *TRAF3*, *TRAF5* oraz *TRAF7*. Można zatem stwierdzić, że 3,4,4',5-TMS moduluje w linii komórkowej A-2780 ekspresję genów, których produkty białkowe kontrolują proces apoptozy zachodzący na drodze mechanizmu receptorowego. W niniejszej rozprawie doktorskiej po raz pierwszy wykazano zdolność 3,4,4',5-TMS do regulacji ekspresji genów charakterystycznych dla mechanizmu zewnątrzkomórkowego bądź wewnątrzkomórkowego apoptozy, zależnie od rodzaju komórek.

Jedno z założeń przeciwnowotworowego działania 3,4,4',5-TMS wpisuje się w prowadzone obecnie intensywne poszukiwanie leków aktywowanych bezpośrednio w komórce nowotworowej. Koncepcja ta oparta jest na spostrzeżeniu, że w komórkach nowotworowych często dochodzi do ekspresji charakterystycznych dla danego typu nowotworu enzymów, które nie są obecne w komórkach prawidłowych [177]. Poszukiwane są więc substancje, które mogą ulegać aktywacji w komórkach nowotworowych za sprawą specyficznie występujących w nich enzymów. Wykazano, że metaboliczna aktywacja cząsteczki 3,4,4',5-TMS prowadzi do powstania pochodnych posiadających zarówno grupy metylowe, jak i hydroksylowe [143]. W przypadku 3,4,4',5-TMS enzymem, który może katalizować jego biotransformację do aktywnych metabolitów jest CYP1B1 [178]. W komórkach prawidłowych enzym ten jest niewykrywalny, pomimo ekspresji na poziomie mRNA. Ekspresję zarówno białka, jak i mRNA CYP1B1 zidentyfikowano natomiast w komórkach wywodzących się z różnego typu nowotworów [68, 177]. Dlatego też aktywacja pro-leków do czynnych związków cytotoksycznych bezpośrednio w komórkach nowotworowych wydaje się obiecującą

strategią przeciwnowotworową. Jednym z takich związków jest *Phortress*, pro-lek aktywowany przez CYP1B1 i CYP1A1. Jednakże wykazano, że *Phortress*, poprzez swoje metabolity, powoduje jednocześnie wzrost ekspresji enzymów z rodziny CYP1 w linii komórkowej raka piersi MCF-7 [75]. CYP1A1 oraz CYP1B1 biorą udział w aktywacji prokancerogenów oraz hydroksylacji estronu do 17-beta-estradiolu, będącej kluczowym etapem kancerogenezy hormonozależnej [68]. Ponadto, enzymy z rodziny CYP1 ulegają często nadekspresji w ludzkich komórkach nowotworowych. W niniejszej rozprawie doktorskiej porównano poziom mRNA i białka CYP1A1 oraz CYP1B1 w badanych liniach komórkowych raka jajnika. Wykazano, że wyjściowy poziom ekspresji CYP1B1 był o połowę niższy w linii komórkowej A-2780, w porównaniu do komórek SKOV-3. Odmienne profile ekspresji CYP1B1 może m.in. tłumaczyć różną aktywność przeciwnowotworową 3,4,4',5-TMS w komórkach A-2780 oraz SKOV-3.

Ze względu na udział enzymów z rodziny CYP1 w procesie nowotworzenia, poszukiwanie inhibitorów CYP1A1 oraz CYP1B1 stanowi również jeden z głównych celów terapii przeciwnowotworowej. W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano zdolność 3,4,4',5-TMS do zmniejszania ekspresji CYP1A1, zarówno w linii komórkowej A-2780, jak i SKOV-3. Obserwowano również, że badany związek powoduje obniżenie poziomu mRNA oraz białka CYP1B1 w komórkach SKOV-3 (mniej wrażliwej na działanie 3,4,4',5-TMS). W linii komórkowej A-2780 wykazano natomiast całkowite wyciszenie ekspresji białka CYP1B1. Wcześniejsze doniesienia literaturowe wskazują jednakże, że CYP1B1 katalizuje biotransformację 3,4,4',5-TMS [178]. Spostrzeżenia te mogą zatem sugerować, że 3,4,4',5-TMS ulega najpierw metabolicznej aktywacji przez CYP1B1, a powstające metabolity poprzez układ sprzężenia zwrotnego modulują ekspresję enzymów CYP1B1 oraz CYP1A1. Sale i wsp. (2005) zaobserwowali, że pomimo braku zdolności 3,4,4',5-TMS do hamowania ekspresji COX-2, badany związek powodował obniżenie poziomu PGE-2 w komórkach raka okrężnicy HCA-7. Autorzy ci również sugerują, że to właśnie metabolity 3,4,4',5-TMS: 3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystylben, 4'-hydroksy-3,4,5-trimetoksystylben, 4-hydroksy-3,5,4'-trimetoksy-stylben oraz 3-hydroksy-4,5,4'-trimetoksystylben, pośredniczą w obniżeniu poziomu PGE-2. Ponadto wykazano, że w przeciwieństwie do badanego związku, jego metabolity posiadają zdolność do hamowania COX. Wyniki te mogą wyjaśniać udział 3,4,4',5-TMS w redukcji poziomu PGE-2 [144]. Aktywność biologiczna metabolitów 3,4,4',5-TMS była przedmiotem badań Androutsopoulos i wsp. (2011). Wykazano, że tylko jeden z nich: 3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystylben hamuje proliferację

komórek raka wątroby HepG2 oraz komórek raka piersi MCF-7, kierując je na drogę apoptozy [142]. Powyższe spostrzeżenia sugerują zatem, że metabolity 3,4,4',5-TMS mogą być aktywne biologicznie i wpływać na ekspresję CYP1B1 oraz CYP1A1. Prawidłowa interpretacja uzyskanych w niniejszej pracy wyników wymagałaby jednak przeprowadzenia dalszych badań uwzględniających syntezę metabolitów badanego związku.

Ekspresja enzymów z rodziny CYP1 jest aktywowana przez czynnik transkrypcyjny AhR [73]. Wykazano, że resweratrol, który podlega biotransformacji przez CYP1B1 do trzech metabolitów [130], jest jednocześnie antagonistą AhR oraz posiada zdolność hamowania CYP1A1 i CYP1B1 [179]. W świetle tych danych zbadano w niniejszej rozprawie doktorskiej wpływ 3,4,4',5-TMS na poziom mRNA i białka AhR. Wykazano, że zdolność 3,4,4',5-TMS do modulowania ekspresji CYP1A1 oraz CYP1B1 w liniach komórkowych SKOV-3 i A-2780 nie zależy od AhR. Pomimo, że obserwowano zmiany na poziomie transkryptu *AhR*, nie odnotowano istotnych różnic w ekspresji tego białka. Spostrzeżenia te potwierdzają wyniki badań Chun i wsp. (2005). Wykazano zdolność innej metylowej pochodnej resweratrolu 2,3',4,5'-tetrametoksystylbenu do modulowania ekspresji CYP1B1 na drodze mechanizmu również niezależnego od AhR [151].

Z uwagi na fakt, że komórki nowotworowe są w stanie ciągłego, niewielkiego stresu oksydacyjnego, nawet nieznaczne zmiany równowagi redoks mogą być przyczyną procesu apoptozy [51, 66]. W tym aspekcie związki o właściwościach prooksydacyjnych są potencjalnym narzędziem terapeutycznym. Wiedząc, że 3,4,4',5-TMS jest aktywowany metabolicznie do cytotoksycznych hydroksylowych i metylowych pochodnych [142], zbadano jego zdolność do indukcji stresu oksydacyjnego. W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że 3,4,4',5-TMS powoduje generowanie ROS w linii komórkowej A-2780 oraz SKOV-3. Ponadto obserwowane nasilenie stresu oksydacyjnego było proporcjonalne do wzrostu stężenia badanego związku, zarówno w komórkach SKOV-3, jak i A-2780. Powyższe spostrzeżenia sugerują, że indukcja stresu oksydacyjnego może być wynikiem metabolicznej aktywacji 3,4,4',5-TMS na drodze hydroksylacji przez enzymy z rodziny CYP1. Przykładem pro-leku wykazującego podobne działanie jest *Aryl Oxime*. W wyniku jego metabolizmu przez CYP1B1 dochodzi do indukcji stresu oksydacyjnego poprzez uwolnienie NO[•], co powoduje apoptozę komórek nowotworowych [68].

W celu analizy przeciwnowotworowego działania 3,4,4',5-TMS *in vivo* wykorzystano w niniejszej rozprawie doktorskiej metodę mysich ksenograftów SCID, pozbawionych funkcjonalnych limfocytów T i B. Wykorzystanie tego modelu eksperymentalnego pozwoliło na wszczepienie ludzkich komórek nowotworowych A-2780 (bardziej wrażliwych na cytotoksyczne działanie 3,4,4',5-TMS) bez ryzyka ich odrzucenia i zniszczenia przez układ immunologiczny. Jak dotąd, schemat badań *in vivo* obejmował każdorazowo, w odpowiednim przedziale czasowym dekapitację myszy, wycięcie guza i jego subiektywną ocenę. Model mysich ksenograftów SCID umożliwił przyżyciową, nieinwazyjną ocenę rozwoju guza i kontrolowanie odpowiedzi komórek nowotworowych na badany związek. Weryfikacji działania przeciwnowotworowego 3,4,4',5-TMS dokonano poprzez ocenę jego wpływu na rozmiary guza. Li i wsp. (2009) również wykorzystali metodę mysich ksenograftów w celu zbadania działania przeciwnowotworowego innej metylowej pochodnej resweratrolu: 2,3',4,4',5'-pentametoksystylbenu w komórkach raka okrężnicy HT-29. Wykazano zmniejszenie rozmiarów guza o 31% i 39%, odpowiednio w grupie zwierząt, którym podawano 2,3',4,4',5'-pentametoksystylben w stężeniu 25 mg/kg m. c. oraz 100 mg/kg m. c [152]. W przeciwieństwie do wyników Li i wsp. (2009), w niniejszej rozprawie doktorskiej nie wykazano istotnych różnic w rozmiarach guza pomiędzy grupą kontrolną a grupą badaną, która otrzymywała 3,4,4',5-TMS w stężeniu 100 mg/kg m. c. W badaniach Li i wsp. (2009) 2,3',4,4',5'-pentametoksystylben podano myszom po 10 dniach od momentu wszczepienia komórek (3 mln/mysz), kiedy objętość guza wynosiła 130 mm³ [152]. W eksperymencie prowadzonym w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej terapię 3,4,4',5-TMS rozpoczęto po 14 dniach od podania komórek (również 3 mln/mysz), kiedy rozmiar guza wynosił średnio 170 mm³. Spostrzeżenia te mogą sugerować, że późniejsze rozpoczęcie podawania 3,4,4',5-TMS oraz większe rozmiary guza wpłynęły na niepowodzenie terapii. Niewykazanie różnic w rozmiarach guzów pomiędzy grupą kontrolną i badaną może jednak wynikać z niskiej aktywności 3,4,4',5-TMS w warunkach eksperymentalnych *in vivo*. Badania Sale i wsp. (2005) z wykorzystaniem myszy *Apc^{Min+}*, stanowiących model kancerogeny układu pokarmowego, wykluczają możliwość braku aktywności biologicznej badanego związku *in vivo*. Wykazano bowiem, że 3,4,4',5-TMS powoduje zmniejszenie rozmiarów gruczolaka o 24%, w porównaniu do grupy kontrolnej [75]. Potwierdzenie przez Sale i wsp. (2005) przeciwnowotworowego działania badanego związku *in vivo* sugeruje, że rozpoczęcie - w ramach rozprawy doktorskiej - terapii

3,4,4',5-TMS o 4 dni później w porównaniu do badań Li i wsp. (2009), kiedy objętość guza przekracza 130 mm³, mogła mieć decydujący wpływ na jej niepowodzenie.

Podsumowując należy stwierdzić, że uzyskane w niniejszej pracy wyniki wyjaśniają częściowo mechanizm działania przeciwnowotworowego 3,4,4',5-TMS w linii komórkowej raka jajnika SKOV-3 oraz A-2780. Powszechnie uważa się, że komórki nowotworowe w drodze ewolucji rozwinęły i utrwały modyfikacje wielu szlaków sygnalizacyjnych, chroniących je przed odpowiedzią układu immunologicznego gospodarza. Dlatego też leki przeciwnowotworowe działające na drodze jednego mechanizmu okazują się często nieskuteczne. W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano wielokierunkowe działanie przeciwnowotworowe 3,4,4',5-TMS poprzez indukcję procesu apoptozy na drodze kilku mechanizmów. Pomimo, że rozprawa doktorska wpisuje się w znany od dawna problem poszukiwań związków przeciwnowotworowych działających poprzez indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych, stanowi jednak część nowego kierunku badań związków zdolnych do selektywnej inhibicji lub obniżenia ekspresji obecnych w komórkach nowotworowych enzymów z rodziny CYP1. Istotne znaczenie w aspekcie terapeutycznym może mieć korelacja pomiędzy wyjściowym poziomem ekspresji CYP1B1 a działaniem badanego związku. Uzyskane wyniki sugerują, że różny poziom ekspresji CYP1B1 może warunkować wrażliwość komórek na cytostatyki stosowane w terapii raka jajnika.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Przeprowadzona analiza cytotoksyczności 12 metylowych pochodnych resweratrolu na 11 nowotworowych liniach komórkowych umożliwiła wyselekcjonowanie 3,4,4',5-TMS. Do dalszych badań wybrano linię komórkową raka jajnika A-2780, w której badany związek wykazał najwyższą aktywność cytotoksyczną ($IC_{50}=0,71\pm 0,18 \mu M$), a także linię komórkową wywodzącą się z tego samego nowotworu SKOV3, charakteryzującą się dużo mniejszą wrażliwością na 3,4,4',5-TMS ($IC_{50}=11,51\pm 2,25 \mu M$).
2. Cytotoksyczne działanie 3,4,4',5-TMS można wiązać z jego zdolnością do indukcji procesu apoptozy. Wyższa aktywność cytotoksyczna badanego związku w komórkach A-2780 koreluje z silniejszym działaniem proapoptotycznym 3,4,4',5-TMS, w porównaniu do linii komórkowej SKOV-3.
3. W modelu eksperymentalnym *in vitro* wykazano plejotropowe działanie przeciwnowotworowe 3,4,4',5-TMS poprzez indukcję procesu apoptozy w liniach komórkowych raka jajnika A-2780 oraz SKOV-3 na drodze kilku mechanizmów.
4. Badany związek wpływa na aktywność proliferacyjną komórek A-2780. Wykazano bowiem, że 3,4,4',5-TMS powoduje zablokowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M.
5. 3,4,4',5-TMS moduluje, zależnie od rodzaju komórek, poziom ekspresji genów pro- i antyapoptotycznych, charakterystycznych dla mechanizmu wewnątrzkomórkowego lub zewnątrzkomórkowego apoptozy. W komórkach SKOV-3 obserwowano pod wpływem badanego związku zmieniony profil ekspresji genów, których produkty białkowe kontrolują przepuszczalność błony mitochondrialnej, a więc i regulują proces apoptozy zachodzący na drodze mechanizmu wewnątrzkomórkowego. W linii komórkowej A-2780, wykazano zdolność 3,4,4',5-TMS do modulowania poziomu transkryptów charakterystycznych dla mechanizmu zewnątrzkomórkowego apoptozy oraz zwiększania aktywności kaspaz wykonawczych 3 i 7. Działanie przeciwnowotworowe badanego związku w komórkach A-2780 może zatem wynikać m.in. ze zdolności 3,4,4',5-TMS do indukcji apoptozy na drodze mechanizmu zewnątrzkomórkowego apoptozy.

6. Sugeruje się, że 3,4,4',5-TMS ulega najpierw metabolicznej aktywacji przez CYP1B1, a powstające metabolity poprzez układ sprzężenia zwrotnego modulują ekspresję enzymów CYP1B1 oraz CYP1A1. W linii komórkowej A-2780 wykazano całkowite wyciszenie ekspresji białka CYP1B1, którego wyjściowy poziom był o połowę niższy w porównaniu do komórek SKOV-3. Odmienny profil ekspresji CYP1B1 w badanych liniach komórkowych może tłumaczyć ich różną wrażliwość na 3,4,4',5-TMS. Sugeruje się, że różny poziom ekspresji CYP1B1 może warunkować odpowiedź komórek na cytostatyki stosowane w terapii raka jajnika.
7. Zdolność badanego związku do indukcji stresu oksydacyjnego w liniach komórkowych A-2780 oraz SKOV-3 może być wynikiem metabolicznej aktywacji 3,4,4',5-TMS na drodze hydroksylacji przez enzymy z rodziny CYP1.
8. Wykazany w modelu eksperymentalnym mysich ksenograftów SCID brak różnic w rozmiarach guza pomiędzy grupą kontrolną a grupą badaną otrzymującą 3,4,4',5-TMS w stężeniu 100 mg/kg m. c. nie wyklucza jego aktywności biologicznej *in vivo*.

7. ZASTOSOWANE SKRÓTY

ACTB- beta-aktyna (*beta actin*)
ADS- antyoksydacyjny układ ochrony organizmu (*antioxidant defense system*)
AhR- receptor węglowodorów arylowych (*aryl hydrocarbon receptor*)
AIFs (*apoptosis-inducing factors*)
ARNT- translokaza jądrowa – (*AhR nuclear translocator*)
B₂M- beta-2-mikroglobulina (*beta-2-microglobulin*)
Bax (*BCL2-associated X protein*)
Bcl-2 (*B cell lymphoma gene-2*)
Bid (*BH3 interacting domain death agonist*)
BIM- mediator śmierci komórki (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*)
BIRC2 (*baculoviral IAP repeat containing 2*)
CAPK (*ceramide-activated protein kinases*)
CAPP (*ceramide-activated protein phosphatase*)
CARD- domena aktywacji i rekrutacji kaspaz (*caspase activation and recruitment domain*)
CAT- katalaza (*catalase*)
COMT- katechol-O-metyltransferaza (*catechol O-methyltransferase*)
COX-1,-2- cyklooksygenaza-1, -2 (*cyclooxygenase-1, -2*)
Cp (*crossing point*)
CU- wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*colitis ulcerosa*)
DCF- 2',7' - dichlorofluoresceina
DD- domena śmierci (*death domain*)
DED- domena wykonawcza śmierci (*death effector domains*)
DISC (*Death-inducing signaling complex*)
DMSO- dimetylosulfotlenek (*dimethyl sulfoxide*)
DMU-214- 3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystylben
DMU-281- 4'-hydroksy-3,4,5-trimetoksystylben
DMU-291- 4-hydroksy-3,5,4'-trimetoksystylben
DMU-807- 3-hydroksy-4,5,4'-trimetoksystylben
DR- receptor śmierci (*death receptor*)
DSS (*dextran sodium sulphate*)
EF (*enrichment factor*)
FADD (*Fas-associated death domain*)
FAK (*focal adhesion kinase*)
FBS- płodowa surowica bydlęca (*fetal bovine serum*)
GAPDH- dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)
GR- reduktaza glutationowa (*glutathione reductase*)
GSH-Px- peroksydaza glutationowa (*glutathione peroxidase*)
GST- transferaza glutationowa (*glutathione S-transferase*)
GST- transferaza glutationowa (*glutathione S-transferase*)

H₂DCF- 2',7'-dichlorodihydrofluoresceina
 H₂DCF-DA- dioctan 2'-7'- dichlorofluorescyny
 H₂O₂- nadtlenek wodoru
 HBSS (*Hank's balanced salt solution*)
 HOCl- kwas podchlorawy
 HPRT1- fosforybozylo-transferaza hipoksantyno-guaninowa (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase*)
 HRP- peroksydaza chrzanowa (*horseradish peroxidase*)
 IAPs- inhibitory apoptozy (*inhibitors of apoptosis*)
 iNOS- indukowalna syntaza tlenu azotu (*inducible nitric oxide synthase*)
 LASS (*longevity assurance genes*)
 LDL (*low density lipoprotein*)
 MAPK (*mitogen-activated protein kinases*)
 MDM2 (*murine double minute 2*)
 MFO- wieloczynnościowa monooksygenaza (*mixed function oxidase*)
 NATs- aryloamino N-acetyltransferazy (*arylamine N-acetyltransferases*)
 NO[•]- tlenek azotu
 O₂⁻- anionorodnik ponadtlenkowy
 O₃- ozon
 OH[•]- rodnik hydroksylowy
 PBMC- jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)
 PBS (*phosphate buffered saline*)
 PCAF- (*p300/CBP-associated factor*)
 PGE-2- prostaglandyna E2 (*prostaglandin E2*)
 PI3K- 3-kinaza fosfatydyloinozytolu –(*phosphatidylinositol 3-kinase*)
 PKA (*protein kinase A*)
 PMS- 2,3',4,4',5'-pentametoksystylben
 ROS- reaktywne formy tlenu (*reactive oxygen species*)
 RPL13A (*60S ribosomal protein L13A*)
 RR- reduktaza rybonukleotydowa (*ribonucleotide reductase*)
 RT-qPCR- PCR w czasie rzeczywistym (*Real-time quantitative PCR*)
 SCID (*severe combined immunodeficiency*)
 SOD- dysmutaza ponadtlenkowa (*superoxide dismutase*)
 SULTs- sulfotransferazy (*sulfotransferases*)
 tBid (*truncated Bid*)
 TMS- 2,3',4,5'-tetrametoksystylben
 TNF- czynnik martwicy nowotworów (*tumor necrosis factor*)
 TNFR (*tumor necrosis factor receptor*)
 TNFRSF10A (*tumor necrosis factor receptor superfamily*)
 TPMT- S-metyltransferaza tiopuryny (*thiopurine S-methyltransferase*)
 TRADD (*TNFR-1 associated death domain*)
 TRAF1 (*TNF receptor-associated factor*)
 TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*)

UGT- UDP-glukuronozylotransferaza (*UDP-glucuronosyltransferase*)

WHO- Światowa Organizacja Zdrowia (*World Health Organization*)

XRE- elementy odpowiedzi na ksenobiotyki (*xenobiotic response elements*)

YWHAZ (*14-3-3 protein zeta/delta*)

2',3,3',4,4'-PMS- 2',3,3',4,4'-pentametoksystylben

2',3,3',4-TMS- 2',3,3',4-tetrametoksystylben

2',3,4,4',5'-PMS- 2',3,4,4',5'-pentametoksystylben

2',3,4,4'-TMS- 2',3,4,4'-tetrametoksystylben

3,3',4,4',5,5'-HMS- 3,3',4,4',5,5'-heksametoksystylben

3,3',4,5,5'-PMS- 3,3',4,5,5'-pentametoksystylben

3,3',4,5'-TMS- 3,3',4,5'-tetrametoksystylben

3,3',5,5'-TMS- 3,3',5,5'-tetrametoksystylben

3,4,4',5-TMS/ DMU-212- 3,4,4',5-tetrametoksystylben

3,4,4',5'-TMS- 3,4,4',5'-tetrametoksystylben

3,4',5-tMS- 3,4',5-trimetoksystylben

3',4,4',5-TMS- 3',4,4',5-tetrametoksystylben

8. PIŚMIENNICTWO

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> dostęp do strony: 10.08.2011
2. Wojciechowska U, Didkowska J, Zatoński W. Cancer in Poland in 2006. Centrum Onkologii. Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie 2008; Warszawa.
3. Albano JD, Ward E, Jemal A, Anderson R, Cokkinides VE, Murray T, Henley J, Liff J, Thun MJ. Cancer mortality in the United States by education level and race. *J Natl. Cancer Inst* 2007; 99: 1384-1394.
4. Aapro M, Monfardini S, Jirillo A, Basso U. Management of primary and advanced breast cancer in older unfit patients (medical treatment). *Cancer Treat Rev* 2009; 35:503-508.
5. Sulmasy DP. Cancer care, money, and the value of life: whose justice? Which rationality? *J Clin Oncol* 2007; 25: 217-222.
6. Grusenmeyer, PA, Wong YN. Interpreting the economic literature in oncology. *J Clin Oncol* 2007; 25: 196-202.
7. Krishna Moorthy H, Venugopal P. Strategies for prostate cancer prevention: Review of the literature. *Indian J Urol* 2008; 24: 295–302.
8. Meyskens FL Jr, Tully P. Principles of cancer prevention. *Semin Oncol Nurs* 2005; 21: 229-235.
9. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 239-267.
10. Butterworth BE. Consideration of both genotoxic and nongenotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential. *Mutat Res* 1990; 239:117-132.
11. Greenwald P, Kelloff G, Burch-Whitman C, Kramer BS. Chemoprevention. *CA Cancer J Clin* 1995; 45:31-49.
12. Guilford JM, Pezutto JM. Natural products as inhibitors of carcinogenesis. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17: 1341-1352.
13. Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Fay JR, Lubet RA, Crowell JA, Sigman CC. Mechanistic considerations in chemopreventive drug development. *J Cell Biochem Suppl* 1994; 20: 1-24.
14. Baer-Dubowska W, Ignatowicz E. Chemoprevention of Cancer: Basic mechanisms and molecular targets - rozdział w: Carcinogenic and anticarcinogenic food components. (Eds Baer-Dubowska W, Bartoszek A, Malejka-Giganti D) *CRC Taylor&Francis, Boca Raton FL* 2005; 175-194.
15. Geske FJ, Gerschenson LE. The biology of apoptosis. *Human patol* 2001; 32: 1029-1038.
16. Gupta S. Apoptosis/Programmed Death. A historical perspective. *Adv Exp Med Biol* 1996, 406: 1-9.
17. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-245.
18. Ahuja V, Dieckgraefe BK, Anant S. Molecular biology of the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 90–94.
19. Kiernan JA. Production and life span of cutaneous mast cells in young rats. *J Anat* 1979; 128: 225–238.
20. Baldi A, Santini D, Russo P, Catricala C, Amantea A, Picardo M, Tatangelo F, Botti G, Dragonetti E, Murace R, Tonini G, Natali PG, Baldi F, Paggi MG. Analysis of APAF-1 expression in human cutaneous melanoma progression. *Exp Dermatol* 2004; 13:93-97.

21. Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Cell Biochem Funct* 2011; 29:468-480.
22. Tepper AD, Ruurs P, Wiedmer T, Sims PJ, Borst J, van Blitterswijk WJ. Sphingomyelin hydrolysis to ceramide during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology. *J Cell Biol* 2000; 150: 155–164.
23. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell* 2011; 140: 871–882.
24. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 2008; 27: 6194–6206.
25. Ho P, Hawkins CJ. Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS Journal* 2005; 272: 5436-5453.
26. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 115: 2665-2672.
27. Ziegler DS, Kung AL. Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. *Curr Opin Oncol* 2008; 20: 97-103.
28. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; 403: 98-103.
29. Degli-Esposti M. To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 535–542.
30. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997; 276: 111–113.
31. Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* 1996; 2: 574–577.
32. Collison A, Foster PS, Mattes J. Emerging role of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a key regulator of inflammatory responses. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36: 1049–1053.
33. Stępień A, Izdebska M, Grzanka A. Rodzaje śmierci komórki. *Postępy Hig Med Dosw* 2007; 61: 420-428.
34. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 2000; 12: 599–609.
35. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 2000; 12: 611–620.
36. Daniel PT. Dissecting the pathways to death. *Leukemia* 2000; 14: 2035-2044.
37. Ockner RK. Apoptosis and liver diseases: recent concepts of mechanism and significance. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 248-260.
38. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000. 102: 33-42.
39. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000;. 102: 43-53.
40. Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 153-159.

41. Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 2002; 84: 203-214.
42. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* 2003; 7: 249-257.
43. Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331: 851-858.
44. Cullen SP, Brunet M, Martin SJ. Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death Differ* 2011; 17: 616–623.
45. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: All roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 401-409.
46. Thiery J, Keefe D, Saffarian S, Martinvalet D, Walch M, Boucrot E, Kirchhausen T, Lieberman J. Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. *Blood* 2010; 115: 1582–1593.
47. Lieberman J, Fan Z. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 553-559.
48. Barak A, Morse LS, Goldkorn T. Ceramide: a potential mediator of apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 247-254.
49. Shiraishi H, Okamoto H, Yoshimura A, Yoshida H. ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J Cell Sci* 2006; 119: 3958-3966.
50. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1147-1150.
51. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updates* 2004; 7: 97-110.
52. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 718-744.
53. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radical, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872-878.
54. Zabłocka A, Janusz M. Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych. *Postepy Hig Med Dosw* 2008; 62: 118-124.
55. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
56. Swartz HM, Gutierrez PL. Free radical increases in cancer: evidence that there is not a real increase. *Science* 1977; 198: 936–938.
57. Ścibor-Bentkowska D, Czczot H. Komórki nowotworowe a stres oksydacyjny. *Postepy Hig Med. Dosw* 2009; 63: 58-72.
58. Hlavata L, Aguilaniu H, Pichova A, Nystrom T. The oncogenic RAS2(val19) mutation locks respiration, independently of PKA, in a mode prone to generate ROS. *EMBO J* 2003; 22: 3337–3345.
59. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals and antioxidants. *Nutrition* 1996; 12: 274–277.
60. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 276–285.
61. Carew JS, Zhou Y, Albitar M, Carew JD, Keating MJ, Huang P. Mitochondrial DNA mutations in primary leukemia cells after chemotherapy: clinical significance and therapeutic implications. *Leukemia* 2003; 17: 1437–1447.

62. Davies KJ. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life* 1999; 48: 41–47.
63. Antunes F, Cadenas E. Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H₂O₂: submicromolar levels of H₂O₂ induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1008–1018.
64. Sade H, Sarin A. Reactive oxygen species regulate quiescent Tcell apoptosis via the BH3-only proapoptotic protein BIM. *Cell Death Differ* 2004; 1: 416-423.
65. Davis Jr W, Ronai Z, Tew KD. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296: 1–6.
66. Das KC, White CW. Redox system of the cell: possible links and implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 9617–9618.
67. Seńczuk W. Toksykologia. Rozdział 5. 6. Biotransformacja trucizn str. 99-124. *Wydawnictwo Lekarskie PZWL* 1995.
68. McFadyen MC, Melvin WT, Murray GI. Cytochrome P450 enzymes: novel options for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* 2004; 3:363-371.
69. Zemleduch A, Tomaszewska B. Komórkowy system detoksykacji zanieczyszczeń organicznych u roślin. *Postępy Biol Kom* 2007; 34: 635-649.
70. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2010; 154: 103-16.
71. Kohalmy K, Vrzal R. Regulation of phase II biotransformation enzymes by steroid hormones. *Curr Drug Metab* 2011; 12: 104-23.
72. Bruno RD, Njar VC. Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 5047-60.
73. Safe S. Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol Lett* 2001; 120: 1–7.
74. Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 309-334.
75. Leong CO, Gaskell M, Martin EA, Heydon RT, Farmer PB, Bibby MC, Cooper PA, Double JA, Bradshaw TD, Stevens MFG. Antitumor 2-(4-aminophenyl) benzothiazoles generate DNA adducts in sensitive tumor cells in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 2003; 88: 470–477.
76. Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, Melvin WT. Tumor specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res* 1997; 57: 3026–3031.
77. Gibson P, Gill JH, Khan PA, Seargent JM, Sandie WM, Batman PA, Griffith J, Bradley Ch, Double JA, Bibby MC, Loadman PM. Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) is overexpressed in human colon adenocarcinomas relative to normal colon: implications for drug development. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 527–534.
78. Murray GI, Shaw D, Weaver RJ, McKay JA, Ewen SW, Melvin WT, Burke MD. Cytochrome P450 expression in esophageal cancer. *Gut* 1994; 35: 599–603.
79. Gordan JD, Vonderheide RH. Universal tumor antigens as targets for immunotherapy. *Cytotherapy* 2002; 4: 317–27.
80. Paul B, Masih I, Deopujari J, Charpentier C. Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakhasava, an ayurvedic medicine in India. *J Ethnopharmacol* 1999; 68: 71-76.

81. Lippi G, Franchini M, Falavaro EJ, Targher G. Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the "French paradox". *Semin Thromb Hemost* 2010; 36: 59-70.
82. Pervaizi S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *Faseb J* 2003; 17: 1975- 1985.
83. Waterhouse A, Trela B. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. *Agric Food Chem* 1996; 44: 1253-1257.
84. Szekeres T, Fritzer-Szekeres M, Saiko P, Jager W. Resveratrol and resveratrol analogues- structure-activity relationship. *Pharm Res* 2010; 27: 1042-1048.
85. Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53: 115-128.
86. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat Res* 2008; 658: 68-94.
87. TePaske MR, Plattner RD, White JE, Clement SL, Powell RG. Isolation of resveratrol from *Festuca versuta* and evidence for the widespread occurrence of this stilbene in the Poaceae. *Phytochemistry* 1994; 35: 335-338.
88. Ali Z, Tanaka T, Iliya I, Iinuma M, Furusawa M, Ito T, Nakaya K, Murata J, Darnaedi D. Phenolic constituents of *Gnetum klossi*. *J Nat Prod* 2003; 66: 558-560.
89. Rimando AM, Kalt W, Magee JB, Dewey J, Ballington J. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in *Vaccinium* berries. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 4713-4719.
90. Robb EL, Stuart JA. trans-Resveratrol as a neuroprotectant. *Molecules* 2010; 15: 1196-1212.
91. Das DK, Mukherjee S, Ray D. Resveratrol and red wine, healthy heart and longevity. *Heart Fail Rev* 2010; 15: 467-77.
92. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997; 275: 218-220.
93. Zini R, Morin C, Bertelli A, Bertelli AA, Tillement JP. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp Clin Res* 1999; 25: 87-97.
94. Losa GA. Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 818-823.
95. Olas B, Wachowicz B, Majsterek I, Blasiak J. Resveratrol may reduce oxidative stress induced by platinum compounds in human plasma, blood platelets and lymphocytes. *Anticancer Drugs* 2005; 16: 659-665.
96. Hung LM, Su MJ, Chu WK, Chiao CW, Chan WF, Chen JK. The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *Br J Pharm* 2002; 135: 1627-1633.
97. Wyke SM, Russell ST, Tisdale MJ. Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappaB activation. *Br J Cancer* 2004; 91: 1742-1750.
98. Gupta SC, Kim JH, Kannappan R, Reuter S, Dougherty PM, Aggarwal BB. Role of nuclear factor kappaB-mediated inflammatory pathways in cancer-related symptoms and their regulation by nutritional agents. *Exp Biol Med* 2011; 236: 658-671.
99. Horvath Z, Saiko P, Illmer C, Madlener S, Hoechtl T, Bauer W, Erker T, Jaeger W, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T. Synergistic action of resveratrol, an ingredient of

- wine, with Ara-C and tiazofurin in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Exp Hematol* 2005; 33: 329–335.
100. Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, Gerez C, Guittet O. Resveratrol: a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett* 1998; 421: 277–279.
 101. Zhou R, Fukui M, Choi HJ, Zhu BT. Induction of a reversible, non-cytotoxic S-phase delay by resveratrol: implications for a mechanism of life-span prolongation and cancer protection. *Brit J Pharmacol* 2009; 158: 462–474.
 102. Fulda S, Debatin KM. Sensitization for tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Cancer Res* 2004; 64: 337–346.
 103. Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 558–563.
 104. Fulda S, Debatin KM. Sensitization for anticancer drug induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Oncogene* 2004; 23: 6702–6711
 105. Fulda S, Debatin KM. Resveratrol-mediated sensitisation to TRAIL-induced apoptosis depends on death receptor and mitochondrial signaling. *Eur J Cancer* 2005; 41: 786–798.
 106. Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, Pervaiz S. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood* 1998; 92: 996–1002.
 107. Delmas D, Rebe C, Micheau O, Athias A, Gambert P, Grazide S, Laurent G, Latruffe N, Solary E. Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene* 2004; 23: 8979–8986.
 108. Dorrie J, Gerauer H, Wachter Y, Zunino SJ. Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res* 2001; 61: 4731–4739.
 109. Sareen D, van Ginkel PR, Takach JC, Mohiuddin A, Darjatmoko SR, Albert DM, Polans AS. Mitochondria as the primary target of resveratrol-induced apoptosis in human retinoblastoma cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 3708–3716.
 110. Jiang H, Zhang L, Kuo J, Kuo K, Gautam SC, Groc L, Rodriguez AI, Koubi D, Hunter TJ, Corcoran GB, Seidman MD, Levine RA. Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 554–556.
 111. Aziz MH, Nihal M, Fu VX, Jarrard DF, Ahmad N. Resveratrol-caused apoptosis of human prostate carcinoma LNCaP cells is mediated via modulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1335–1341.
 112. Sexton E, Van Themsche C, LeBlanc K, Parent S, Lemoine P, Asselin E. Resveratrol interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells. *Mol Cancer* 2006; 5: 45.
 113. Li Y, Liu J, Liu X, Xing K, Wang Y, Li F, Yao L. Resveratrol-induced cell inhibition of growth and apoptosis in MCF7 human breast cancer cells are associated with modulation of phosphorylated Akt and caspase-9. *Appl. Biochem. Biotechnol* 2006; 135: 181–192.
 114. Lin HY, Tang HY, Davis FB, Davis PJ. Resveratrol and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1215: 79–88.
 115. Shih A, Zhang SL, Cao JH, Boswell S, Wu YH, Tang HY, Lennartz MR, Davis FB, Davis PJ, Lin HY. Inhibitory effect of EGF on resveratrol-induced apoptosis in

- prostate cancer cells is mediated by protein kinase C- α . *Mol Cancer Ther* 2004; 11: 1355–1364.
116. Tang HY, Shih A, Cao HJ, Davis FB, Davis PJ, Lin HY. Inducible COX-2 facilitates p53-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2034–2204.
 117. Lin HY, Sun MZ, Tang HY, Simone TM, Wu YH, Grandis JR, Cao HJ, Davis PJ, Davis FB. Resveratrol causes COX-2- and p53-dependent apoptosis in head and neck squamous cell cancer cells. *J Cell Biochem* 2008; 104: 2131–2142.
 118. Lin C, Crawford DR, Lin S, Hwang J, Sebuyira A, Meng R, Westfall JE, Tang HY, Lin S, Yu PY, Davis PJ, Lin HY. Inducible COX-2-dependent apoptosis in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis* 2011; 32: 19-26.
 119. Narayanan BA, Narayanan NK, Re GG, Nixon DW. Differential expression of genes induced by resveratrol in LNCaP cells: P53-mediated molecular targets. *Int J Cancer* 2003; 104: 204-212.
 120. Zhang SL, Cao JH, Davis FB, Tang HY, Davis PJ, Lin HY. Oestrogen inhibits resveratrol-induced posttranslational modification of p53 and apoptosis in breast cancer cells. *Br J Cancer* 2004; 91: 178-185.
 121. Kartal M, Saydam G, Sahin F, Baran Y. Resveratrol triggers apoptosis through regulating ceramide metabolizing genes in human K562 chronic myeloid leukemia cells. *Nutr Cancer* 2011; 63: 637-44.
 122. Cakir Z, Saydam G, Sahin F, Baran Y. The roles of bioactive sphingolipids in resveratrol-induced apoptosis in HL60: acute myeloid leukemia cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137: 279-86.
 123. Krasnow MN, Murphy TM. Polyphenol glucosylating activity in cell suspensions of grape (*Vitis vinifera*). *J Agric Food Chem* 2004; 52: 3467-3472.
 124. Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem* 2003; 36: 79-87.
 125. Meng X, Maliakal P, Lu H, Lee MJ, Yang CS. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *J Agricultural Food Chem* 2004; 52: 935–942.
 126. Gescher AJ, Steward WP. Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer Epid Biomarkers and Prevention* 2003; 12: 953–957.
 127. Yu C, Shin YG, Chow A, Li Y, Kosmeder JW, Lee YS, Hirschelman WH, Pezzuto JM, Mehta RG, Van Breeman RB. Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm Res* 2002; 19: 1907–1914.
 128. Miksits M, Maier-Salamon A, Aust S, Thalhammer T, Reznicek G, Kunert O, Haslinger E, Szekeres T, Jaeger W. Sulfation of resveratrol in human liver: evidence of a major role for the sulfotransferases SULT1A1 and SULT1E1. *Xenobiotica* 2005; 35: 1101–1119.
 129. Maier-Salamon A, Hagenauer B, Wirth M, Gabor F, Szekeres T, Jager W. Increased transport of resveratrol across monolayers of the human intestinal Caco-2 cells is mediated by inhibition and saturation of metabolites. *Pharm Res* 2006; 23: 2107–2115.
 130. Potter GA, Patterson LH, Wanogho E, Perry PJ, Butler PC, Ijaz T, Ruparelia KC, Lamb JH, Farmer PB, Stanley LA, Burke MD. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *Br J Cancer* 2002; 86: 774-778.

131. Piver B, Fer M, Vitrac X, Merillon JM, Dreano Y, Berthou F, Lucas D. Involvement of cytochrome P450 1A2 in the biotransformation of *trans*-resveratrol in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 2004; 15: 773-782.
132. Ciolino HP, Yeh GC. Inhibition of aryl hydrocarbon-induced cytochrome P-450 1A1 enzyme activity and CYP1A1 expression by resveratrol. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 760–767.
133. Ovesna Z, Horvathova-Kozics K. Structure-activity relationship of *trans*-resveratrol and its analogues. *Neoplasma* 2005; 52: 450-455.
134. Li H, Wu WK, Li ZJ, Chan KM, Wong CC, Ye CG, Yu L, Sung JJ, Cho CH, Wang M. 2,3',4,4',5'-Pentamethoxy-*trans*-stilbene, a resveratrol derivative, inhibits colitis-associated colorectal carcinogenesis in mice. *Br J Pharmacol* 2010; 160: 1352-1361.
135. Cardile V, Chillemi R, Lombardo L, Sciuto S, Spatafora C, Tringali C. Antiproliferative activity of methylated analogues of E- and Z-resveratrol. *Z Naturforsch C* 2007; 62: 189–195.
136. Pan MH, Gao JH, Lai ChS, Wang YJ, Chen WM, Lo ChY, Wang M, Dushenkov S, Ho ChT. Antitumor activity of 3,5,40-trimethoxystilbene in COLO205 cells and xenografts in SCID mice. *Mol Carcinog* 2008; 47: 184–196.
137. Simoni, D, Roberti M, Invidiata FP, Aiello E, Aiello S, Marchetti P, Baruchello R, Eleopra M, Di Cristina A, Grimaudo S, Gebbia N, Crosta L, Dieli F, Tolomeo M. Stilbene-based anticancer agents: resveratrol analogues active toward HL60 leukemic cells with a non-specific phase mechanism. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16: 3245–3248.
138. Schneider Y, Fischer B, Coelhob D, Roussia S, Gossea F, Bischoffb P, Raula F. (Z)-3,5,40-Tri-O-methyl-resveratrol, induces apoptosis in human lymphoblastoid cell independently of their p53 status. *Cancer Letters* 2004; 211: 155–161.
139. Weng CJ, Yang YT, Ho CT, Yen GC. Mechanisms of apoptotic effects induced by resveratrol, dibenzoylmethane, and their analogues on human lung carcinoma cells. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 5235–5243.
140. Yang YT, Weng ChJ, Ho ChT, Yen GCh. Resveratrol analog-3,5,40-trimethoxy-*trans*-stilbene inhibits invasion of human lung adenocarcinoma cells by suppressing the MAPK pathway and decreasing matrix metalloproteinase-2 expression. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53: 407–416.
141. Schneider Y, Fischer B, Coelho D, Roussi S, Gosse F, Bischoff P, Raul F. (Z)-3,5,4'-Tri-O-methyl-resveratrol, induces apoptosis in human lymphoblastoid cells independently of their p53 status. *Cancer Letters* 2004; 211: 155–161.
142. Androutopoulos VP, Ruparelia KC, Papakyriakou A, Filippakis H, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Anticancer effects of the metabolic products of the resveratrol analogue, 3,4,4',5-TMS: structural requirements for potency. *Eur J Med Chem* 2011; 46: 2586-2595.
143. Sale S, Verschoyle RD, Boocock D, Jones DJL, Wilsher N, Ruparelia KC, Potter GA, Farmer PB, Steward WP, Geshler AJ. Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue *trans* 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene. *British J Cancer* 2004; 90: 736-744.
144. Sale S, Tunstall RG, Ruparelia KC, Potter GA, Steward WP, Geshler AJ. Comparison of the effects of the chemopreventive agent resveratrol and its synthetic analog *trans* 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (3,4,4',5-TMS) on adenoma

- development in the Apc(Min+) mouse and cyclooxygenase-2 in human-derived colon cancer cells. *Int J Cancer* 2005; 115: 194-201.
145. Gosslau A, Chen M, Ho CT, Chen KY. A methoxy derivative of resveratrol analogue selectively induced activation of the mitochondrial apoptotic pathway in transformed fibroblasts. *British J Cancer* 2005; 92: 513-521.
 146. Ma Z, Molavi O, Haddadi A, Lai R, Gossage RA, Lavasanifar A. Resveratrol analog trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (3,4,4',5-TMS) mediates anti-tumor effects via mechanism different from that of resveratrol. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 63: 27- 35.
 147. Park H, Aiyar SE, Fan P, Wang J, Yue W, Okouneva T, Cox C, Jordan MA, Demers L, Cho H, Kim S, Song RX, Santen RJ. Effects of tetramethoxystilbene on hormone-resistant breast cancer cells: biological and biochemical mechanisms of action. *Cancer Res* 2007; 67: 5717-5726.
 148. Chun YJ, Oh YK, Kim BJ, Kim D, Kim SS, Choi HK, Kim MY. Potent inhibition of human cytochrome P450 1B1 by tetramethoxystilbene. *Toxicol Lett* 2009; 189: 84-89.
 149. Chun YJ, Kim S, Kim D, Lee SK, Guengerich FP. A new selective and potent inhibitor of human cytochrome P450 1B1 and its application to antimutagenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 8164-8170.
 150. Kim S, Ko H, Park JE, Jung S, Lee SK, Chun YJ. Design, synthesis, and discovery of novel trans-stilbene analogues as potent and selective human cytochrome P450 1B1 inhibitors. *J Med Chem* 2002; 45: 160-164.
 151. Chun YJ, Lee SK, Kim MY. Modulation of human cytochrome P450 1B1 expression by 2,4,3',5'-tetramethoxystilbene. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 1771-1776.
 152. Li H, Wu WK, Zheng Z, Che CT, Yu L, Li ZJ, Wu YC, Cheng KW, Yu J, Cho CH, Wang M. 2,3',4,4',5'-Pentamethoxy-trans-stilbene, a resveratrol derivative, is a potent inducer of apoptosis in colon cancer cells via targeting microtubules. *Biochem Pharmacol* 2009; 78: 1224-1232.
 153. Chomczyński P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
 154. Miedzińska-Maciejewska M, Bodnar L. Modulacje oporności wielolekowej u chorych na raka jajnika. *Współcz Onkol* 2004; 8: 457-465.
 155. http://onkoedu.pl/zeszyty/article/8024/chapter_8.html dostęp do strony: 8.10.2011
 156. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2004; 24: 2783-2840.
 157. Fulda S. Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer. *Drug Disc Tod* 2010; 15: 757-765.
 158. Wahl H, Tan L, Griffith K, Choi M, Liu JR. Curcumin enhances Apo2L/TRAIL-induced apoptosis in chemoresistant ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2007; 105: 104-112.
 159. <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-77&Template=cellBiology> dostęp do strony: 9.10.2011
 160. Yellepeddi VK, Kumar A, Maher DM, Chauhan SC, Vangara KK, Palakurthi S. Biotinylated PAMAM dendrimers for intracellular delivery of cisplatin to ovarian cancer: role of SMVT. *Anticancer Res* 2011; 31: 897-906.

161. Gryczyński M, Pietruszewska W. Wybrane aspekty apoptozy i proliferacji komórkowej raka krtani. *Otorynolaryngologia* 2002; 1: 151-160.
162. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/581> dostęp do strony: 13.10.2011
163. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/317> dostęp do strony: 13.10.2011
164. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1129-32.
165. Pezzella F, Gatter K. What is value of bcl-2 protein detection for histopathologists? *Histopathology* 1995; 26: 89-93.
166. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: A discourse on the Bcl2 family and cell death. *Blood* 1996; 88: 386-401.
167. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10017> dostęp do strony: 13.10.2011
168. Baldwin A.S.: Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kB. *J Clin Invest* 2001; 107: 241-246.
169. Sun C, Hu Y, Liu X, Wu T, Wang Y, He W, Wei W. Resveratrol downregulates the constitutional activation of nuclear factor-kappaB in multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and invasion, arrest of cell cycle, and induction of apoptosis. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 165: 9-19.
170. Holmes-McNary M, Baldwin AS Jr. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the IkappaB kinase. *Cancer Res* 2000; 60: 3477-3483.
171. Estrov Z, Shishodia S, Faderl S, Harris D, Van Q, Kantarjian HM, Talpaz M, Aggarwal BB. Resveratrol blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF- kappaB, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2003; 102: 987-995.
172. Cho SG, Choi EJ. Apoptotic Signaling Pathways: Caspases and Stress-Activated Protein Kinases. *J Biochem Mol Biol* 2002; 35: 24-27.
173. Su JL, Lin MT, Hong CC, Chang CC, Shiah SG, Wu CW, Chen ST, Chau YP, Kuo ML. Resveratrol induces FasL-related apoptosis through Cdc42 activation ofASK1/JNK-dependent signaling pathway in human leukemia HL-60 cells. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1-10.
174. Atten MJ, Godoy-Romero E, Attar BM, Milson T, Zopel M, Holian O. Resveratrol regulates cellular PKC alpha and delta to inhibit growth and induce apoptosis in gastric cancer cells. *Invest New Drug* 2005; 23: 111-119.
175. Gaur U, Aggarwal B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharm* 2003; 66: 1403-1408.
176. Grzybowska-Izydorzyc O, Smolewski P. Rola białek z rodziny inhibitora apoptozy (IAP) w chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego. *Postepy Hig Med Dosw* 2008; 62: 55-63.
177. Roos PH, Bolt HM. Cytochrome P450 interactions in human cancers: new aspects considering CYP1B1. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005; 1: 187-202.
178. Potter GA, Butler PC, Ruparella KC, Ijaz T, Wilsher NC, Wanogho E, Tan HL, Hoang TTV, Stanley LA, Burke MD DMU212: a novel CYP1B1 activated anticancer prodrug. *Br J Cancer* 2002; 86 (Suppl 1): S117.
179. Chen ZH, Hurh YJ, Na HK, Kim JH, Chun YJ, Kim DH, Kang KS, Cho MH, Surh YJ. Resveratrol inhibits TCDD-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1 and catechol estrogen-mediated oxidative DNA damage in cultured human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2005-13.

STRESZCZENIE

Nowotwory są drugą po chorobach układu krążenia przyczyną zgonów w większości krajów. Pomimo ogromnych wysiłków zmierzających do opracowania skutecznych metod leczenia, śmiertelność z powodu chorób nowotworowych nie zmniejszyła się przez ostatnie 25 lat. Dlatego też poszukiwanie związków przeciwnowotworowych nadal należy do priorytetów na polu walki z chorobami nowotworowymi. Resweratrol jest naturalnie występującą fitoaleksyną hamującą proces nowotworowy na wszystkich trzech etapach jego rozwoju. Niska biodostępność resweratrolu ogranicza jednakże możliwość jego klinicznego zastosowania. W świetle tych danych poszukiwanie nowych analogów resweratrolu wydaje się być rozsądną strategią przeciwnowotworową. Związkami o lepszych parametrach farmakokinetycznych oraz często o silniejszym działaniu przeciwnowotworowym są pochodne metylowe.

Celem niniejszej rozprawy było wykazanie właściwości przeciwnowotworowych, wybranego spośród 12 pochodnych, metylowego analogu resweratrolu w modelach eksperymentalnych *in vitro* oraz *in vivo*. Podjęto także próbę wyjaśnienia mechanizmu działania przeciwnowotworowego wybranej metylowej pochodnej resweratrolu na drodze indukcji procesu apoptozy.

Przeprowadzone badania skryningowe 12 metylowych analogów resweratrolu z wykorzystaniem testu MTT umożliwiły wyselekcjonowanie 3,4,4',5-tetrametoksystylbenu (3,4,4',5-TMS), związku o najwyższej aktywności cytotoksycznej. Do dalszych badań wybrano linię komórkową o największej wrażliwości na badany związek: linię komórkową raka jajnika A-2780 oraz linię komórkową wywodzącą się z tego samego nowotworu SKOV-3, charakteryzującą się dużo mniejszą wrażliwością na 3,4,4',5-TMS. W celu wyjaśnienia mechanizmu cytotoksycznego działania 3,4,4',5-TMS, poprzez ocenę jego zdolności do indukcji apoptozy, wykorzystano test ELISA. Posługując się cytometrią przepływową badano aktywność proliferacyjną komórek raka jajnika pod wpływem badanego związku. Zdolność 3,4,4',5-TMS do modulowania profilu ekspresji genów pro- i antyapoptotycznych, charakterystycznych dla mechanizmu wewnątrzkomórkowego lub zewnątrzkomórkowego apoptozy, analizowano za pomocą techniki PCRarray. Aktywność kaspaz wykonawczych 3 oraz 7 zbadano natomiast za pomocą testu Caspase-Glo[®] 3/7, opartego na luminescencyjnej reakcji lucyferazy. W celu określenia ekspresji mRNA oraz białek CYP1A1, CYP1B1 i AhR wykorzystano odpowiednio, technikę RT-qPCR oraz Western blotting. Zdolność 3,4,4',5-TMS do

indukcji stresu oksydacyjnego analizowano za pomocą H₂DCF-DA. Weryfikacji działania przeciwnowotworowego badanego związku dokonano z zastosowaniem modelu mysich ksenograftów SCID, którym wszczepiono najbardziej wrażliwe na działanie 3,4,4',5-TMS komórki raka jajnika A-2780. Metoda ta umożliwiła przyżyciową, nieinwazyjną ocenę rozwoju guza i kontrolowanie odpowiedzi komórek A-2780 na badany związek.

W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że wyższa aktywność cytotoksyczna badanego związku w komórkach A-2780 koreluje z silniejszym działaniem proapoptotycznym 3,4,4',5-TMS, w porównaniu do linii komórkowej SKOV-3. Obserwowano, że 3,4,4',5-TMS wpływa na aktywność proliferacyjną komórek A-2780, powodując blokowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M. W linii komórkowej A-2780, wykazano zdolność 3,4,4',5-TMS do modulowania poziomu transkryptów charakterystycznych dla mechanizmu zewnątrzkomórkowego apoptozy oraz zwiększania aktywności kaspaz wykonawczych 3 i 7. W komórkach SKOV-3 obserwowano natomiast pod wpływem badanego związku zmieniony profil ekspresji genów, których produkty białkowe kontrolują przepuszczalność błony mitochondrialnej. Jedno z założeń przeciwnowotworowego działania 3,4,4',5-TMS wpisuje się również w prowadzone obecnie intensywne poszukiwanie leków aktywowanych bezpośrednio w komórce nowotworowej. Sugeruje się bowiem, że 3,4,4',5-TMS ulega najpierw metabolicznej aktywacji przez CYP1B1, a powstające metabolity poprzez układ sprzężenia zwrotnego powodują obniżenie ekspresji CYP1B1 oraz CYP1A1, odgrywających kluczową rolę w kancerogenezie hormonozależnej. Ponadto wykazano, że zdolność badanego związku do indukcji stresu oksydacyjnego może być również wynikiem metabolicznej aktywacji 3,4,4',5-TMS na drodze hydroksylacji przez enzymy z rodziny CYP1. Pomimo wykazania w niniejszej rozprawie doktorskiej braku wpływu badanego związku na rozmiary guza w modelu mysich ksenograftów SCID, nie wyklucza się jego aktywności biologicznej *in vivo*.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki dowiodły, że cytotoksyczne działanie 3,4,4',5-TMS można wiązać z jego zdolnością do indukcji procesu apoptozy. Ponadto, wyjaśniono częściowo plejotropowe działanie przeciwnowotworowe badanego związku w układzie eksperymentalnym *in vitro* poprzez indukcję apoptozy na drodze kilku mechanizmów. Prezentowane w pracy wyniki sugerują również, że różny poziom ekspresji CYP1B1 może warunkować wrażliwość komórek na cytostatyki stosowane w terapii raka jajnika.

SUMMARY

Title:

“The anticancer effect of methylated resveratrol analogues”

Key words:

ovarian cancer, apoptosis, resveratrol, methylated resveratrol analogues, 3,4,4',5-TMS

Cancers, after cardiovascular diseases, are the second reason for deaths in most countries in the whole world. Despite many efforts aiming at working out successful treatment methods, deaths caused by cancer diseases have not been decreased for over 25 years. Therefore, searching for new anticancer agents is still the priority in the field of struggling with cancer. Resveratrol is a naturally occurring fitoalexin that inhibits the process of cancer development in all three stages. However, the low bioavailability of resveratrol limits its clinical application. Taking into account all of these data, searching for resveratrol analogues seems to be the correct strategy in anticancer therapy. The compounds that have better pharmacokinetic parameters and more potent anticancer effect are methyl analogues of resveratrol.

The aim of PhD thesis was to show anticancer properties of methyleted analogue, chosen from 12 derivatives of resveratrol, in *in vivo* and *in vitro* experimental model. Moreover, the study was also an attempt to clarify the anticancer mechanism of the chosen methyleted resveratrol analogue by the induction of apoptosis.

After screening analyses of 12 methylated resveratrol analogues by means of MTT test, the agent that has the highest cytotoxic activity, 3,4,4',5-tetramethoxystilbene (3,4,4',5-TMS) was found. Further investigations included ovarian cancer cell line A-2780 with the highest sensitivity to tested compound and cell line deriving from the cancer of the same type SKOV-3, much less sensitive to 3,4,4',5-TMS. To clarify the cytotoxic effect of 3,4,4',5-TMS through its ability to apoptosis induction, test ELISA was performed. The proliferation activity of ovarian cancer cell lines after treatment of 3,4,4',5-TMS was analyzed by means of flow cytometry. To assess the ability of 3,4,4',5-TMS to modulate the expression profile of pro- and antiapoptotic genes, outstanding for intracellular and extracellular mechanisms of apoptosis, the PCRarray method was applied. The activity of caspases 3 and 7 was analyzed by using Caspase-Glo[®] 3/7 test which is

based on the luminescence reaction of luciferase. After using RT-qPCR and Western-blotting assays, the expression of CYP1A1, CYP1B1 and AhR on the mRNA and protein level was determined. Moreover, the ability of 3,4,4',5-TMS to induce oxidative stress was analyzed by means of H₂DCF-DA. The anticancer properties of 3,4,4',5-TMS were verified in SCID mice, into which cancer cells A-2780 were injected. Tumor xenograft models in SCID mice enabled intravital and non-invasive analyses of tumor growth and development as well as an assessment of cancer cells response to therapeutic doses of tested compound.

It has been observed that increased cytotoxic activity of 3,4,4',5-TMS in A-2780 ovarian cancer cells correlates with its higher proapoptotic activity, as compared to SKOV-3 cell line. It has been found that 3,4,4',5-TMS influences proliferative activity of A-2780 cells, causing the block of cell cycle in the G2/M phase. In A-2780 cell line, the ability of 3,4,4',5-TMS to: (i) modulate the genes profile expression specific for extracellular mechanism of apoptosis, and (ii) increase the activity of caspase 3 and 7 was also noted. On the other hand, in SKOV-3 cell line changes have been observed in the expression level of genes, whose protein products regulate permeability of mitochondrial membrane. One of the assumptions of 3,4,4',5-TMS anticancer activity is becoming the part of searching for compounds that may be activated directly in the cancer cells. It has been suggested that 3,4,4',5-TMS is activated by biotransformation of CYP1B1, and synthesized metabolites decrease the expression of CYP1B1 and CYP1A1 by the feedback loop. Moreover, it has been suggested that the induction of oxidative stress by 3,4,4',5-TMS may be the result of hydroxylation by CYP1 family enzymes. Although the lack of the influence of 3,4,4',5-TMS on the tumor sizes in SCID mice has been revealed, it has not disqualified 3,4,4',5-TMS biological activity *in vivo*.

Taking into account all of these results, it may be stated that cytotoxic activity of 3,4,4',5-TMS is associated with its ability to apoptosis induction. Moreover, multidirectional anticancer effect of 3,4,4',5-TMS in *in vitro* experimental model through several molecular mechanisms has been partially explained. Results of this study also suggest that a different expression level of CYP1B1 may influence the sensitivity of cells on the chemotherapeutics used in ovarian cancer therapy.

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy **doktorskiej** p.t.:

„Działanie przeciwnowotworowe metylowych analogów resweratrolu”

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną, nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem stopnia ...**naukowego: doktor nauk farmaceutycznych**..., a złożona przeze mnie dyskietka/płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko

Data, podpis

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K.Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (www.wbc.poznan.pl).

Poznań, dnia.....

.....

(podpis)