

**Katedra i Zakład Toksykologii**  
**Wydział Farmaceutyczny**  
**Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego**



## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Ewelina Petzke**

**Ocena właściwości antyoksydacyjnych**  
**3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu w modelu kancerogenezy**  
**chemicznej u szczura**

**Promotor**

**prof. dr hab. Jadwiga Jodynis-Liebert**

Praca doktorska zrealizowana w ramach projektu badawczego nr N N405 180235 finansowanego  
przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

Poznań, 2017

**Słowa kluczowe:**

3,4,5,4'-tetrametoksystylben (DMU-212)

hepatokancerogeneza

stres oksydacyjny

### ***Podziękowanie***

*Słowa głębokiego podziękowania kieruję do Pani*  
***prof. dr hab. Jadwigi Jodynis-Liebert***  
*za wyrozumiałość, inspirację, zaangażowanie,*  
*cenne rady oraz ogromną życzliwość.*

*Dziękuję dr Małgorzacie Kujawskiej*  
***dr Hannie Piotrowskiej***  
*oraz dr Ewie Ignatowicz*  
*za pomoc w realizacji części badań*  
*oraz za stworzenie przyjaznej i naukowej*  
*atmosfery towarzyszącej powstawaniu pracy.*

*Niniejszą pracę dedykuję  
moim Najbliższym*

## SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....	9
1. WSTĘP.....	11
1.1. Reaktywne formy tlenu (RFT).....	12
1.2. Reaktywne formy azotu (RFA).....	14
1.3. Źródła reaktywnych form tlenu.....	15
1.3.1. Źródła endogenne RFT .....	15
1.3.2. Źródła egzogenne RFT .....	21
1.4. Uszkodzenia w komórce powodowane przez reaktywne formy tlenu.....	22
1.4.1. Peroksydacja lipidów .....	22
1.4.2. Oksydacyjne uszkodzenia białek.....	25
1.4.3. Oksydacyjne uszkodzenia kwasów nukleinowych.....	27
1.4.4. Uszkodzenia węglowodanów .....	28
1.5. System obrony antyoksydacyjnej organizmu przed RFT .....	29
1.5.1. Antyoksydanty enzymatyczne .....	30
1.5.1.1. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) .....	30
1.5.1.2. Katalaza (CAT).....	31
1.5.1.3. Peroksydaza glutationowa (GPx).....	33
1.5.1.4. Reduktaza glutationowa (GR).....	34
1.5.1.5. S-transferaza glutationowa (GST) .....	35
1.5.1.6. Reduktaza NAD(P)H: chinon 1 (NQO1).....	36
1.5.1.7. Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD) .....	37
1.5.2. Obrona nieenzymatyczna .....	38
1.5.2.1. Antyoksydanty hydrofilowe.....	38
1.5.2.2. Antyoksydanty hydrofobowe.....	40
1.6. Kancerogeneza chemiczna i chemoprewencja.....	42
1.7. Rola stresu oksydacyjnego w procesie nowotworowym .....	43
1.8. Resweratrol i jego pochodna 3, 4, 5, 4' – tetrametoksystylben (DMU-212).....	45
2. CEL PRACY .....	50
3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA .....	51
3.1. Przedmiot badań.....	51
3.2. Odczynniki i aparatura .....	51
3.3. Zwierzęta doświadczalne .....	52

3.4. Układ doświadczenia .....	53
3.5. Metodyka badań.....	54
3.5.1. Przygotowanie frakcji subkomórkowych: .....	54
3.5.2. Oznaczanie stężenia glutationu zredukowanego (GSH).....	54
3.5.3. Oznaczanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych we frakcji cytozolowej wątroby i nerek.....	55
3.5.3.1. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) .....	55
3.5.3.2. Oznaczanie aktywności katalazy (CAT).....	56
3.5.3.3. Oznaczanie aktywności peroksydazy glutationowej (GP <sub>x</sub> ) .....	57
3.5.3.4. Oznaczanie aktywności reduktazy glutationowej (GR).....	58
3.5.3.5. Oznaczanie aktywności S-transferazy glutationowej (GST) .....	59
3.5.3.6. Oznaczanie aktywności oksydoreduktazy NADP(H):chinon (NQO1) .....	59
3.5.3.7. Oznaczanie aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PD).....	61
3.5.4. Oznaczanie markerów uszkodzeń oksydacyjnych .....	61
3.5.4.1. Oznaczanie poziomu peroksydacji lipidów (LPO).....	61
3.5.4.2. Oznaczanie stężenia grup karbonylowych w wątrobie.....	63
3.5.4.3. Badanie uszkodzeń DNA metodą elektroforezy kometowej (Commet Assay, SCGE) .....	63
3.5.5. Określanie ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne w wątrobie .....	66
3.5.5.1. Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja .....	66
3.5.5.2. Amplifikacja cDNA za pomocą metody RT-qPCR (ang. Real-time quantitative PCR).....	68
3.5.6. Parametry chemii klinicznej .....	71
3.5.6.1. Oznaczanie aktywności aminotransferaz - ALT i AST .....	71
3.5.6.2. Oznaczanie aktywności $\gamma$ -glutamylotransferazy (GGT).....	72
3.5.6.3. Oznaczanie aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) ...	73
3.5.6.4. Oznaczanie aktywności dehydrogenazy sorbitolowej (SDH).....	74
3.5.6.5. Oznaczanie stężenia kreatyniny .....	75
3.5.7. Badania immunohistochemiczne .....	76
3.5.8. Oznaczanie białka całkowitego .....	76
3.5.9. Analiza statystyczna wyników .....	77

4. WYNIKI BADAŃ .....	78
4.1. Wpływ 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-212) na parametry obrony antyoksydacyjnej w wątrobie szczurów narażonych na NDEA/PB .....	79
4.1.1. Zredukowany glutation (GSH) .....	79
4.1.2. Poziom peroksydacji lipidów (LPO) nieindukowanej.....	80
4.1.3. Poziom peroksydacji lipidów (LPO) indukowanej nieenzymatycznie.....	81
4.1.4. Stężenie grup karbonylowych w białkach .....	82
4.1.5. Poziom uszkodzenia DNA (test kometowy) .....	83
4.1.6. Dismutaza ponadtlenkowa (SOD) .....	84
4.1.7. Katalaza (CAT).....	85
4.1.8. Peroksydaza glutationowa (GPx) .....	86
4.1.9. Reduktaza glutationowa (GR) .....	87
4.1.10. S-transferaza glutationowa (GST).....	88
4.1.11. Oksydoreduktaza NADP(H):chinon (NQO1) .....	89
4.1.12. Dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa (G6PD) .....	90
4.2. Wpływ 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-212) na ekspresję genów kodujących enzymy antyoksydacyjne w wątrobie szczurów narażonych na NDEA/PB.....	91
4.2.1. Sod-2.....	91
4.2.2. Cat.....	92
4.2.3. Gpx-1 .....	93
4.2.4. Gr .....	94
4.2.5. Gst.....	95
4.2.6. Nqo1 .....	96
4.2.7. G6pd .....	97
4.3. Wpływ 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-212) na wybrane parametry funkcji wątroby i nerek u szczurów narażonych na NDEA/PB.....	98
4.4. Wpływ 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-212) na ekspresję wybranych białek w wątrobie szczurów narażonych na NDEA/PB - badania immunohistochemiczne .....	99
4.5. Wpływ 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-212) na parametry obrony antyoksydacyjnej w nerkach szczurów narażonych na NDEA/PB.....	104
4.5.1. Glutation zredukowany (GSH).....	104
4.5.2. Poziom peroksydacji lipidów (LPO) nieindukowanej.....	105
4.5.3. Poziom peroksydacji lipidów (LPO) indukowanej nieenzymatycznie...	106

4.5.4. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) .....	107
4.5.5. Katalaza (CAT).....	108
4.5.6. Peroksydaza glutationowa (GPx) .....	109
4.5.7. Reduktaza glutationowa (GR) .....	110
4.5.8. S-transferaza glutationowa (GST) .....	111
4.5.9. Oksydoreduktaza NADP(H):chinon (NQO1) .....	112
4.5.10. Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD) .....	113
4.6. Przyrost masy ciała zwierząt i masy wybranych narządów .....	114
5. DYSKUSJA .....	117
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI .....	137
STRESZCZENIE.....	139
SUMMARY .....	142
LITERATURA .....	145
SPIS TABEL.....	167
SPIS RYCIN .....	169



## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

**4-HHE** – 4-hydroksyheksenal

**4-HNE** – 4-hydroksynonenal

**AGEs** – końcowe produkty zaawansowanej glikacji (ang. *advanced glycation end-products*)

**ALEs** – końcowe produkty zaawansowanej lipoksydacji (ang. *advanced lipoxidation end-products*)

**ALT** – aminotransferaza alaninowa

**AP-1** – czynnik transkrypcyjny (ang. *activating protein 1*)

**ARE** – region odpowiedzi antyoksydacyjnej (ang. *antioxidant response element*)

**AST** – aminotransferaza asparaginianowa

**GGT** –  $\gamma$ -glutamylotransferaza

**ATP** – adenozyno-5'-trifosforan

**CAT** – katalaza, (ang. *catalase*)

**COX** – cyklooksygenaza (ang. *cyclooxygenase*)

**DMU-212** - 3, 4, 5, 4' – tetrametoksystylben

**FAD** – dinukleotyd flawinoadeninowy (ang. *flavin adenine dinucleotide*)

**FADH<sub>2</sub>** – zredukowana forma dinukleotydu flawinoadeninowego

**G6PD** – dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (ang. *glucose-6-phosphate dehydrogenase*)

**GPx** – peroksydaza glutationowa (ang. *glutathione peroxidase*)

**GR** – reduktaza glutationowa (ang. *glutathione reductase*)

**GSH** – glutationu zredukowany,  $\gamma$  – glutamylcysteinyloglicyna

**GSSG** – glutation utleniony

**GST** – S-transferaza glutationowa (ang. *glutathione S-transferase*)

**HCC** – rak wątrobowo-komórkowy (ang. *hepatocellular carcinoma*)

**Keap1** – białko wiążące czynnik Nrf2 w cytoplazmie (ang. *Kelch-like ECH-associated protein 1*)

**LDH** – dehydrogenaza mleczanowa;

**LH** – wielonienasycony kwas tłuszczowy

**LOOH** – nadtlutki (wodoronadtlenki) kwasów tłuszczowych

**LOX** – lipooksygenaza  
**LPS** – lipopolisacharyd  
**MDA** – dialdehyd malonowy  
**mRNA** – matrycowy kwas rybonukleinowy  
**NAD<sup>+</sup>** – utleniona forma dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego  
**NADH** – zredukowana forma dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*)  
**NADP<sup>+</sup>** – utleniona forma fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego  
**NADPH** – zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)  
**NDEA** – N-nitrozodietylamina  
**NFκB** – jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)  
**NO** – tlenek azotu  
**NOS** – syntaza tlenku azotu (ang. *nitric oxide syntase*)  
**NQO1** – oksydoreduktaza NAD(P)H:chinon1 (ang. *oxidoreductase NAD(P)H:quinone1*)  
**Nrf2** – jądrowy czynnik transkrypcyjny Nrf2 (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)  
**PB** – fenobarbital  
**RFA** – reaktywne formy azotu  
**RFT** – reaktywne formy tlenu  
**ROOH** – nadtlenki (wodoronadtlenki) lipidowe  
**SD** – odchylenie standardowe  
**SDH** – dehydrogenaza sorbitolowa  
**SH** – grupy tiolowe białka  
**SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*)  
**SOD1** – CuZnSOD dysmutaza ponadtlenkowa miedziowo – cynkowa  
**SOD2** – MnSOD - dysmutaza ponadtlenkowa manganowa  
**TBARS** – substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym (ang. *thiobarbituric acid reactive substances*)  
**TNF-α** – czynnik martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor*), cytokina biorąca udział w odpowiedzi zapalnej i immunologicznej

## 1. WSTĘP

Choroby nowotworowe stanowią poważny problem współczesnego społeczeństwa. Wzrost zachorowalności i śmiertelności z powodu nowotworów uzasadnia dalsze poszukiwania nowych skutecznych środków zapobiegawczych o wielokierunkowym działaniu przeciwnowotworowym, niewykazujących równocześnie działania toksycznego w stosunku do zdrowych komórek organizmu [1].

Pochodne stylbenu od wielu lat znajdują się w centrum zainteresowania wielu grup badawczych, których prace dostarczają systematycznie nowych danych na temat aktywności biologicznej tych związków. Wykazano, że resweratrol (3,4',5-trans-trihydroksystylben) charakteryzuje się silnym działaniem antyoksydacyjnym i przeciwzapalnym, które odgrywa ważną rolę w ochronie przed kancerogenezą. Jednak jego skuteczność w żywym organizmie jest ograniczona ze względu na niską biodostępność związaną m.in. z intensywną biotransformacją. Skłoniło to badaczy do poszukiwania pochodnych resweratrolu wykazujących wyższą aktywność biologiczną oraz korzystniejsze parametry farmakokinetyczne [2,3]. Jednym z takich analogów o obiecujących właściwościach jest przedmiot niniejszych badań 3,4,5,4'-tetrametoksytylben, określany jako DMU-212.

Doniesienia wielu autorów dowodzą, że DMU-212 jest związkiem o potencjalnym, wielokierunkowym działaniu przeciwnowotworowym [2–5], którego mechanizm polega m. in. na obniżeniu ekspresji enzymów katalizujących aktywację kancerogenów, zatrzymaniu cyklu komórkowego oraz indukcji apoptozy [2,6]. Jednak dane o aktywności przeciwnowotworowej DMU-212 pochodzą głównie z badań *in vitro* i nielicznych eksperymentów z wykorzystaniem modeli zwierzęcych [3,7].

Jednym z czynników sprzyjających powstaniu procesu nowotworowego jest stres oksydacyjny. Reaktywne formy tlenu (RFT) wywołują zmiany w strukturze makrocząsteczek komórkowych prowadzące do zakłócenia stabilności chromosomów i mutacji, a w konsekwencji do nieprawidłowego wzrostu komórek [8]. Można więc założyć, że związki o właściwościach antyoksydacyjnych będą wykazywały działanie zapobiegające procesowi nowotworowemu. Znalazło to potwierdzenie w wielu badaniach, w których wykazano, że liczne związki pochodzenia naturalnego, np. resweratrol, indukują wiele cytoprotekcyjnych enzymów: antyoksydacyjnych,

II fazy biotransformacji, katalizujących produkcję NADPH oraz naprawę DNA [9,10]. Indukcja genów kodujących te enzymy jest regulowana przez fragment DNA określany jako element odpowiedzi antyoksydacyjnej (*ARE, antioxidant response element*). W procesie aktywacji genów zależnych od ARE biorą udział dwa białka: czynnik transkrypcyjny Nrf2 (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) oraz Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*). W warunkach fizjologicznych białka te tworzą w cytozolu kompleks, który ulega rozkładowi pod wpływem induktorów. Uwolniony Nrf2 przemieszcza się do jądra, gdzie łączy się z ARE inicjując transkrypcję cytoprotekcyjnych genów [11,12]. Występujący w cytoplazmie kompleks Nrf2 – Keap1 spełnia funkcję sensora potencjału oksydoredukcyjnego [13,14] odgrywającego zasadniczą rolę w zmniejszaniu poziomu reaktywnych form tlenu zdolnych do uszkodzenia DNA [15].

W celu określenia, czy potencjalne właściwości chemoprewencyjne i przeciwnowotworowe DMU-212 wiążą się z jego aktywnością antyoksydacyjną zbadano wybrane parametry obrony antyoksydacyjnej w wątrobie i nerkach szczurów w warunkach narażenia na modelowy kancerogen N-nitrozodietylaminę (NDEA). Związek ten wykazuje właściwości pro-oksydacyjne związane z wytwarzaniem reaktywnych form tlenu w procesie biotransformacji [16]. Przeprowadzono też analizę ekspresji mRNA wybranych enzymów antyoksydacyjnych oraz oznaczono metodą immunohistochemiczną ekspresję kilku białek, wczesnych markerów procesu nowotworowego w wątrobie.

### **1.1. Reaktywne formy tlenu (RFT)**

Reaktywne formy tlenu definiowane są jako produkty niecałkowitej redukcji cząsteczki tlenu – zarówno neutralne cząsteczki lub jony, jak i wolne rodniki tlenowe (tabela 1.1). Rodnikiem określa się grupę atomów, które zachowują się jak jedna jednostka, z kolei termin wolny rodnik oznacza atom lub cząsteczkę mogące samodzielnie istnieć i posiadające jeden lub więcej niesparowanych elektronów [17]. Oksydanty (utleniacze) to substancje przyjmujące elektrony oraz ulegające redukcji – do tej grupy zalicza się m.in. tlen, nadtlenek wodoru, kwas podchlorawy (HOCl), kwas podbromawy (HOBr) [18], przy czym nie wszystkie oksydanty są wolnymi rodnikami [19].

Tabela 1.1. Przykłady reaktywnych form tlenu i azotu [20–22]

Reaktywne formy tlenu (RFT)	Reaktywne formy azotu (RFA)
tlen singletowy $^1\text{O}_2$	tlenek azotu $\cdot\text{NO}$
anionorodnik ponadtlenkowy $\text{O}_2^{\cdot-}$	anion nitrozytowy $\text{NO}^-$
rodnik hydroksylowy $\text{HO}\cdot$	kation nitrozytowy $\text{NO}^+$
nadtlenek wodoru $\text{H}_2\text{O}_2$	dwutlenek azotu $\cdot\text{NO}_2$
rodnik alkoksyłowy $\text{RO}\cdot$	kation nitryłowy $\text{NO}_2^+$
rodnik nadtlenkowy $\text{RO}_2\cdot$	nadtlenoazotyn $\text{ONOO}^-$

Tlen cząsteczkowy, w stanie podstawowym, to stabilny trypletowy dwurodnik  $^3\text{O}_2$ . Ulega on reakcjom rodnikowym z wytworzeniem jedno-, dwu- i trójelektronowych produktów redukcji – reaktywnych form tlenu. Zalicza się do nich między innymi anionorodnik ponadtlenkowy  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , rodnik wodoronadtlenkowy  $\text{HO}_2\cdot$ , rodnik hydroksylowy  $\text{OH}\cdot$ , nadtlenek wodoru  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tlen singletowy  $^1\text{O}_2$  oraz ozon  $\text{O}_3$ . Wolne rodniki tlenowe mogą reagować z innymi substancjami obecnymi w komórkach, co prowadzi do powstania wolnych rodników innych substancji (np. rodnik alkilowy  $\text{R}\cdot$ , rodnik alkoksyłowy  $\text{RO}\cdot$  czy rodnik nadtlenkowy  $\text{ROO}\cdot$ ) [23]. Reaktywne formy tlenu wchodzi także w reakcje z cząsteczkami organicznymi, dając wolne rodniki organiczne [17]. Do RFT zalicza się poza tym także inne cząsteczki, mogące pośredniczyć w toksycznym oddziaływaniu tlenu, choćby tlenek azotu, ditlenek azotu oraz kwasy – nadtlenoazotawy, podchlorawy czy podtociocyanawy oraz kompleksy tlenu z żelazem – kationorodniki, czyli rodnik ferrytowy ( $\text{Fe} = \text{O}^{2+}$ ) i rodnik nadferryłowy ( $\text{Fe} = \text{O}^{3+}$ ) [23].

Reaktywne formy tlenu są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu, pełnią rolę przekaźników sygnału, regulują procesy naprawcze w komórkach i ekspresję genów, biorą udział w procesach metabolizmu, reakcjach redoks w łańcuchu oddechowym, odtwarzaniu związków wysokoenergetycznych (ATP), transporcie tlenu przez hemoglobinę, aktywują cytochrom P450 i fagocytozę drobnoustrojów [24], ale mogą też wywierać działanie szkodliwe [25]. Nadmiar RFT powoduje stan stresu oksydacyjnego prowadzącego do uszkodzenia składników komórki i zaburzenia jej funkcji, m.in. utlenianie związków niskocząsteczkowych (glutation, askorbinian), degradację kolagenu, depolimeryzację kwasu hialuronowego, utlenianie hemoglobiny, inaktywację enzymów i białek transportowych, uszkodzenia DNA, uszkodzenia chromosomów, peroksydację lipidów błon komórkowych, rozpad erytrocytów, zaburzenia wewnątrzkomórkowej homeostazy jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , modyfikację

właściwości antygenowych komórek, agregację płytek krwi, zmiany morfologii komórek, powstawanie mutacji i transformację nowotworową komórek [23].

## 1.2. Reaktywne formy azotu (RFA)

Obok RFT, związkami rodnikowymi cechującymi się dużą reaktywnością chemiczną są reaktywne formy azotu – RFA. Do tej grupy zalicza się tlenek azotu (II) ( $\text{NO}^\bullet$ ) oraz jego pochodne: kation nitrozoniowy ( $\text{NO}^+$ ), anion nitroksylowy ( $\text{NO}^-$ ) oraz nadtlendioazotyn ( $\text{ONOO}^-$ ). Tlenek azotu i RFA syntetyzowane są w reakcjach przy udziale oksydazy NADPH oraz izoform syntazy NO (NOS, ang. *nitric oxide synthase*) [26,27].

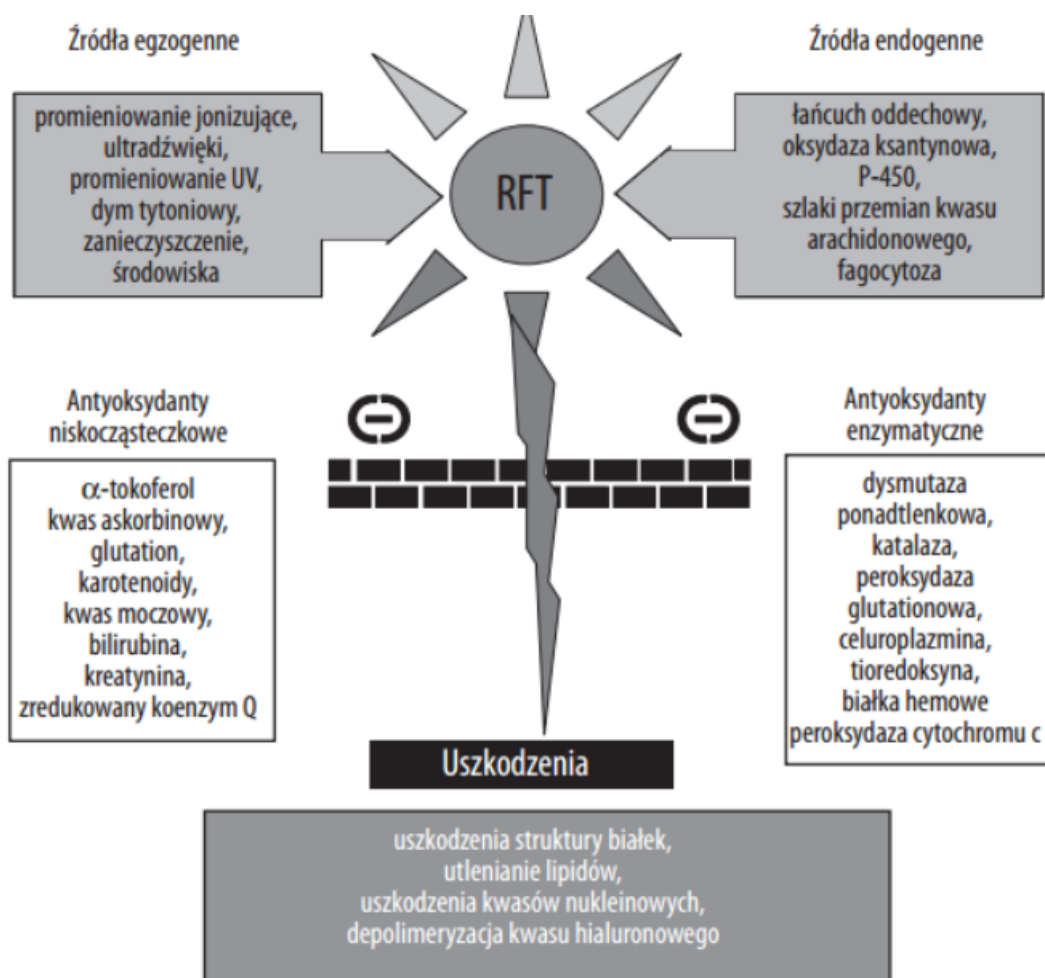
Zbyt wysoka ekspresja syntazy NOS może mieć negatywny wpływ na organizm, co ma miejsce w momencie wystąpienia wstrząsu septycznego. Nadmiar tlenku azotu w komórkach prowadzi do bardzo wysokiej aktywacji cyklooksygenazy (COX) – enzymu odpowiedzialnego za powstawanie dużych ilości prostaglandyn (związki prozapalne) i RFT [28]. Przewlekłe narażenie komórek na wysokie stężenie tlenku azotu wywiera działanie genotoksyczne [29,30].

Nadmiar tlenku azotu może prowadzić do bezpośredniej nitrozytacji grup tiolowych ( $-\text{SH}$ ) białek, hemu oraz kationów żelaza niehemowego i reszt tyrozylowych w białkach.  $\text{NO}^\bullet$  może również pełnić rolę prekursora w procesie tworzenia kancerogennych nitrozoamin, a poprzez N – nitrozylację pierwszorzędowych aryloamin nukleotydów działa mutagennie [34].  $\text{NO}^\bullet$  może także reagować z  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ; w wyniku tej reakcji powstaje nadtlendioazotyn (nadtlendioazotan(III)), który wykazuje silne właściwości utleniające i może wchodzić w reakcje z grupami tiolowymi białek [23].



Z drugiej strony, NO spełnia rolę neuromodulatora i neurotransmitera w układzie nerwowym, reguluje ciśnienie tętnicze krwi i wpływa na zahamowanie agregacji płytek krwi [35]. Wykazano również, że ekspresja iNOS w komórkach wątroby hamuje toksyczne efekty działania endotoksyn [26,31–33].

### 1.3. Źródła reaktywnych form tlenu



Ryc. 1.1. Źródła RFT i naturalne systemy antyoksydacyjne organizmu [18]

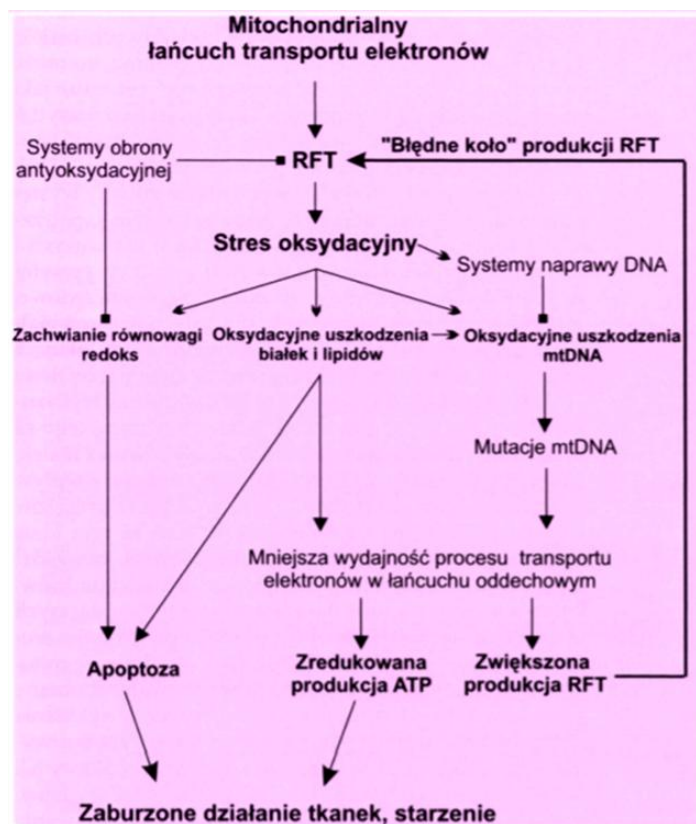
#### 1.3.1. Źródła endogenne RFT

RFT są produktami ubocznymi fosforylacji oksydacyjnej zachodzącej w mitochondrium. W procesie tym następuje przemiana energii chemicznej (zlokalizowanej w zredukowanych koenzymach powstających podczas glikolizy oraz w cyklu kwasu cytrynowego) do łatwo dostępnej w procesach komórkowych postaci czyli ATP. Przekształcenie to zachodzi przy udziale systemu transportu elektronów, który nazywa się łańcuchem oddechowym – mieści się on w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i składa z czterech kompleksów lipoproteinowych (oznaczonych kolejno I, II, III i IV). Na poziomie kompleksu IV, czyli oksydazy cytochromowej, zachodzi czteroelektronowa redukcja tlenu cząsteczkowego do wody. Kompleksy łańcucha oddechowego prowadzą głównie reakcje „dwuelektronowe”, czyli przenoszą parzystą liczbę atomów wodoru bądź elektronów na tlen (substrat kompleksu). Około

2-5% elektronów, które są w ten sposób przenoszone przez kompleksy mogą opuścić łańcuch oddechowy, a wówczas mogą wejść w jednoelektronowe nieenzymatyczne reakcje z tlenem, czego konsekwencją jest utworzenie reaktywnych form tlenu. Proces ten składa się z następujących etapów:

- przyłączenie pierwszego elektronu do cząsteczki tlenu – powstaje anionorodnik nadadtlenkowy  $O_2^{\cdot-}$ ,
- przyłączenie drugiego elektronu - powstaje nadtlenek wodoru  $H_2O_2$ ,
- przyłączenie trzeciego elektronu – powstaje rodnik hydroksylowy  $OH^{\cdot}$ ,
- przyłączenie czwartego elektronu – powstaje cząsteczka wody  $H_2O$  [36].

Powstające wolne rodniki uszkadzają mitochondrium, następuje ograniczenie transportu elektronów, co stymuluje tworzenie się RFT – powstaje tak zwane „błędne koło” (ryc. 1.2). W miarę upływu czasu narastające uszkodzenia mitochondrium obniżają produkcję ATP przy równoczesnym wzroście tworzenia RFT, co ma destruktywny wpływ na funkcje komórek. Miejsca tworzenia reaktywnych form tlenu w mitochondrium nie są dokładnie określone, niemniej utrzymuje się, że są one zlokalizowane w obszarze elektronowego łańcucha transportującego elektrony [37].



Ryc. 1.2. Schemat obrazujący zależność pomiędzy funkcjonowaniem mitochondriów a uwalnianiem reaktywnych form tlenu [38]



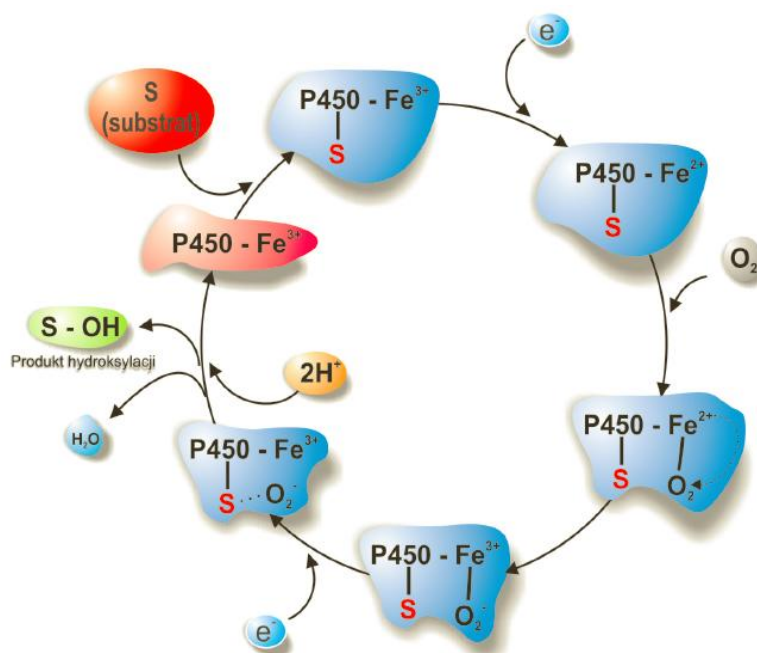
Do wzmożonej produkcji RFT w mitochondriach dochodzi również na skutek hipoksji (niedotlenienie komórki), co stanowi „paradoks tlenowy”. Niedobór tlenu w tkankach może powodować sprzężenie zwrotne spowalniając tempo przepływu elektronów przez łańcuch oddechowy, co przyczynia się do zwiększonej produkcji anionorodnika ponadtlenkowego. Ponadto, w warunkach hipoksji wzrasta aktywność mtNOS (mitochondrialna syntaza tlenu azotu), która prowadzi do zwiększenia stężenia  $\text{NO}^{\bullet}$ , hamującego z kolei aktywność oksydazy cytochromowej, co prowadzi do częściowego wzrostu ciśnienia tlenu w środowisku mitochondrialnym i ostatecznie zwiększonej produkcji  $\text{O}_2^{\bullet-}$  [39].

### PEROKSYSOMY

Źródłem RFT w komórce są także peroksysomy, w których zawarte są enzymy – oksydazy generujące głównie  $\text{H}_2\text{O}_2$ , który rozkładany jest przez katalazę. Organella te są również źródłem anionorodnika ponadtlenkowego, wytwarzanego przez oksydazę ksantynową (XO) oraz łańcuch transportujący elektrony zlokalizowany w błonach peroksysomów, złożony z reduktazy NADH oraz cytochromu  $\text{b}_5$  [39].

### SIATECZKA ŚRÓDPLAZMATYCZNA

Źródłem RFT jest zlokalizowany w siateczce śródplazmatycznej mikrosomalny łańcuch transportu elektronów, w którym zachodzą reakcje utleniania ksenobiotyków katalizowane przez cytochrom P450 (ryc. 1.3).



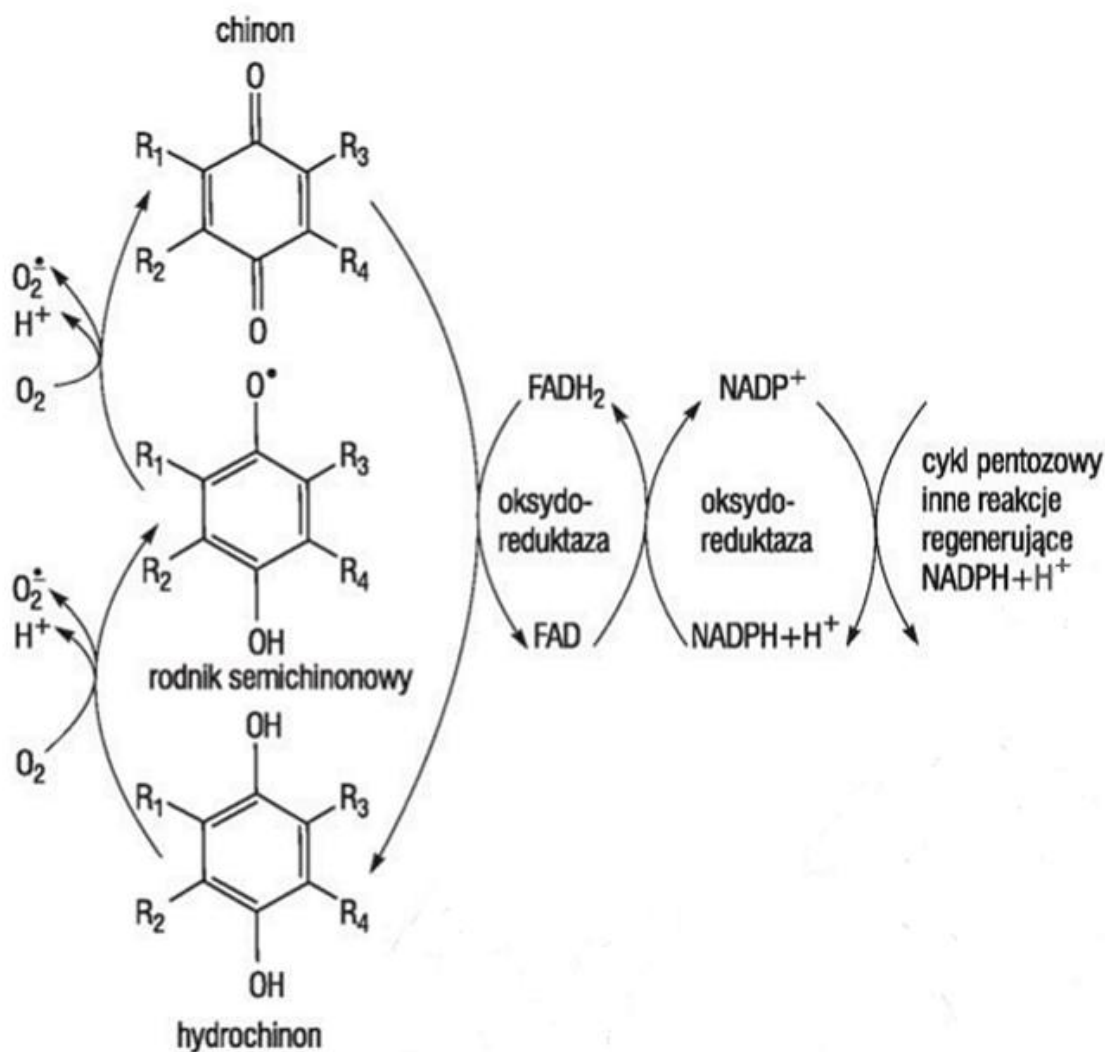
Ryc. 1.3. Schemat działania cytochromu P450 w reakcji hydroksylacji [40]

Cytochrom P450 jest końcowym składnikiem w łańcuchu transportu elektronów, wymagającym dodatkowego układu będącego donorem elektronów, którym jest najczęściej flawoproteina, tzw. CPR – reduktaza NADPH: cytochrom P450. W początkowym etapie cyklu, monooksygenazy wiążą swój substrat, a następnie w wyniku dwukrotnego przyłączenia elektronu, ulegają dwóm jednoelektronowym reakcjom redukcji. Pierwsza z nich zachodzi przed, a druga po związaniu tlenu do hemu. Efektem zachodzących procesów jest redukcja cząsteczki tlenu, który uzyskuje stopień utlenienia –II, natomiast atom żelaza +III. Następnie jeden atom z cząsteczki związanego tlenu ulega redukcji tworząc wodę. Z substratu RH zostaje usunięty atom wodoru i tworzy się przejściowy wolny rodnik, który przyłącza pozostały atom związanego tlenu. W ten sposób powstaje produkt reakcji ROH zawierający grupę hydroksylową [40,41]. Rozkojarzenie tej reakcji powoduje, że część tlenu cząsteczkowego nie jest włączona do cząsteczki substratu ale zostaje zredukowana do anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru [40].

Większość procesów utleniania i redukcji ksenobiotyków odbywa się przy udziale pary elektronów prowadząc do powstania trwałych metabolitów. Niektóre ksenobiotyki ulegają przemianie w reakcjach jednoelektronowych, w wyniku których powstają toksyczne wolne rodniki. Przykłady takich reakcji to redukcja tetrachloru węgla do rodnika trichlorometylowego, redukcja parakwatu z wytworzeniem anionorodnika ponadtlenkowego, redukcja chinonów do aktywnego rodnika semichinonowego, utlenianie związków tiolowych [23].

Mechanizm toksyczności wielu substancji, np. fungicydów, herbicydów, insektycydów, leków przeciwnowotworowych wiąże się z generowaniem RFT [23]. Najlepiej udokumentowaną używką prowadzącą do powstania stresu oksydacyjnego jest dym tytoniowy, zawierający prooksydanty, m.in. hydrochinony, które w cyklu redoks mogą spełniać rolę donorów elektronów w jedno- lub dwuelektronowej reakcji redukcji O<sub>2</sub>. Wśród RFT obecnych w filtrach papierosowych dominują rodniki semichinonowe [42].

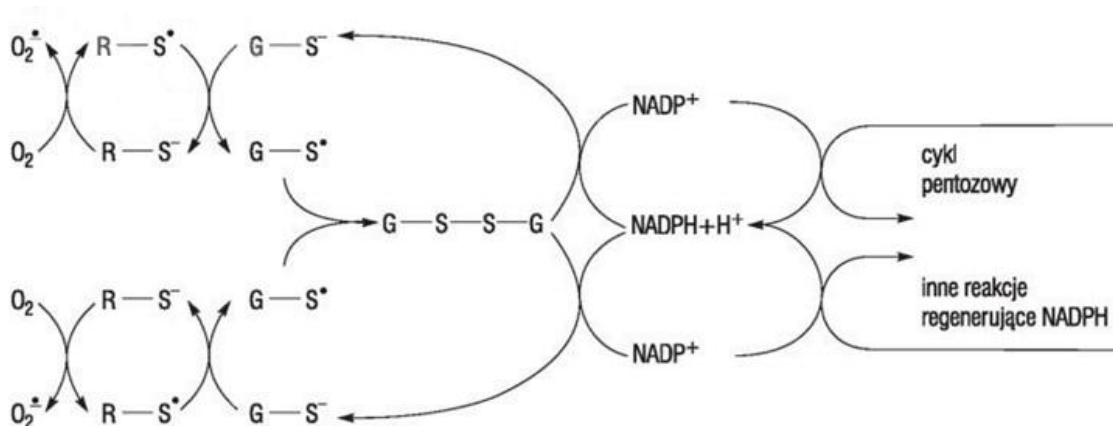
Przykładem ksenobiotyków, które wytwarzają RFT wewnątrz komórki są m.in. związki chinonowe i tiolowe (ryc. 1.4 i ryc. 1.5) [23].



Ryc. 1.4. Cykl redoks związków chinonowych [23]

(FAD – dinukleotyd flawinoadeninowy; FADH<sub>2</sub> – zredukowana forma tego dinukleotydu; NADP<sup>+</sup> – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego; NADPH+H<sup>+</sup> – zredukowana forma tego dinukleotydu).

Reakcje redukcji utlenionych grup tiolowych (-SH) ksenobiotyków zachodzą z udziałem enzymów, dla których substratami są glutation czy askorbinian, a ich spontaniczne utlenienie katalizuje anionorodnik ponadtlenkowy. Produktami utleniania grup -SH są wówczas rodniki tiolowe -S<sup>•</sup>, które ulegają dimeryzacji do disulfidów [23].



Ryc. 1.5. Cykl redoks związków tiolowych [23]

( $R-S^{\bullet}$  - rodnik tiolowy ksenobiotyku;  $G-S^{\bullet}$  - rodnik tiolowy glutationu; GSSG – disulfid glutationu)

### WYBUCH TLENOWY

Pobudzone neutrofile (granulocyty obojętnochłonne) to jedno z głównych źródeł RFT w organizmie. Komórki te, w momencie powstania stanu zapalnego, pojawiają się w zakażonym miejscu jako pierwsze, a ich zadaniem jest wspomaganie naturalnej odporności. Celem neutrofilów jest eliminacja lub unieszkodliwienie bakterii, niektórych wirusów oraz grzybów, ale w procesie fagocytozy odznaczają się wzmożonym wzrostem zużycia tlenu (nawet kilkudziesięciokrotnym). Zjawisko to stanowi bodziec do powstawania i uwalniania na zewnątrz komórki ogromnych ilości anionorodnika nadadtlenkowego – związku nietrwałego, który w wyniku kolejnych przemian przekształca się w bardziej toksyczne formy tlenu. Należą do nich rodniki wodoronadtlenkowe czy nadtlenek wodoru [43,44].  $H_2O_2$  jest związkiem będącym źródłem reaktywnych form tlenu uwalnianych w reakcji Fentona:



W obecności jonów metali przejściowych, jak miedź i żelazo, nadtlenek wodoru rozkłada się z wydzieleniem rodnika hydroksylowego - jednej z najbardziej reaktywnych form w układach biologicznych. Utleniony w trakcie tej reakcji jon metalu przejściowego staje się katalizatorem i może zostać zredukowany. Ponadto rodnik hydroksylowy może też powstawać w wyniku reakcji Habera-Weissa, w której jednym z substratów również jest nadtlenek wodoru [45].



## LIPOPOLISACHARYD

Wolne rodniki powstają też w komórce gospodarza po uwolnieniu ze ściany komórki bakteryjnej lipopolisacharydu (LPS). Cząsteczka ta o charakterze heteropolimeru tworzy ze specyficznymi białkami kompleks, który aktywuje syntezę i uwalnianie mediatorów stanu zapalnego, m.in. czynnika martwicy nowotworu, interleukin i prostaglandyn, a także tlenku azotu oraz wolnych rodników tlenowych [46]. W efekcie dochodzi do zmian fizjologicznych i morfologicznych w tkankach – miejscowych i ogólnych, co prowadzi do zaburzeń homeostazy oraz do szoku septycznego [47].

## UTLENIANIE ZREDUKOWANYCH FORM NISKOCZĄSTECzkOWYCH SKŁADNIKÓW KOMÓREK

Utlenianie zredukowanych form niskocząsteczkowych składników komórek ( $RH_2$ ) prowadzi do powstawania anionorodnika ponadtlenkowego. Należą do nich między innymi ryboflawina, cukry o właściwościach redukujących (jak glukoza) czy związki tiolowe (jak cysteina czy glutation). Mechanizm ten dotyczy zarówno inicjacji, jak i propagacji reakcji wolnorodnikowych [23].

### 1.3.2. Źródła egzogenne RFT

Absorpcja ultrafioletu przez cząsteczkę prowadzi do jej wzbudzenia, jonizacji bądź rozpadu, przy czym w rezultacie procesu jonizacji powstają wolne rodniki. Promieniowanie ultrafioletowe (podobnie jak wysoka temperatura i wyładowania atmosferyczne) stanowi przyczynę rozpadu cząsteczki tlenu na wolne atomy, które w reakcji z innymi cząsteczkami tlenu tworzą ozon [48].

Promieniowanie jonizujące może prowadzić również do radiolizy – rozpadu cząsteczki wody. Proces ten zachodzi w kilku etapach – na początku dochodzi do jonizacji cząsteczki, następnie wzbudzenia i rozpadu na atomy wodoru oraz rodniki hydroksylowe [48].

Innym źródłem RFT jest sonikacja – proces oddziaływania ultradźwięków na roztwory wodne. W zależności od zastosowanej mocy ultradźwięków uzyskuje się odmienną ilość reaktywnych form tlenu. Pierwotnymi produktami sonolizy wody są atomy wodoru oraz rodniki  $\bullet OH$ , natomiast w wyniku rekombinacji rodników hydroksylowych powstaje nadtlenek wodoru [49].

## 1.4. Uszkodzenia w komórce powodowane przez reaktywne formy tlenu

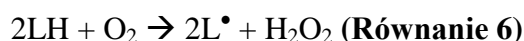
Wpływ reaktywnych form tlenu na komórki zależy w dużym stopniu od ich stężenia i czasu ekspozycji. Niskie stężenie RFT spełnia funkcje fizjologiczne, natomiast wyższe prowadzi do uszkodzeń komórek i rozwoju wielu chorób [31,50]. W następstwie oksydacyjnych modyfikacji lipidów, białek i DNA dochodzi do zaburzeń homeostazy i śmierci komórek w wyniku apoptozy lub nekrozy [51].

### 1.4.1. Peroksydacja lipidów

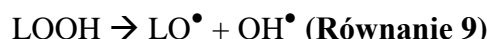
#### NIEENZYMATYCZNA

Peroksydacja lipidów jest wolnorodnikowym procesem utleniania reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, wchodzących w skład fosfolipidów, którego produktami są ich nadtlenki. Trzyetapowy mechanizm działania tego procesu obejmuje:

- inicjację:



- propagację (prolongację):



- terminację:

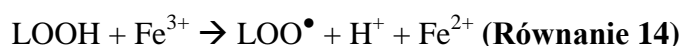


W procesie inicjacji następuje przekształcenie cząsteczki kwasu w wolny rodnik alkilowy  $\text{L}^\bullet$  pod wpływem działania rodnika hydroksylowego, nadtlenkowego, alkoksylowego lub alkilowego. Ponadto do inicjatorów peroksydacji lipidów zalicza się także ozon, tlenek azotu, ditlenek azotu, tlenek siarki (IV), kationorodniki (ferrylowy lub nadferrylowy) oraz kompleks  $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2\text{-Fe}^{3+}$ .

Na etapie propagacji wolne rodniki alkilowe  $\text{L}^\bullet$  reagują z tlenem, tworząc wolne rodniki nadtlenkowe  $\text{LOO}^\bullet$ , zdolne do odrywania atomów wodoru od kolejnych cząsteczek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych LH. Cykl reakcji może powtarzać się wielokrotnie do momentu zużycia wszystkich substratów, dopóki nie

dojdzie do terminacji i może doprowadzić do przekształcenia się w nadtlenek nawet kilkuset cząsteczek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, zależnie od częstości reakcji terminacji. Terminacja jest reakcją pomiędzy wolnymi rodnikami prowadzącą do powstania produktu, który nie jest wolnym rodnikiem. Produktami terminacji są dimery kwasów tłuszczowych oraz keto- lub hydroksykwasy tłuszczowe, a więc zmodyfikowane, uszkodzone cząsteczki lipidów. W komórce peroksydacja zachodzi w błonach zawierających białka, które w reakcji z wolnymi rodnikami tworzą wolne rodniki białek, które mogą uczestniczyć w reakcjach terminacji, tworząc mieszane połączenia białkowo-lipidowe [52].

Istnieje możliwość wystąpienia procesu reinicjacji, co jest prawdopodobne w przypadku, gdy nierodnikowe produkty peroksydacji (nadtlenki lipidów) ulegną rozkładowi z ponownym wytworzeniem wolnych rodników (alkoksylowych). Rozpad ten inicjują zazwyczaj jony metali przejściowych – żelaza bądź miedzi [23]:

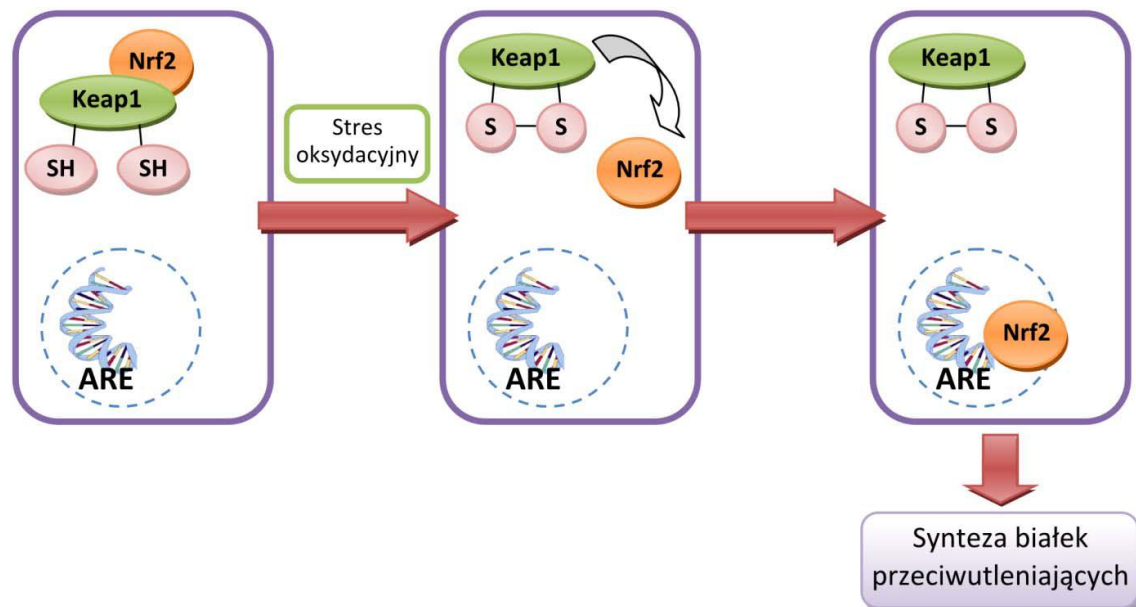


Proces reinicjacji mogą spowodować również: hemoglobina i cytochromy, z których przy udziale mikrosomalnej oksydazy hemowej uwalniane jest żelazo [53].

Kolejne procesy, zachodzące w wyniku  $\beta$ -eliminacji rodników alkoksylowych, powodują rozpad reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z wytworzeniem wielu produktów, tj. aldehydów nasyconych (np. heksanal, pentanal),  $\alpha,\beta$ -nienasyconych (np. 4-hydroksynonenal, 4-HNE) bądź węglowodorów (etan, pentan) [52].

Nienasycone aldehydy takie jak 4-hydroksynonenal i 4-hydroksyheksenal tworzą addukty z białkami modyfikując ich strukturę. Inne aldehydy powstające w procesie LPO: akroleina, dialdehyd malonowy (MDA), glioksal, metyloglioksal mogą również reagować z białkami tworząc produkty określane jako „*advanced lipid peroxidation end products*”, które zmieniają funkcje białek i odpowiedź komórki. Na skutek tworzenia adduktów i wiązań krzyżowych tych reaktywnych aldehydów z białkami dochodzi do zaburzenia funkcjonowania szlaków sygnałowych co może prowadzić do reakcji zapalnej albo śmierci komórki. 4-Hydroksynonenal sprzęga się z glutationem co powoduje obniżenie stężenia tego antyutleniacza. Zakłóca to funkcje mitochondrium i nasila stres oksydacyjny [54].

Z drugiej strony, produkty peroksydacji lipidów mogą indukować reakcję adaptacyjną poprzez stymulowanie ekspresji enzymów antyoksydacyjnych i produkcję endogennych antyutleniaczy co prowadzi do zmniejszenia skutków stresu oksydacyjnego. Taką cząsteczką sygnałową okazał się aktywny chemicznie 4-HNE łatwo reagujący z endogennymi związkami nukleofilowymi zawierającymi grupy tiolowe (np. cysteina) lub imidazolowe (histydyna). 4-HNE stymuluje proliferację komórek, ich różnicowanie i odpowiedź cytoprotekcyjną za pośrednictwem różnych szlaków sygnałowych. Produkty peroksydacji lipidów zwiększają uwalnianie Nrf2 z kompleksu z białkiem Keap1 i translokację Nrf2 do jądra co skutkuje pobudzeniem ekspresji enzymów antyoksydacyjnych takich jak m.in. S-transferaza glutationowa, reduktaza tioredoksyny, katalaza, oksydoreduktaza NADPH:chinon [55].



Ryc. 1.6. Schemat działania czynnika transkrypcyjnego Nrf2 [56]

(ARE – region odpowiedzi przeciwoksydacyjnej, Keap1 – białko wiążące czynnik Nrf2 w cytoplazmie, Nrf2 – czynnik transkrypcyjny Nrf2, SH – grupy tiolowe białka Keap1. W warunkach fizjologicznych czynnik Nrf2 jest umiejscowiony w cytoplazmie w połączeniu kompleksowym z białkiem Keap1. W warunkach stresu oksydacyjnego reszty tiolowe białka Keap1 ulegają utlenieniu, tworząc mostki siarczkowe, co prowadzi do zmiany struktury białka i uwolnienia z kompleksu czynnika Nrf2. Wolny czynnik Nrf2 ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie łącząc się z regionami ARE, pobudza syntezę enzymów antyoksydacyjnych. Zaburzenie funkcjonowania szlaku związanego z Nrf2 może mieć konsekwencje w postaci braku skutecznej obrony przeciwoksydacyjnej na poziomie komórkowym).



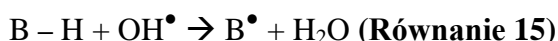
## ENZYMATYCZNA

Proces peroksydacji lipidów przebiega również przy udziale enzymów i przyczynia się do powstawania wielu istotnych biologicznie związków – prostaglandyn, tromboksanów czy leukotrienów. Na przykład synteza prostanoidów z kwasu arachidonowego inicjowana jest przez reakcję peroksydacji lipidów („kaskada kwasu arachidonowego”). Reakcje katalizowane są przez enzymy, tj. cyklooksygenazę (COX) i lipooksygenazę (LOX), które powodują wbudowanie cząsteczki tlenu do cząsteczki kwasu tłuszczowego, w wyniku czego powstają rodniki nadtlenkowe lipidów, mogące ulegać redukcji do odpowiedniego anionu. Różnica pomiędzy enzymatyczną i nieenzymatyczną peroksydacją lipidów polega na tym, że nadtlenki kwasów tłuszczowych ulegają przekształceniu w aniony, co hamuje wytwarzanie wodoronadtlenków [57].

### 1.4.2. Oksydacyjne uszkodzenia białek

Reaktywne formy tlenu mogą reagować z białkami, czego konsekwencją jest modyfikacja reszt aminokwasowych lub grup prostetycznych (nieaminokwasowych składników białek złożonych), jak również agregacja bądź fragmentacja cząsteczek białkowych [58].

W wyniku działania rodnika hydroksylowego na białka (B) następuje oderwanie atomu wodoru od cząsteczki:



Na atomie, od którego został oderwany wodór znajduje się niesparowany elektron – może on przemieszczać się w cząsteczce białka i umiejscowić w dowolnym punkcie, choćby na jednej z reszt aminokwasowych (np. cysteiny):

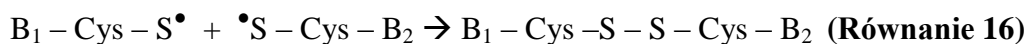


Tabela 1.2. Powszechne modyfikacje białek wywołane wolnymi rodnikami [59,60]

Aminokwas	RFT/RFA	Produkt
Arg	HO• (+ inne)	kwasy 5-hydrokso-2-aminowalerianowy
Cys	NO	S-nitrozylacja
Cys	HO• (+inne)	Cys-SH, Cys-SOH, Cys-SO <sub>2</sub> H, Cys-SO <sub>3</sub> H, utworzenie mostków disiarczkowych międzycząsteczkowych, mieszane (Cys-S-S-glutation)
Glu	HO• (+ inne)	wodoronadtlenki kwasu glutaminowego
His	HO• (+ inne)	2-oksyhistrydina/2-oxohistrydina
Leu/Val/Lys/Pro/Ile/Tyr	HO• (+ inne)	wodoronadtlenki i hydroksypochodne aminokwasów
Lys, Arg, Pro, Thr	HO• (+ inne)	utworzenie grupy karbonylowej przez bezpośrednie utlenienie
Lys, Cys, His	HO• (+ inne)	karbonylacja przez oddziaływanie z produktami utleniania lipidów i glikanów
Met	HO• (+ inne)	sulfotlenek metioniny
Phe	HO•	o-tyrozyna, m-tyrozyna
Trp	HO• (+ inne)	N-formylokinurenina, kinurenina, 5-hydroksotryptofan, 7-hydroksotryptofan
Tyr	HO lub RFA	DOPA
Tyr	HOCl	3-chlorotyrozyna
Tyr	RFA	3-nitrotyrozyna
Tyr	HO• (+ inne)	dityrozyna (Tyr-Tyr)

Konsekwencją rekombinacji wolnych rodników białkowych jest utworzenie dimerów białkowych. Poza resztami cysteiny utlenianiu mogą podlegać również reszty metioniny, tyrozyny, argininy, tryptofanu, lizyny, proliny, histydyny czy fenyloalaniny [23]. W reakcji utleniania aminokwasów posiadających wolną grupę aminową, amidową lub hydroksylową powstają pochodne karbonylowe (aldehydy, ketony). Poza utlenianiem aminokwasów siarkowych i nitrowaniem aminokwasów aromatycznych, zdolność do tworzenia takich pochodnych wykazuje nadtlenoazotyn. Powstała grupa karbonylowa charakteryzuje się stosunkowo dużą trwałością, dlatego możliwe jest jej ilościowe i jakościowe oznaczenie, pozwalające na ocenę uszkodzeń struktury białek [61,62]. Ta modyfikacja oksydacyjna jest procesem nieodwracalnym, co często prowadzi do utraty funkcji przez białko [63,64].

Grupy karbonylowe w białkach mogą pochodzić również z produktów peroksydacji lipidów, tj. MDA, 4-HNE, które tworzą z białkami szkodliwe produkty lipoksydacji (ang. *advanced lipoxidation end-products*, ALEs), będące przyczyną wielu chorób przewlekłych: sercowo-naczyniowych, neurodegeneracyjnych i chorób wątroby. Grupy karbonylowe mogą być również wprowadzane do białek w procesie glikacji, polegającym na przyłączaniu cząsteczek cukrów prostych do wolnych grup aminowych

białek – powstają wówczas produkty określane skrótem AGEs (ang. *advanced glycation end-products*), tj. ketoaminy, ketoaldehydy, których nadmiar prowadzi do retinopatii cukrzycowych i miażdżycy [65–67].

Konsekwencją oksydacyjnych uszkodzeń białek jest tworzenie agregatów opornych na degradację, gdyż nie ulegają one ubikwitynizacji i nie są rozpoznawane przez proteasomy [36].

#### **1.4.3. Oksydacyjne uszkodzenia kwasów nukleinowych**

Kwasy nukleinowe, których zadaniem jest powielanie, przechowywanie oraz przekazywanie informacji genetycznej są związkami bardziej stabilnymi niż lipidy czy białka. Składniki kwasów nukleinowych nie ulegają działaniu nadtlenu wodoru czy anionorodnika ponadtlenkowego, ale są podatne na wpływ rodnika hydroksylowego. Powoduje on uszkodzenia zasad nukleinowych bądź reszt cukrowych oraz może spowodować rozerwanie wiązania fosfodiesterowego łączącego nukleotydy [68].

Reakcje RFT z jądrowym DNA (nDNA, ang. *nuclear DNA*) zaliczane są do jednych z najgroźniejszych form uszkodzeń komórkowych, prowadząc do pojedynczych lub podwójnych pęknięć nici kwasów nukleinowych. Te ostatnie mogą powodować śmierć komórki [69]. RFT mogą być również przyczyną uszkodzeń mitochondrialnego DNA (mtDNA), co prowadzi do wielu zmian chorobowych [70]. Do głównych produktów oksydacyjnych uszkodzeń DNA należą: 8-hydroksyadenina (8-OH-Ade), 8-oksyguanina (8-oksyo-Gua), 5,6-dihydroksy-5,6-dihydrotymina (glikol tyminy, Tg) oraz produkty uszkodzenia zasad: 4,6-diamino-5-formamidopirymidyna (FapyAde) i 2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopirymidyna (FapyGua) [71,72].

Przedmiotem intensywnej badań dotyczących oksydacyjnych modyfikacji zasad DNA stała się 8-oksyo-2'-deoksyguanozyna (8-oksyo-dG) oraz jej forma tautomeryczna 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna (8-OH-dG) wykazująca właściwości mutagenne. Jest to produkt reakcji rodnika hydroksylowego z cząsteczką guanozyny. W procesie replikacji DNA, 8-oksyo-dG dąży do tworzenia błędnej pary z adeniną. Brak skorygowania tego błędu prowadzi w drugim cyklu replikacyjnym do mutacji punktowej, transwersji typu G => T [73].

Uszkodzeniu może ulegać również 2'-deoksyryboza, co prowadzi do pojedynczego lub podwójnego pęknięcia nici DNA bądź powstania cyklicznych pochodnych nukleotydów zwanych 8,5'-cyklopuryno-2'deoksynukleotydami:

8,5'-cyklo-2'-deoksyadenozyny (cdA) i 8,5'-cyklo-2'-deoksyguanozyny (cdG). Produkty te blokują aktywność polimeraz DNA i RNA [74].

Powyższe modyfikacje mogą zapoczątkować proces nowotworowy oraz mogą być przyczyną przekształcenia zmiany łagodnej w złośliwą [75].

W przeciętnej komórce człowieka liczba uszkodzeń DNA przez endogenne reaktywne formy tlenu osiąga wartość  $10^4$ /komórka/dobę [76].

#### **1.4.4. Uszkodzenia węglowodanów**

Węglowodany także mogą ulegać uszkodzeniom w wyniku oddziaływania reaktywnych form tlenu. Reakcja pomiędzy RFT i złożonymi wielocukrami prowadzi do rozerwania wiązań glikozydowych oraz ich depolimeryzacji. Uszkodzenia reszt cukrowych glikolipidów i glikoprotein powodują z kolei zmiany właściwości antygenowych tych cząsteczek i w konsekwencji także komórek, co może indukować wytwarzanie przeciwciał przeciw własnym komórkom organizmu [77].

Istotne znaczenie mają reakcje RFT z kwasem hialuronowym (HA), jednym z najważniejszych mukopolisacharydów. Posiada on zdolność wiązania dużych ilości wody, a w organizmach żywych występuje zazwyczaj w postaci soli sodowej – hialuronianu sodu [78,79]. Związek ten jest podstawowym składnikiem mazi stawowej i pod wpływem RFT (głównie rodnika hydroksylogowego) ulega depolimeryzacji, co prowadzi do zmniejszenia lepkości płynu stawowego i uszkodzenia powierzchni chrząstek stawowych [18].

Wykazano, że kwas hialuronowy oddziałuje z powierzchniowymi receptorami komórek rakowych, zwiększając ich przeżywalność i inwazyjność, co ma związek z przerzutami, np. raka piersi czy jelita grubego [80]. Stosowany jest jako marker do diagnozowania wielu chorób, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, nowotwory, schorzenia wątroby [81]. Podwyższone stężenie HA w osoczu krwi może wskazywać na istnienie stanu zapalnego lub chorobowego. W schorzeniach wątroby prowadzi do osłabienia klirensu wątrobowego wskutek uszkodzenia komórek sinusoidalnych wątroby [82]. Pomiar stężenia HA pozwala w nieinwazyjny sposób ocenić stopień zwłóknienia wątroby [83]. Podwyższenie stężenia HA obserwowano także u osób z zeszytniającym zapaleniem stawów kręgosłupa, co korelowało ze wskaźnikami laboratoryjnymi stanu zapalnego [84]. Z kolei w procesie różnicowania się komórek

stężenie HA obniża się z powodu jego degradacji przez hialuronidazę, co prowadzi do wydalenia kwasu z organizmu [85].

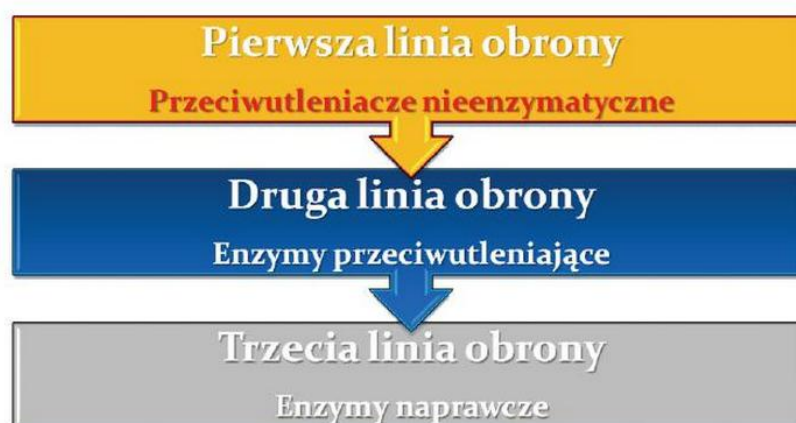
### 1.5. System obrony antyoksydacyjnej organizmu przed RFT

Rezultatem metabolizmu tlenowego jest wytwarzanie reaktywnych form tlenu, a ich zwiększone ilości powodują uszkodzenia komórek oraz prowadzą do wielu różnych chorób [86]. W organizmie żywym funkcjonuje szereg systemów przystosowanych do ochrony składników komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi [76].

Zachowanie równowagi pomiędzy wytwarzaniem a usuwaniem wolnych rodników tlenowych należy do substancji charakteryzujących się właściwościami antyoksydacyjnymi (przeciwutleniającymi). W organizmie wyróżnia się trzy linie obrony przed nadmierną ilością RFT, zwane triadą antyoksydacyjną:

- I – związki organiczne zawierające jony metali, jak ferrytyna, transferyna, ceruloplazmina; zapobiegają one powstawaniu wolnych rodników tlenowych,
- II – antyoksydanty drobnocząsteczkowe, jak glutation, witamina E czy C; do tej grupy należą również enzymy antyoksydacyjne takie, jak dysmutaza ponadtlenkowa, czy katalaza; związki te mają zdolność dezaktywacji RFT,
- III – systemy naprawcze cząsteczek, które zostały uszkodzone przez wolne rodniki tlenowe [87].

### System chroniący komórki przed RFT



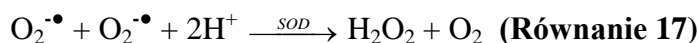
Ryc. 1.7. Trzy linie obrony układu antyoksydacyjnego [76]

### 1.5.1. Antyoksydanty enzymatyczne

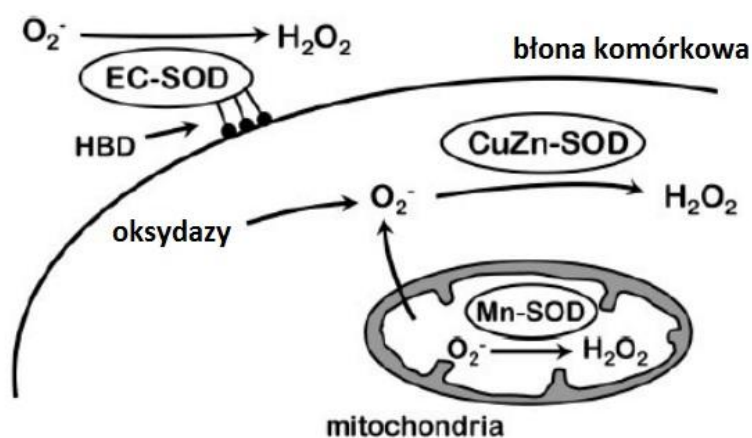
Na barierę enzymatyczną, chroniącą organizm przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu składa się kilka enzymów. Do tej grupy zalicza się przede wszystkim dysmutazę ponadtlenkową (SOD), katalazę (CAT), peroksydazę glutationową (GPx) oraz reduktazę glutationową (GR). Pełna ochrona antyoksydacyjna wynika z synergicznego oddziaływania wszystkich enzymów [88].

#### 1.5.1.1. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, ang. *superoxide dismutase*) (E.C.1.15.1.1.) to katalizator reakcji przekształcenia dwóch anionorodników ponadtlenkowych w tlen cząsteczkowy oraz wodę. Mechanizm ten dezaktywuje  $O_2^{\bullet-}$ , który znajduje się w komórce [89].



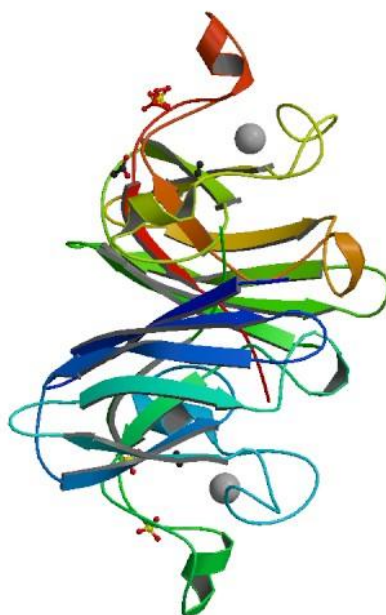
Istnieją trzy izoformy tego enzymu, z czego każda kodowana jest przez inny gen. Dysmutaza ponadtlenkowa miedziowo – cynkowa CuZnSOD (SOD1) mieści się głównie w cytozolu i jądrze komórkowym, a ulega ekspresji we wszystkich komórkach ssaków. Dominuje ona w naczyniach krwionośnych, gdzie kontroluje m.in. wydzielanie tlenu azotu. Dysmutaza ponadtlenkowa manganowa MnSOD (SOD2) występuje z kolei w macierzy mitochondrialnej i rozkłada powstające tam reaktywne formy tlenu. Dysmutaza ponadtlenkowa zewnątrzkomórkowa EC-SOD (SOD3) wydzielana jest poza komórkę. Jest to główna dysmutaza chłonki, osocza i płynu stawowego. Podobnie jak SOD1 połączona jest z jonem miedzi i cynku – jest ona niezbędna w procesie przenikania tlenu azotu przez ścianę naczyń [90,91].



Ryc. 1.8. Lokalizacja subkomórkowa dysmutaz [90]

Izoforma SOD2 jest kluczowym enzymem chroniącym komórki przed atakiem wolnych rodników [92]. Spełnia rolę represora rozwoju nowotworów [93]. Wzrost ekspresji SOD następuje pod wpływem wielu czynników wywołujących stres oksydacyjny: czynnika martwicy nowotworu TNF- $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor*), interleukin, lipopolisacharydów (LPS), interferonu-g, promieniowania  $\gamma$  i X, niektórych leków [94,95]. Związki te wytwarzają reaktywne formy tlenu prowadzące do aktywacji czynników transkrypcyjnych, głównie jądrowego czynnika NF- $\kappa\beta$  (ang. *nuclear factor  $\kappa\beta$* ) i czynnika transkrypcyjnego AP-1 (ang. *activating protein 1*), biorących udział w aktywacji genów kodujących białka chroniące komórki przed stresem oksydacyjnym [96].

Spadek aktywności SOD2 obserwowano na początku choroby nowotworowej, z kolei wzrost aktywności enzymu towarzyszył rozwojowi choroby nowotworowej i stopniowemu złośliwieniu komórek. Wysokie stężenie nadtlenu wodoru powstającego w wyniku działania SOD może stymulować podziały komórek nowotworowych [97].



Ryc. 1.9. Struktura ludzkiej dysmutazy nadadtlenkowej CuZnSOD [98]

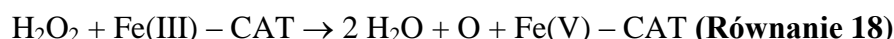
#### 1.5.1.2. Katalaza (CAT)

Katalaza (CAT, ang. *catalase*) (E.C.1.11.1.6.) to enzym zawierający żelazo hemowe, który posiada zdolność redukcji nadtlenu wodoru do wody. Znajduje się on w większości komórek, a najmniejsze ilości występują w komórkach serca i neuronach.

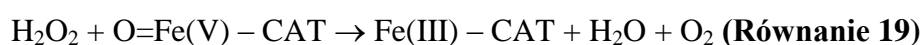
Funkcja przeciwutleniająca katalazy nie została do końca wyjaśniona, gdyż zahamowanie jej aktywności nie powoduje zwiększenia toksyczności  $H_2O_2$  [76].

Katalaza to katalizator reakcji dysproporcjonowania nadtlenu wodoru, w wyniku której wytwarzany jest tlen cząsteczkowy i woda. Reakcja ta zachodzi w dwóch etapach [76]:

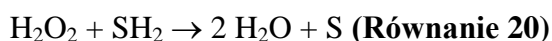
- I – redukcja nadtlenu wodoru do wody w obecności jonu Fe (III) układu hemowego:



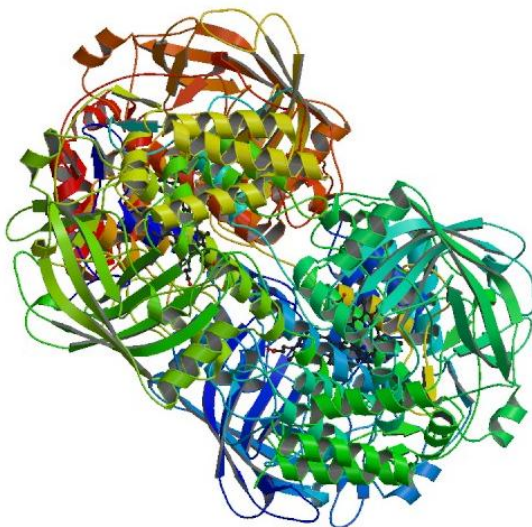
- II – reakcja utleniania z udziałem kolejnej cząsteczki nadtlenu wodoru:



Cechą charakterystyczną tego enzymu są jego właściwości peroksydazowe, ujawniające się podczas reakcji utleniania niektórych związków (jak etanol, mrówczan czy chinony). Mechanizm reakcji polega na redukcji nadtlenu wodoru do wody z udziałem donorów wodoru [99]:



Katalaza odgrywa dużą rolę w kancerogenezie, apoptozie, mutagenezie oraz stanach zapalnych [76]. Jej stężenie zmienia się w zależności od stanu chorobowego. Niską aktywność tego enzymu zaobserwowano w wielu chorobach nowotworowych (płuc, przewodu pokarmowego, piersi, nerek oraz białaczkach), wrzodziejącym zapaleniu dziąseł, a także u alkoholików [100].



Ryc. 1.10. Struktura katalazy z erytrocytów ludzkich [101]



### 1.5.1.3. Peroksydaza glutationowa (GPx)

Peroksydaza glutationowa (GPx, ang. *glutathione peroxidase*) (E.C.1.11.1.9.) to enzymem zdolny do redukcji nadtlenu wodoru do wody. Mechanizm działania opiera się na usunięciu elektronów z glutationu w formie zredukowanej oraz ich przyłączeniu do nadtlenu wodoru. W wyniku działalności reduktazy glutation powraca do formy zredukowanej – poprzez przeniesienie wodoru z fosforanu dinukleotydu nikotyno – aminoadeninowego (NADPH):

reakcja peroksydazy:  $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{GSH} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$  (**Równanie 21**)

reakcja reduktazy:  $\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{GSSG} \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$  (**Równanie 22**)

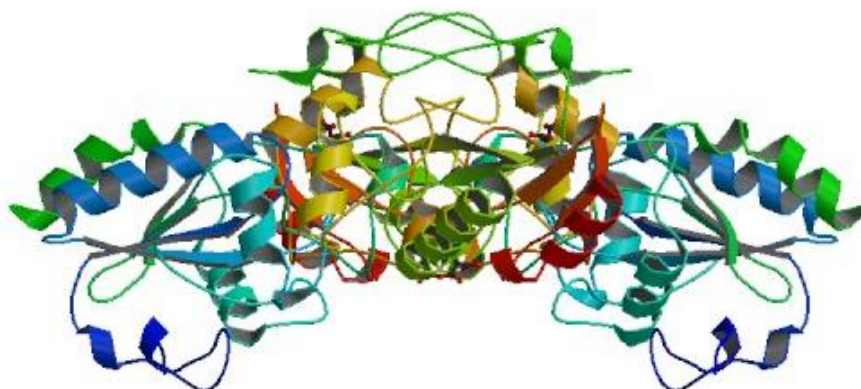
Aktywność peroksydazy glutationowej zależy od selenu, który jest pierwiastkiem śladowym w organizmie, jego niedobór może powodować znaczne obniżenie aktywności tego enzymu [102].

U ssaków wyróżnia się sześć izoform tego enzymu, różniących się miejscem występowania: cytozolowa lub klasyczna (cGPx, GPx-1); żołądkowo-jelitowa (giGPx, GPx-2); pozakomórkowa osoczowa (pGPx, GPx-3); peroksydaza wodoronadtlenków fosfolipidowych (phGPx ang. *phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*, GPx-4) znajdująca się w mitochondriach i cytoplazmie; regulowana stężeniem androgenów (ang. *epididymal androgen-related protein*) (eGPx, GPx-5) występująca w najądrzu męskiego układu rozrodczego; powonieniowa (OMP ang. *olfactory-metabolizing protein*, GPx-6) umieszczona w nabłonku węchowym. U ludzi wszystkie oprócz izoformy GPx-5 zawierają w centrum aktywnym selenocysteinę, czyli są to formy tzw. selenozależne peroksydazy glutationowej (Se-GPx) [103].

Aktywność GPx niezależnej od selenu (non-Se-GPx) pokrywa się z formą  $\alpha$  S-transferazy glutationowej (GST), enzymu katalizującego powstawanie koniugatów glutationu z ksenobiotykami. Różnica pomiędzy Se-GPx i non-Se-GPx polega na tym, że Se-GPx katalizuje redukcję organicznych i nieorganicznych nadtlenczków, podczas gdy non-Se-GPx redukuje tylko nadtlenczki organiczne, powstające w procesie peroksydacji lipidów [104,105]. Non-Se-GPx uważana jest raczej za transferazę wykazującą funkcje GPx, często zwyczajowo nazywana jest peroksydazą glutationową selenoniezależną [106].

Aktywność peroksydaz glutationowych, niezależną od Se wykazują białka błonowe MAPEG (ang. *Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione*

*metabolism*) – trimery odgrywające ważną rolę w metabolizmie kwasu arachidonowego [107].



Ryc. 1.11. Struktura peroksydazy glutationowej GPx1 z selenocysteiną [108]

#### 1.5.1.4. Reduktaza glutationowa (GR)

Reduktaza glutationowa (GR, ang. *glutathione reductase*) (E.C.1.8.1.7), to oksydoreduktaza występująca w cytozolu i mitochondriach. Główną funkcją tego enzymu jest utrzymywanie prawidłowego stężenia glutationu w komórkach dzięki zdolności do przekształcania utlenionego glutationu GSSG (disulfidu glutationu) w jego formę zredukowaną GSH [109].

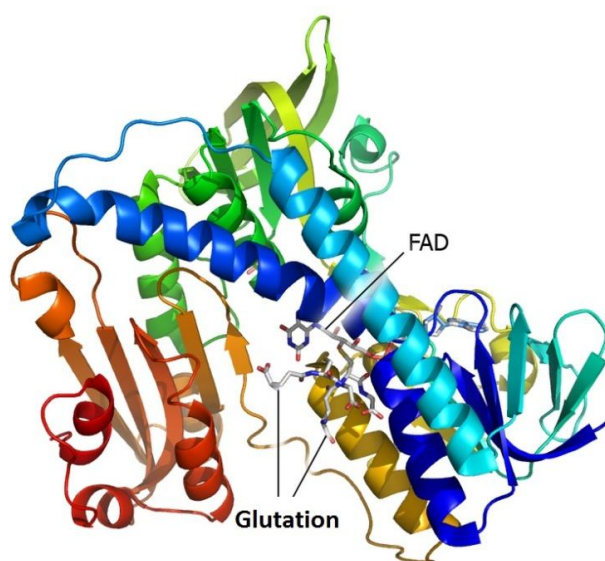


Grupą prostetyczną enzymu jest dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD) [110], a podjednostki krystalicznej formy ludzkiej GR są połączone wiązaniem disiarczkowym cysteiny [111]. GR współdziała z peroksydazą glutationową dostarczając jej zredukowaną formę GSH kosztem utleniania NADPH w formę NADP<sup>+</sup> [112].

Ponadto uczestniczy również w przemianach zmniejszających toksyczność tlenu. Wykazano, że ekspresja mRNA reduktazy glutationowej wzrasta pod wpływem narażenia na czynniki wywołujące stres oksydacyjny [113]. Jednym z takich czynników jest przewlekłe zatrucie etanolem, prowadzące do wzrostu aktywności GR w prążkowiu i rdzeniu kręgowym. Wyższa aktywność GR może stanowić odpowiedź adaptacyjną komórek na obniżony poziom NADPH, który towarzyszy zatruciu

etanołem lub świadczy o dążeniu komórek do utrzymania prawidłowego poziomu glutationu [114].

Rola GR jest szczególnie ważna w erytrocytach, które chroni przed hemolizą. W stanach niedożywienia niedobór ryboflawiny może być przyczyną obniżonej aktywności GR, co prowadzi do nasilenia stresu oksydacyjnego i anemii hemolitycznej. Ryboflawina jest prekursorem FAD, którego forma zredukowana przekazuje dwa elektrony do wiązania disiarczkowego, obecnego w utlenionej postaci GR, w celu rozpoczęcia cyklu katalitycznego enzymu [107].



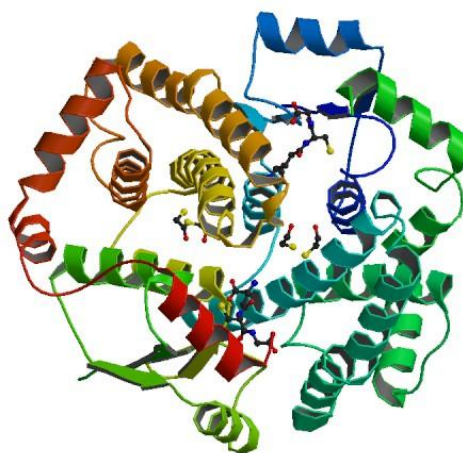
Ryc. 1.12. Struktura reduktazy glutationowej GR [115]

#### 1.5.1.5. S-transferaza glutationowa (GST)

S-transferazy glutationowe (GST, ang. *glutathione S-transferase*) (E.C.2.5.1.18) to rodzina trzech enzymów, których podstawową funkcją jest katalizowanie reakcji sprzęgania glutationu (GSH) ze związkami elektrofilowymi (m.in. ksenobiotykami i produktami ich biotransformacji) oraz ich usuwanie na zewnątrz komórki. Enzymy te uczestniczą także w reakcji usuwania poza komórkę utlenionej disiarczkowej formy glutationu (GSSG), która powstaje w wyniku dwuelektronowej reakcji redukcji nadtlenu wodoru z wykorzystaniem GSH jako dawcy protonów. GST inaktywuje endogenne nienasycone aldehydy, epoksydy i nadtenki – związki będące reaktywnymi produktami stresu oksydacyjnego [116].

U ludzi wyróżnia się 2 rodzaje form GST: cytozolowe i mikrosomalne. Do cytozolowych GST należą następujące klasy: alfa (GSTA1 i 2), mi (od GSTM1 do M5), omega (GSTO1), pi (GSTP1), sigma (GSTS1), teta (GSTT1 i 2) oraz zeta (GSTZ1). Formy te katalizują metabolizm ksenobiotyków, natomiast formy mikrosomalne – metabolizm substancji endogennych [117]. Enzymy należące do klasy alfa charakteryzują się właściwościami antyoksydacyjnymi, ponadto niektóre izoformy chronią mitochondria przed szkodliwymi produktami peroksydacji lipidów m.in. 4-hydroksynonenalem (4-HNE), który uczestniczy w komórkowej sygnalizacji prowadzącej m.in. do apoptozy [118].

W przeciwieństwie do peroksydazy glutationowej, w strukturach GST nie występuje atom Se, nie mogą one także redukować nadtlenu wodoru [119].



Ryc. 1.13. Struktura cytozolowej S-transferazy glutationowej GSTA1 w kompleksie z glutationem [120]

#### **1.5.1.6. Reduktaza NAD(P)H: chinon 1 (NQO1)**

Oksydoreduktaza NAD(P)H:chinon1 (NQO1, ang. *oxidoreductase NAD(P)H:quinone 1*) (E.C.1.6.99.2) to enzym biorący udział w detoksykacji ksenobiotyków. Występuje on u zwierząt, roślin i bakterii, a u ludzi największą aktywność wykazano w wątrobie, mniejszą m.in. w nerkach. Akceptorem elektronów w reakcjach katalizowanych przez ten enzym może być NADH oraz NADPH. NQO1 w komórkach odgrywa różne role, między innymi bierze udział w redukcji endogennych i egzogennych chinonów i związków chinonowych do hydrochinonów. W wyniku jednoelektronowej redukcji chinonów powstają semichinony łatwo utleniane przez tlen cząsteczkowy ponownie do chinonów. Podczas tej przemiany tworzy się anionorodnik

ponadtlenkowy, z którego w reakcji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową powstaje nadtlenek wodoru – ten przy udziale  $\text{Fe}^{2+}$  może przekształcić się w rodnik hydroksylowy  $\text{OH}^\cdot$  lub ulec deaktywacji w reakcji katalizowanej przez katalazę. NQO1 zapobiega powyższym procesom poprzez redukcję chinonów w dwuelektronowej reakcji do hydrochinonów, związków bardziej stabilnych, które mogą być usuwane bezpośrednio lub w wyniku dalszych reakcji sprzężania z kwasem glukuronowym lub siarkowym [116].

NQO1 zdolna jest do bezpośredniego usuwania anionorodnika ponadtlenkowego, choć mniej wydajnie niż SOD [121]. Ta właściwość może stanowić dodatkową ochronę szczególnie w tkankach o niskiej ekspresji SOD. Na przykład w komórkach układu sercowo-naczyniowego, w których ekspresja NQO1 jest wysoka a SOD jest stosunkowo niska, indukcja NQO1 koreluje ze zwiększonym wychwytywaniem anionu ponadtlenkowego [122].

#### **1.5.1.7. Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD)**

Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD (ang. *glucose-6-phosphate dehydrogenase*) (E.C.1.1.1.49) to enzym należący do klasy oksydoreduktaz i grupy dehydrogenaz [123]. Jest to enzym katalizujący powstawanie zredukowanej formy fosforanu nikotynamidoadeninowego, czyli NADPH (ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) – kofaktora reduktazy glutationowej [124].

W warunkach stresu oksydacyjnego zmienia się aktywność enzymów antyoksydacyjnych, w tym peroksydazy glutationowej. Enzym ten zużywa glutation zredukowany (GSH), który przechodzi w formę utlenioną, disulfid glutationu (GSSG). Przejście GSSG w GSH jest możliwe dzięki reduktazie glutationowej, która w tym celu potrzebuje NADPH jako substratu. Jego źródłem jest szlak pentozofosforanowy, a dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa katalizuje pierwszy etap tego szlaku. Proces ten obejmuje utlenianie glukozy-6-fosforanu do kwasu glukonowego oraz redukcję NADP do  $\text{NADPH}^{+H^+}$  [125]. Aktywacja G6PD zachodzi przy udziale glukozy, która stanowi zatem źródło równoważników redukcyjnych (NADH i NADPH), uczestniczących w przejściu utlenionych komórkowych antyoksydantów (GSSG) w formę zredukowaną (GSH) [126].

Genetycznie uwarunkowany niedobór G6PD jest przyczyną niedokrwistości hemolitycznej w stanach stresu oksydacyjnego wynikającego z infekcji, stosowania

leków i spożywania bobu (fawizm). U noworodków może wystąpić uporczywa żółtaczka. Niedobór tego enzymu jest globalnym problemem zdrowotnym [127].

Ostatnie badania wykazały, że G6PD bierze udział w procesie apoptozy i angiogenezy, odgrywa kluczową rolę w proliferacji, przeżyciu i przerzutach komórek nowotworowych i jest obiecującym celem w terapii nowotworów [128]. Huaidong i wsp. (2014) wykazali, że ekspresja G6PD w komórkach raka wątrobowo-komórkowego (HCC, *ang. hepatocellular carcinoma*) związanego z zakażeniem HBV (WZW B, *ang. hepatitis B virus*) jest wyższa w porównaniu do tkanek kontrolnych. W doświadczeniu wykorzystano zjawisko wyciszania ekspresji genu przez dwuniciowy RNA - interferencję RNA która wywołała zahamowanie ekspresji G6PD i zmniejszenie replikacji wirusa HBV poprzez szlak sygnałowy IFN (interferon). Obniżona ekspresja G6PD powodowała zmniejszenie migracji i inwazji komórek raka wątroby w hodowli linii komórkowych ludzkiego wątrobiaka BEL7402 i HepG2. Autorzy cytowanego doniesienia sugerują, że obniżenie ekspresji G6PD może przyczynić się do hamowania rozwoju nowotworu [129].

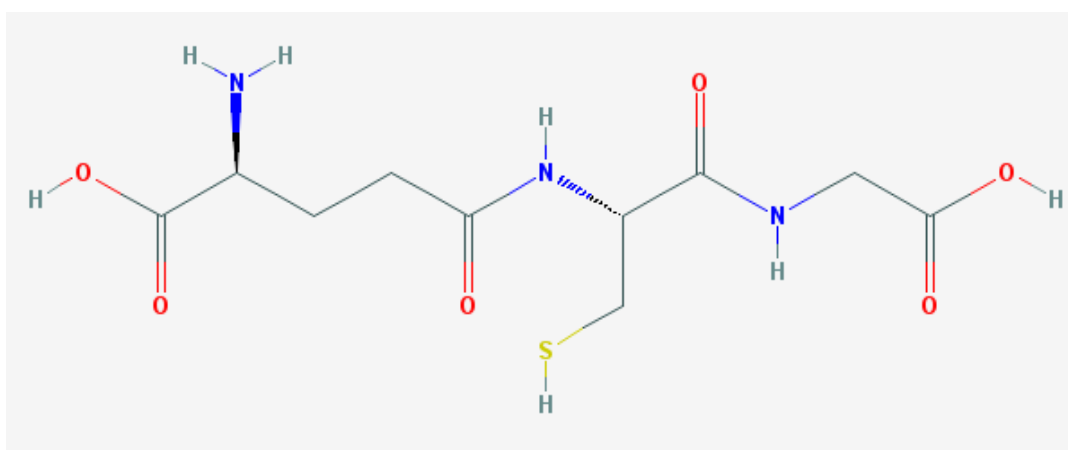
### **1.5.2. Obrona nieenzymatyczna**

Nieenzymatyczne mechanizmy ochrony antyoksydacyjnej polegają na zmniejszaniu ilości wolnych rodników poprzez działanie odpowiednich substancji, które nazywane są „wymiataczami” wolnych rodników (*ang. free radical scavenger*) [76].

#### **1.5.2.1. Antyoksydanty hydrofilowe**

**Glutation** (GSH), czyli  $\gamma$  – glutamylcysteinylglycyna ( $\gamma$  – glu – cys – gly) to najbardziej rozpowszechniony niskocząsteczkowy związek tiolowy w przyrodzie. Substancja ta występuje we wszystkich komórkach prokariotycznych oraz eukariotycznych, a jego biosynteza zachodzi w cytoplazmie niemal wszystkich komórek [130]. Glutation to jeden z głównych antyutleniaczy obecnych w organizmie. Spełnia rolę czynnika redukującego dzięki zawartości w jego cząsteczce grup sulfhydrylowych cysteiny. Antyoksydacyjne działanie GSH polega w głównej mierze na bezpośredniej redukcji nadtlenu wodoru do cząsteczki wody z pominięciem procesu powstawania rodników hydroksylowych. Poza tym wykazuje on zdolność detoksykacji nadtlenu organicznych i innych reaktywnych form tlenu oraz związków elektrofilowych (egzo- lub endogennych). Posiada także możliwość chelatowania niebezpiecznych jonów metali oraz może regenerować inne antyoksydanty, uczestniczy

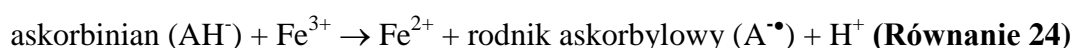
w naprawie uszkodzonych struktur komórki (przede wszystkim białek i lipidów błon komórkowych oraz DNA), bierze udział w utrzymywaniu stałej wartości potencjału redukcyjno-oksydacyjnego komórek, a w ośrodkowym układzie nerwowym pełni rolę swoistego modulatora neurotransmisji glutaminianergicznej i neuroprzekaźnika [89]. Podczas reakcji redukcji  $H_2O_2$  grupa sulfhydrylowa GSH ulega utlenieniu do disulfidu glutationu (GSSG), charakteryzującego się brakiem właściwości antyoksydacyjnych, co może prowadzić do kumulacji w komórce GSSG. Utleniona forma glutationu może zredukować się z powrotem do GSH w reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową, tworząc cykl redoks. Stosunek GSH/GSSG w dużej mierze decyduje o wewnątrzkomórkowym potencjale redoks komórki, dlatego wykorzystywany jest do oznaczania poziomu stresu oksydacyjnego w organizmie [130].



Ryc. 1.14. Struktura glutationu [131]

**Witamina C** (kwas askorbinowy) to reduktor, dostarczający elektrony wolnym rodnikom, co umożliwia uzupełnianie orbitali elektronowych tych rodników. Duże ilości witaminy C znajdują się w płucach – prawdopodobnie pełni tam funkcję ochronną poprzez dezaktywację zanieczyszczeń wchłanianych drogą oddechową [56].

Kwas askorbinowy wykazuje zdolność odwracalnego utleniania i redukcji, co pozwala na utrzymywanie prawidłowego stanu redoks w komórce. Związek ten dezaktywuje anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik wodorotlenowy oraz tlen singletowy. Mechanizm działania antyoksydacyjnego polega na tworzeniu z wolnymi rodnikami mało reaktywnego rodnika askorbylowego [132]:

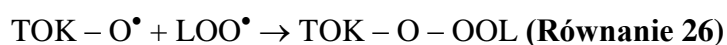
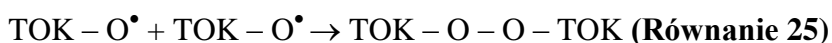


Witamina C posiada również właściwości prooksydacyjne – oddziałując z jonami metali przejściowych (żelaza lub miedzi) redukuje je z wytworzeniem nadtlenku wodoru, a podczas tego procesu powstają także rodniki hydroksylowe [132].

### 1.5.2.2. Antyoksydanty hydrofobowe

**Witamina E** (alfa – tokoferol) jako substancja rozpuszczalna w tłuszczach działa antyoksydacyjnie na lipidy zawarte w błonie. Jest to jedyny związek z grupy antyoksydantów zdolny do zatrzymania procesu peroksydacji lipidów. W trakcie tego procesu witamina E utleniana jest do mało reaktywnego wolnego rodnika, który przerywa reakcję łańcuchową, czego efektem jest ochrona kolejnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych przed ich utlenieniem. Reakcja przemiany rodnika do witaminy E zachodzi po dostarczeniu elektronu od witaminy C [23,56].

Witamina E łączy się z rodnikami nadtlenków lipidów powstającymi w procesie peroksydacji tworząc mniej reaktywne rodniki tokoferylowe. Hamują one proces utleniania lipidów łącząc się ze sobą albo z rodnikami nadtlenowymi.



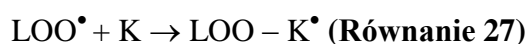
Rodniki tokoferylowe są usuwane z organizmu przez takie antyoksydanty jak: glutation czy witamina C [133].

**Ubichinon** (koenzym  $\text{Q}_{10}$ ) (2,3-dimetoksy-5-metylo-6-poliprenylo-1,4-benzochinon) to związek syntetyzowany we wszystkich tkankach i komórkach, którego biosynteza ulega nasileniu m.in. w wyniku stresu oksydacyjnego. W warunkach fizjologicznych występuje w dwóch formach – utlenionej (ubichinon  $\text{CoQ}_{10}$ ) oraz zredukowanej (ubichinol  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ ). Ubichinon wykazuje zarówno działanie antyoksydacyjne (o charakterze bezpośrednim i pośrednim), jak i prooksydacyjne. Z kolei ubichinol posiada zdolność bezpośredniego działania antyoksydacyjnego – wiąże on wolne rodniki, co zapobiega peroksydacji lipidów oraz przeciwdziała oksydacyjnym modyfikacjom białek i DNA. Mechanizm ten polega na oddaniu atomu wodoru oraz wytworzeniu rodnika ubisemichinonowego ( $\text{CoQ}_{10}\text{H}^\bullet$ ), który wchodzi w reakcje z tlenem cząsteczkowym lub z innymi rodnikami. W wyniku tej reakcji powstaje cząsteczka koenzymu  $\text{Q}_{10}$ , jednak brakuje w niej atomu wodoru, co uniemożliwia pełnienie funkcji antyoksydacyjnej. Pośrednie działanie ubichinolu oraz



rodnika ubisemichinonowego polega na współdziałaniu z witaminą E – oba związki wzmagają regenerację zredukowanej, biologicznie aktywnej postaci tokoferolu z jej formy utlenionej [134].

**β – karoten** to żółty barwnik roślinny – w swojej cząsteczce zawiera dwa pierścienie β – jononu, połączone łańcuchem będącym tetrametrem izoprenu. Charakterystycznym elementem budowy tego związku jest chromofor – ugrupowanie zawierające układ sprzężonych wiązań podwójnych π. Posiada on zdolność wygaszania tlenu singletowego oraz wchodzi w reakcje z organicznymi wolnymi rodnikami, wytwarzanymi podczas peroksydacji lipidów. Następnym zachodzącą reakcją przyłączania rodnika nadtlenku lipidu do β – karotenu jest powstanie wolnego rodnika, w którym niesparowany elektron znajduje się na atomie węgla:



Kolejnym etapem tego procesu jest reakcja utworzenia adduktu karotenowego, zdolnego do reakcji z następnymi rodnikami, czego produktem są wielokrotne addukty [23]. W organizmie β-karoten przekształcany jest w retinal (witamina A) w reakcji katalizowanej przez dioksygenazę β-karotenową [135].

**Witamina A** występuje w dwóch podstawowych formach – retinolu oraz 3, 4 – didehydroretinolu. Obecność w cząsteczce witaminy A łańcucha polienowego, zawierającego liczne wiązania podwójne, gwarantuje udział w reakcjach redoks, a tym samym właściwości antyoksydacyjne. Witamina ta reaguje z rodnikiem nadtlenkowym oraz hamuje łańcuch reakcji wolnorodnikowych. Wykazano, że retinol ma wyższą efektywność w usuwaniu rodnika peroksyłowego ( $\text{LOO}^\bullet$ ) niż witamina E oraz wykazuje zdolność do bezpośredniej reakcji z wolnymi rodnikami tlenowymi oraz do wygaszania tlenu singletowego [48]. Witamina A może także modulować transkrypcję genów za pośrednictwem 2 rodzajów receptorów jądrowych: receptory kwasu retinowego i receptory retinoidowe X, co wynika z bezpośredniego oddziaływania z ligandem. Receptory te oddziałując na miejsca promotorowe niektórych genów, mogą mieć istotny wpływ na hamowanie wzrostu komórek nowotworowych. Wykazano, że w różnych typach nowotworów poziom ekspresji lub aktywności tych receptorów ulega obniżeniu [48].

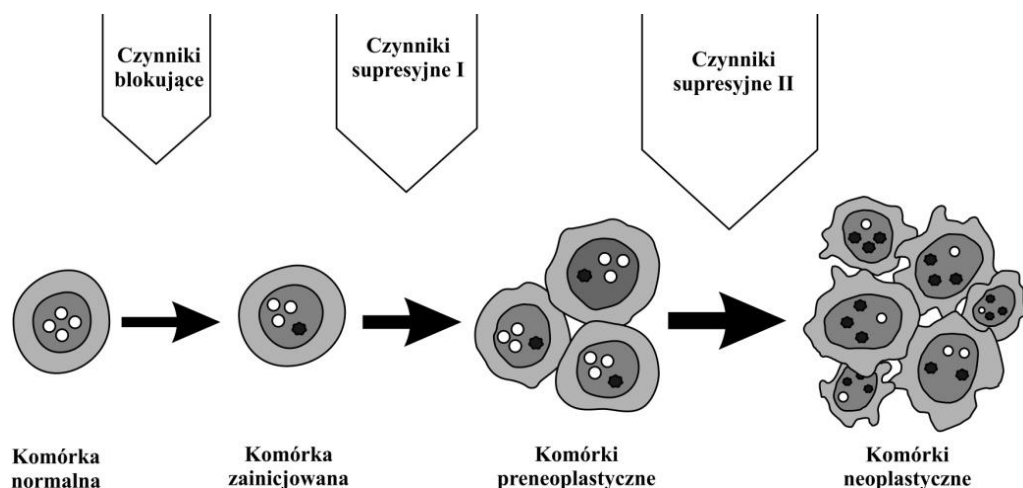
## 1.6. Kancerogeneza chemiczna i chemoprewencja

Kancerogeneza chemiczna jest zwykle procesem wieloetapowym charakteryzującym się wieloma zmianami fenotypowymi i genotypowymi. W pierwszym etapie inicjacji następuje nieodwracalna zmiana o charakterze genotypowym. Polega ona na uszkodzeniu DNA wywołanym interakcją z aktywną formą kancerogenu. Zmiana ta zostaje utrwalona jeżeli uszkodzenie DNA nie zostanie naprawione przed podziałem komórki. Zainicjowana komórka może pozostać w stanie niezmienionym przez długi czas, może ulec apoptozie a także może wejść w cykl podziału komórkowego w procesie promocji. Etap promocji charakteryzuje się klonalnym wzrostem zainicjowanych komórek spowodowanym bądź nasileniem proliferacji bądź zahamowaniem apoptozy. Czynniki wywołujące ten proces określa się jako promotory kancerogenezy. W efekcie powstają uszkodzenia preneoplastyczne, które są odwracalne po usunięciu czynnika promującego. Etap promocji jest znacznie dłuższy niż proces inicjacji a promotory wykazują specyficzność narządową, np. fenobarbital jest promotorem nowotworu wątroby i nie wywiera takiego działania w innych tkankach. W etapie progresji uczestniczą mechanizmy genotoksyczne prowadzące do aberracji i translokacji chromosomowych. W efekcie dochodzi do zmian o charakterze złośliwym zdolnych do inwazji do sąsiednich komórek. Etap progresji jest nieodwracalny [137].

Termin „chemoprewencja” jest definiowany wg Narodowego Instytutu Badań nad Rakiem w USA jako „stosowanie substancji naturalnych lub syntetycznych w celu zmniejszenia ryzyka rozwoju lub nawrotu choroby nowotworowej”. W zależności od mechanizmu działania środki chemoprewencyjne dzieli się na 2 kategorie: blokujące, które działają na etapie inicjacji oraz supresyjne, które modulują etap promocji lub progresji nowotworu. Czynniki antyinicjacyjne mogą hamować aktywację metaboliczną kancerogenów, zwiększać ich detoksykację, zapobiegać reakcji elektrofilowych metabolitów z DNA, zwiększać skuteczność naprawy DNA [12]. Czynniki antypromocyjne/antyprogresyjne mogą hamować proces kancerogenezy poprzez zmniejszenie reaktywnych form tlenu, modyfikację dróg transdukcji sygnałów, zmianę ekspresji genów, hamowanie procesów zapalnych i proliferacji oraz pobudzanie apoptozy [12].

Charakterystyczną cechą wieloetapowego procesu kancerogenezy jest długi okres dzielący etap inicjacji od pojawienia się złośliwego guza. W tym czasie zachodzi

wiele zmian polegających na zakłóceniu szlaków sygnałowych decydujących o rozwoju i zróżnicowaniu komórek. Może też dochodzić do zwiększonej syntezy czynników prozapalnych i mitogennych co pociąga za sobą uruchomienie procesu zapalnego, wszystkie te zjawiska mogą być celem oddziaływania czynników chemoprewencyjnych [137].



Ryc. 1.15. Chemoprewencja wieloetapowego procesu kancerogenezy [137]

Pod względem możliwości zastosowania praktycznego wyróżnia się trzy główne strategie chemoprewencyjne [138]:

- chemoprewencja pierwotna (antyinicjacyjna) – środki hamujące nowotwór na etapie inicjacji; skierowana do osób zdrowych z grupy podwyższonego ryzyka rozwoju choroby nowotworowej – narażonych na działanie kancerogenu z predyspozycjami genetycznymi,
- chemoprewencja drugiego rzędu (inaczej antypromocyjna lub antyprogresyjna) – hamuje progresję nowotworu, służy terapii dla osób z wczesnie wykrytymi stanami przedrakowymi,
- chemoprewencja trzeciego rzędu – ma na celu zapobieganie nawrotom choroby, środek zapobiegawczy przeciwko drugim nowotworom pierwotnym.

### 1.7. Rola stresu oksydacyjnego w procesie nowotworowym

Nasilony stres oksydacyjny może powodować zmiany w strukturze najważniejszych makrocząsteczek komórkowych: DNA, białek i lipidów. Zmiany te prowadzą do zaburzeń ich funkcji co skutkuje zakłóceniem metabolizmu komórkowego. Udowodniono, że wiele kancerogenów chemicznych indukuje produkcję RFT obniżając jednocześnie zdolności antyoksydacyjne komórki oraz zdolność

naprawy DNA. Stan stresu oksydacyjnego powoduje brak stabilności chromosomów, mutacje, zakłócenie wzrostu komórek prowadzące do rozwoju nowotworu [8].

Reakcje RFT z DNA powodują wiele uszkodzeń oksydacyjnych polegających m.in. na uszkodzeniu pojedynczych zasad azotowych, pęknięciu nici DNA oraz tworzeniu adduktów. Szczególną reaktywnością charakteryzuje się rodnik hydroksylowy, który powoduje rozerwanie wiązań fosfodiesterowych łączących nukleotydy oraz powstanie wiązań poprzecznych DNA-białko. Oksydacyjne uszkodzenia DNA są odpowiedzialne za większość mutacji w żywych organizmach. Ocenia się, że częstotliwość tych uszkodzeń w komórkach człowieka wynosi  $10^4$  /komórka/dzień. RFT mogą również powodować zwiększony napływ jonów  $Ca^{2+}$  do komórki oraz ich uwalnianie z rezerw wewnątrzkomórkowych. Wzrost stężenia wapnia prowadzi do aktywacji  $Ca^{2+}$ -zależnych endonukleaz odpowiedzialnych za degradację DNA. Wzrost stężenia tych jonów aktywuje też  $Ca^{2+}$ -zależne kinazy białkowe, enzymy katalizujące fosforylację czynników transkrypcyjnych, wpływając w ten sposób na proces transkrypcji. Oksydacyjne modyfikacje DNA mogą dawać początek procesowi nowotworowemu a także są czynnikiem sprzyjającym przekształceniu zmiany łagodnej w złośliwą [85]. Udział stresu oksydacyjnego w procesie nowotworowym może polegać także na zmianach epigenetycznych związanych z modulacją szlaków komórkowej transdukcji sygnałów [139].

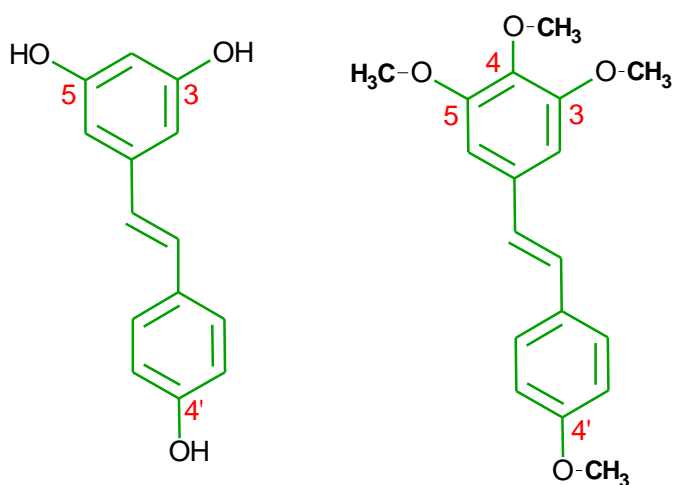
Utlenianie białek przez RFT powoduje zmiany w ich strukturze oraz utratę funkcji biologicznych. Na skutek tych reakcji powstają grupy karbonylowe zdolne do reagowania z wolnymi grupami aminowymi co prowadzi do utworzenia w białkach wiązań krzyżowych. Zmienione oksydacyjnie białka mogą też tworzyć odporne na degradację agregaty, które gromadzą się w komórkach powodując zakłócenie ich biochemicznych o funkcji. Wykazano, że produkty utleniania białek odgrywają rolę w patogenezie różnych schorzeń w tym w chorobie nowotworowej [140].

Końcowymi produktami peroksydacji lipidów są nienasycone aldehydy takie jak i 4-hydroksynonenal i 4-hydroxyheksenal. Te reaktywne cząsteczki charakteryzują się znacznie dłuższymi okresami półtrwania (minuty do godzin) niż reaktywne formy tlenu i azotu, których okres półtrwania wynosi mikrosekundy. Jako cząsteczki bez ładunku mogą one swobodnie przemieszczać się przez błony komórkowe i wywierać szkodliwe działanie w miejscach odległych od ich wytworzenia [53]. Oba te związki a także dialdehyd malonowy wykazują działanie mutagenne i kancerogenne oraz modulują tempo proliferacji komórek [85]. MDA tworzy kowalencyjne addukty z DNA

i w reakcji z deoksyguanozyną powstaje struktura pirymido- [1,2a]purin-10(3H)-one określana symbolem M1dG, natomiast w reakcji z deoksyadenozyną i deoksycytydyną powstają związki oksopropenylowe, głównie N6-(3-oksopropenyl)deoksyadenozyna. Toksyczny 4-HNE reaguje z deoksynukleozydami, co powoduje zwiększoną ilość mutacji i hamuje syntezę DNA. Ponadto DNA tworzy addukty z innymi produktami peroksydacji lipidów: aldehydem akrylowym, aldehydem krotonowym, etanodiolem (glioksal), tlenkiem etylenu, etenem, propenem, 4-hydroksyheksenalem (4-HHE) [141].

### 1.8. Resweratrol i jego pochodna 3,4,5, 4' – tetrametoksytylben (DMU-212)

Resweratrol (3, 4', 5 – trihydroksytylben) to naturalnie występująca fitoaleksyna, obecna przede wszystkim w winogronach, czerwonym winie, jagodach i orzechach ziemnych. Związek ten wykazuje szereg różnych korzystnych właściwości, w tym przeciwutleniające, przeciwnowotworowe [7] i przeciwmutagenne [142]. Resweratrol wykazuje działanie plejotropowe wywierając korzystny wpływ na wiele szlaków przekazywania sygnału związanych z powstawaniem nowotworu [7]. Efekty biologiczne resweratrolu *in vivo* są mocno ograniczone, co wynika ze słabej biodostępności oraz szybkiego usuwania z ustroju [6]. Z tego względu badania naukowe skierowane zostały na poszukiwanie pochodnych resweratrolu wykazujących wyższą aktywność biologiczną i posiadających lepsze parametry farmakokinetyczne. Jedną z pochodnych resweratrolu o obiecujących właściwościach jest *trans* 3, 4, 5, 4' – tetrametoksytylben (DMU-212). Zablokowanie grup hydroksylowych w strukturze resweratrolu grupami metylowymi i dodanie jednej grupy metoksylowej w pozycji 4 pierścienia fenylowego spowodowało brak podatności tego analogu na reakcje sprzęgania z kwasem siarkowym i glukuronowym oraz zwiększenie lipofilności, czego następstwem jest wzrost biodostępności [143].

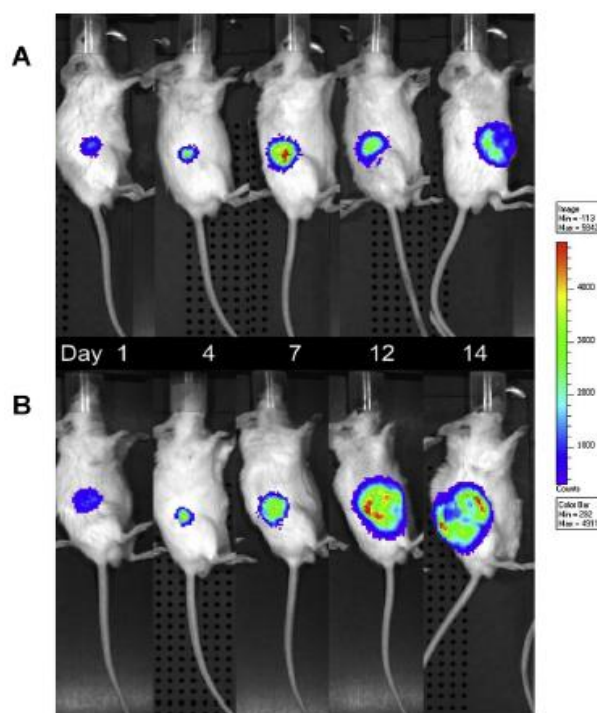


Ryc. 1.16. Wzór cząsteczki resweratrolu (A) i DMU-212 (B)

DMU-212 wywiera silniejsze działanie antyproliferacyjne i działanie proapoptotyczne niż związek macierzysty w komórkach raka jajnika *in vitro* [7], hamuje też wzrost komórek raka okrężnicy, prostaty czy wątrobowokomórkowego [144]. Potwierdzono również wyższą od resweratrolu cytotoksyczność DMU-212 wobec komórek raka jelita grubego, raka płuc, związaną z indukcją apoptozy [144], jak również raka piersi linii estrogenozależnej MCF-7 oraz estrogenoniezależnej MDA-MB-435 [2]. Wykazano także hamujący wpływ na wzrost transformowanych fibroblastów oraz komórek raka szyjki macicy i sutka [6].

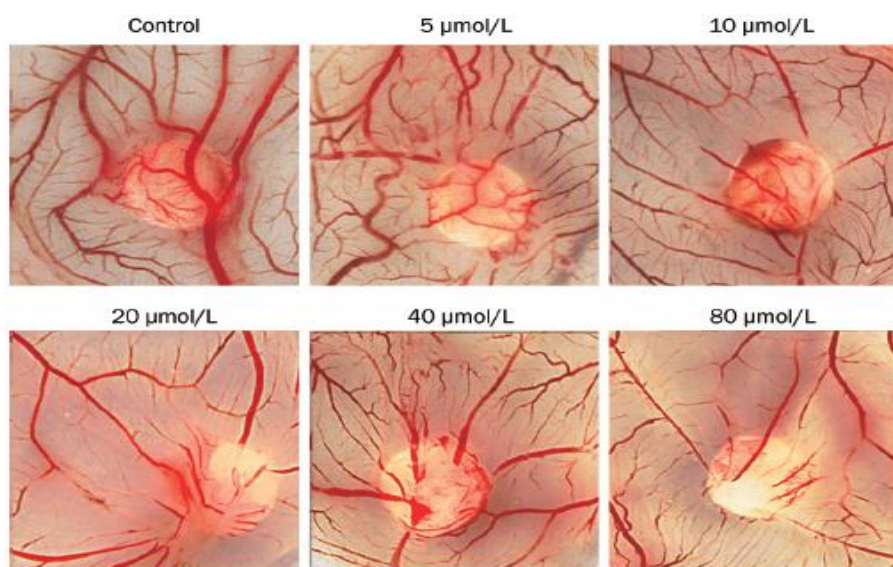
Związek ten wykazuje zdolność do modulowania ścieżek sygnałowych procesów inicjacji i promocji – tę samą własność wykazuje resweratrol, przy czym DMU-212 charakteryzuje się większą dostępnością biologiczną. Z tego względu może on być lepszym środkiem chemoprewencyjnym [7]. Działanie antyproliferacyjne DMU-212 opiera się na kilku mechanizmach, w tym obniżeniu ekspresji enzymów katalizujących aktywację kancerogenów, zatrzymaniu cyklu komórkowego, indukcji apoptozy [6].

Właściwości przeciwnowotworowe DMU-212 potwierdzono w modelu zwierzęcym. Stosując technikę ksenograftów wykazano hamujący wpływ związku na rozwój guza u myszy SCID (z wrodzonym defektem odporności), którym wstrzyknięto komórki ludzkiego raka jajnika (ryc. 1.17) [6].



Ryc. 1.17. Zmiany w rozwoju raka u myszy otrzymujących DMU-212 (50 mg/kg m.c.) – grupie A podawano DMU-212, a B – to grupa kontrolna [6]

W patogenezie wielu chorób, istotną rolę odgrywa proces angiogenezy – powstawanie sieci naczyń krwionośnych. Jest to podstawowy proces w przejściu nowotworów ze stanu uśpionego do stanu złośliwego – uważany jest za cechę charakterystyczną raka ponieważ odpowiedzialny jest za inwazję i przerzuty [145]. Komórki śródbłonna są genetycznie stabilne i mniej podatne na lekooporność niż wiele typów komórek, dlatego terapie ukierunkowane na angiogenezę stają się coraz ważniejszym elementem w chemioterapii raka oraz w leczeniu innych schorzeń związanych z angiogenezą [146]. DMU-212 wykazuje duży potencjał antyangiogeniczny, co potwierdziły badania Chen i wsp. (2013) z zastosowaniem komórek śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej (HUVEC). Przedstawiono dowody, że DMU-212 silnie hamuje angiogenezę poprzez blokowanie fosforylacji VEGFR2 (*ang. Vascular endothelial growth factor receptor 2*) oraz przez indukowanie apoptozy w komórkach śródbłonna. DMU-212 znacząco zmniejszał stymulowaną czynnikiem wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) proliferację oraz migrację komórek HUVEC [146]. DMU-212 hamował także tworzenie struktur przypominających naczynia włosowate w warunkach *in vitro*, jak również indukowane przez VEGF wytwarzanie nowego unaczynienia w teście *in vivo*, ze znacznym zmniejszeniem powierzchni naciekających komórek śródbłonkowych CD31-dodatnich oraz nowo powstałych mikronaczyń w błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodka kurzego (ryc. 1.18) [146].



Ryc. 1.18. Efekt działania DMU-212 na błonę kosmówkowo-omoczniową zarodka kury domowej [146]

Sale i wsp. (2004) wykazali, że DMU-212 nie wykazuje działania toksycznego u szczura po podaniu dożylnym w dawce 40 mg/kg oraz po podaniu dożołądkowym w dawce 400 mg/kg. Wyniki obu badań sugerują, że ta pochodna resweratrolu może stanowić obiecujący środek leczniczy w chorobach związanych z angiogenezą [143,146].

Wykazano również, że DMU-212 może być skutecznym środkiem wobec najbardziej śmiertelnej formy raka skóry - ludzkiego czerniaka. Mechanizm działania DMU-212 polega na zatrzymaniu mitozy, indukcji apoptozy i aktywacji zewnątrzkomórkowych kinaz ERK1 / 2 (ang. *extracellular signal-regulated kinases*) białek [147]. DMU-212 hamował też rozwój gruczolaka jelita u myszy *Apc<sup>Min+</sup>* na drodze inhibicji produkcji prostaglandyny E-2 [3].

Obiecującym celem molekularnym w terapii przeciwnowotworowej stały się mikrotubule, a w szczególności wchodząca w ich skład tubulina. Mikrotubule to dynamiczne polimery białkowe cytoszkieletu, obecne we wszystkich komórkach eukariotycznych, zaangażowane w szereg istotnych procesów komórkowych, niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki: nadają i utrzymują jej kształt; odgrywają istotną rolę w trakcie jej podziału; warunkują transport wewnątrzkomórkowy; wpływają na ruch całej komórki. W wielu doniesieniach podkreśla się, że pochodne *trans*-stylbenu stymulują polimeryzację tubuliny [148]. Przedstawiono dowody, że DMU-212 wykazuje efekt stabilizujący mikrotubule w stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$  porównywalny z efektem paklitakselu w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  [2].

Struktura DMU-212 stała się również podstawą do zsyntezowania nowych heteroaromatycznych analogów DMU-212, zawierających ugrupowanie -3,4,5-trimetoksystyrylo przyłączone w pozycji C2 indolu, benzofuranu, benzotiazolu lub benzotiofenu, które poddano ocenie pod względem ich działania przeciwnowotworowego w stosunku do 60 linii ludzkich komórek nowotworowych. Udowodniono, że ugrupowanie *trans*-3,4,5-trimetoksy jest podstawowym elementem strukturalnym warunkującym silną aktywność przeciwnowotworową tych analogów [149].

Wykazano, że DMU-212 ulega biotransformacji do czterech metabolitów: 3'-hydroksy-3,4,5,4'-tetrametoksystylben (DMU-214), 4'-hydroksy-3,4,5-trimetoksystylben (DMU-281), 4-hydroksy-3,5,4'-trimetoksystylben (DMU-291) i 3-hydroksy-4,5,4'-trimetoksystylben (DMU-807) [143]. Najnowsze badania wskazują, że spośród



czterech metabolitów związku macierzystego DMU-214 wykazuje najwyższą aktywność cytotoksyczną wobec linii komórkowych raka jajnika A-2780 i SKOV-3 [150].

### **1.9. Kancerogen zastosowany w eksperymencie**

N-nitrozoaminy są kancerogenami środowiskowymi występującymi w artykułach spożywczych, takich jak wędzone ryby, wędliny, sery, artykuły mleczne, a także w napojach alkoholowych i dymie tytoniowym. Mogą też powstawać w kwaśnym środowisku żołądka z azotanów (III) i amin pochodzących z dodatków do żywności, leków i środków ochrony roślin [151,152].

Reprezentant tej grupy związków N-nitrozodietylamina (NDEA) została uznana przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC) za substancję prawdopodobnie rakotwórczą dla człowieka [153].

NDEA ulega w mikrosomach wątroby aktywacji metabolicznej katalizowanej przez CYP2E1 i reduktazę NADPH. W pierwszym etapie zachodzi hydroksylacja a następnie deetylacja cząsteczki. Powstały produkt ulega przekształceniu do jonu etylokarboniowego, związku elektrofilowego zdolnego do tworzenia adduktów z DNA, co może prowadzić do zainicjowania procesu nowotworowego [16].

Reakcji etylowania w większym stopniu ulegają atomy N<sup>7</sup> i O<sup>6</sup> guaniny w przeciwieństwie do atomu O<sup>4</sup> tyminy. Powstaje także 8-hydroksyguanina, wykorzystywana jako marker oksydacyjnych uszkodzeń DNA [154].

W procesie biotransformacji NDEA powstają reaktywne formy tlenu prowadzące do stresu oksydacyjnego i uszkodzenia najważniejszych makrocząsteczek komórkowych [16,155]. U szczurów NDEA wywołuje głównie uszkodzenia i nowotwory wątroby, co uzasadnia powszechne stosowanie związku, jako modelowego kancerogenu tego narządu [156,157].

W modelach kancerogenezy chemicznej indukowanej przez NDEA stosuje się także wielokrotne podawanie zwierzętom fenobarbitalu (PB), związku o udowodnionych właściwościach promotora procesu nowotworzenia stymulującego namnażanie się komórek [158,159,160].

## 2. CEL PRACY

W etiopatogenezie wielu chorób, w tym nowotworów, istotne znaczenie przypisuje się uszkodzeniom wywołanym przez reaktywne formy tlenu, azotu oraz inne wolne rodniki. Zgodnie z zasadą chemoprewencji przyjmuje się, że stosowanie związków o właściwościach antyoksydacyjnych może zapobiec rozwojowi nowotworu na etapie inicjacji i promocji. Rola przeciwutleniaczy nie ogranicza się do unieczynnienia wolnych rodników, ale obejmuje również mechanizmy indukcji cytoprotekcyjnych białek w komórce, w tym enzymów antyoksydacyjnych, enzymów katalizujących syntezę glutationu i innych zaangażowanych w naprawę uszkodzeń oksydacyjnych.

Celem niniejszej pracy była próba oceny czy istnieje związek pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną pochodnej resweratrolu, 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-212), a jego potencjalnymi właściwościami chemoprewencyjnymi.

Cel ten realizowano stosując model kancerogenezy chemicznej wątroby polegający na podaniu szczurom N-nitrozodietylaminy (NDEA), prooksydanta o właściwościach kancerogennych, oraz fenobarbitalu jako promotora procesu nowotworowego. Oceny wpływu DMU-212 na uszkodzenia wywołane przez NDEA dokonano na podstawie następujących oznaczeń w wątrobie:

- wybrane parametry obrony antyoksydacyjnej oraz markery uszkodzeń oksydacyjnych makrocząsteczek komórkowych
- ekspresja mRNA enzymów antyoksydacyjnych
- ekspresja białek, wczesnych markerów procesu nowotworowego
- aktywność enzymów wskaźnikowych funkcji wątroby w surowicy krwi

Dodatkowo oznaczono wybrane parametry obrony antyoksydacyjnej oraz markery uszkodzeń oksydacyjnych makrocząsteczek komórkowych w nerkach.

### 3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

#### 3.1. Przedmiot badań

Przedmiotem badań był 3,4,5,4'-*trans*-tetrametoksystylben (DMU-212). Związek został zsyntezowany w Katedrze i Zakładzie Technologii Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu [253]. Tożsamość i czystość związku zostały potwierdzone na podstawie analiz metodą NMR i chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową.

#### 3.2. Odczynniki i aparatura

##### Odczynniki:

- Sacharoza (Merck, Polska)
- Chlorek potasu (AppliChem, USA)
- Kwas cytrynowy (POCH, Polska)
- Kwas sulfosalicylowy (POCH, Polska)
- 40% roztwór 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstryny (Bonio Inc., Kanada)
- Zestaw odczynników do oznaczania białka (Pointe Scientific Poland)
- Zestawy odczynników do oznaczania enzymów wątrobowych (Pointe Scientific Poland)
- Zestaw odczynników do oznaczania stężenia grup karbonylowych Biocell PC Test – Protein Karbonyl Enzyme-Assay Kit – test immunoenzymatyczny-ELISA (*ang. Enzyme-linked immunosorbent assay*) (BIOCELL CORPORATION LTD., Nowa Zelandia)
- Zestawy odczynników do przeprowadzenia izolacji RNA i odwrotnej transkrypcji:
  - TRItidy G (Applichem, Niemcy)
  - Chloroform, izopropanol, etanol (POCh, Polska)
  - Quant-iT<sup>TM</sup> RNA Assay Kits (Invitrogen, USA)
  - Zestaw do odwrotnej transkrypcji, w skład którego wchodzi: 5xFirst Strand Buffer, 0,1 M DTT, odwrotna transkryptaza SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase 200 U/ $\mu$ l, inhibitor rybonukleaz Rnase OUT 40 U/ $\mu$ l (Invitrogen, USA)

- Heksamery, oligo-dT, mieszanina deoksyrybonukleotydów dNTP 25mM (Novazym, Polska)
- Odczynnik do przeprowadzenia amplifikacji cDNA: LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics, Niemcy)

Pozostałe odczynniki zastosowane do oznaczeń zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich Poland.

### **Aparatura:**

Homogenizację tkanek przeprowadzono w homogenizatorze IKA Labortechnik T25 basic.

Do otrzymania frakcji subkomórkowych użyto wirówek firmy Janetzki K24 i VAC 602.

Inkubację przeprowadzano w łaźni wodnej firmy AJL LW 102D oraz w termostатовanej wytrząsarce do mikroplitek DTS-4, Sky Line, Ryga Łotwa.

Pomiaru absorbancji dokonywano w spektrofotometrze SHIMADZU UV-160A z przystawką termostatową TCC-250A (temperatura pomiaru 37°C), kuwety o grubości 1cm oraz w czytniku mikroplitek Bio-Tek Instruments, Elx-800, Highland Park, Winooski, Vermont, USA, sterowanego komputerem PC, wyposażonym w oprogramowanie KC Junior v 1.4.1.8.

Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano w aparacie SHU13 (Sigma-Aldrich).

Izolację RNA i odwrotną transkrypcję przeprowadzano z wykorzystaniem probówek 0,2 ml oraz 1,7 ml (Axygen, USA), fluorymetru Qubit™ Fluorometer (Invitrogen, USA) i termobloku TS-100C (Biosan, Łotwa).

Do przeprowadzenia amplifikacji cDNA wykorzystano sondy Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche Diagnostics, Niemcy) oraz termocykler *LightCycler® Instrument 480 Multiwell Plate 96* (Roche Diagnostics, Niemcy) i płytki *LightCycler® 480 Multiwell Plate 96* (Roche Diagnostics, Niemcy).

### **3.3. Zwierzęta doświadczalne**

Do badań użyto 5 grup szczurów samców szczepu Wistar (8 sztuk w grupie) o masie ciała 250g ± 10%. Zwierzęta pochodziły z Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych Katedry Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Podczas eksperymentu zwierzęta przebywały w pomieszczeniu o stałej temperaturze 22 ± 2°C, wilgotności względnej 65 ± 5% i 12-godzinnym cyklu oświetlenia jasno/ciemno o sile 100-200 luxów, w klatkach z tworzywa sztucznego. Zwierzęta były karmione paszą Labofeed H

z nieograniczonym dostępem do wody. Na przeprowadzenie opisanego w pracy doświadczenia uzyskano zezwolenie Lokalnej Komisji Etycznej ds. Badań na Zwierzętach w Poznaniu nr 36/2007.

### 3.4. Układ doświadczenia

Zastosowano model kancerogenezy chemicznej polegający na jednorazowym podaniu szczurom specyficznego kancerogenu wątroby N-nitrozodietylaminy (NDEA) inicjującej proces nowotworowy, który następnie ulega promocji na skutek wielokrotnego podania fenobarbitalu.

Trzem grupom szczurów podano dootrzewnowo N-nitrozodietylaminę (NDEA) w pojedynczej dawce 200 mg/kg masy ciała. Następnie dwie z tych grup otrzymywały dwa razy w tygodniu DMU-212 per os, w dawkach 20 i 50 mg/kg masy ciała przez 16 tygodni. W celu zwiększenia biodostępności badanego związku podawano go zwierzętom w postaci zawiesiny w 40% roztworze 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstryny.

Od drugiego tygodnia doświadczenia w/w grupy otrzymywały wodę do picia zawierającą 0,05% fenobarbitalu (PB) w celu wywołania promocji procesu nowotworowego. Sam związek badany podawano per os jednej grupie szczurów dwa razy w tygodniu w dawce 50 mg/kg m.c. Grupa kontrolna otrzymywała dwa razy w tygodniu 40% roztwór 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstryny (vehiculum) (tabela 3.1) Po zakończeniu eksperymentu zwierzęta usypiano mieszaniną ksylazyny i ketaminy, pobierano krew z serca, wątrobę i nerki do oznaczeń biochemicznych, histopatologicznych oraz immunohistochemicznych.

Tabela 3.1. Schemat doświadczenia

<b>Numer grupy</b>	<b>Rodzaj ekspozycji</b>
<b>1. KONTROLA</b>	<b>vehiculum</b>
<b>2.</b>	<b>DMU-212 (50 mg/kg m.c.)</b>
<b>3.</b>	<b>NDEA + fenobarbital</b>
<b>4.</b>	<b>NDEA/fenobarbital + DMU-212 (20 mg/kg m.c.)</b>
<b>5.</b>	<b>NDEA/fenobarbital + DMU-212 (50 mg/kg m.c.)</b>

Pobraną krew odwirowano w celu uzyskania osocza, w którym następnie oznaczano enzymy wątrobowe. Wątrobę i nerki przemyto 1,18% roztworem chlorku potasu o temperaturze 4°C i odsączono w celu usunięcia resztek krwi. Tkanki podzielono na porcje (1g wątroby i 0,5g nerek) i przechowywano w temp. - 80°C do czasu wykonania oznaczeń. W homogenacie tkanek oznaczono stężenie glutationu zredukowanego, we frakcji cytozolowej - aktywność enzymów antyoksydacyjnych, we frakcji mikrosomalnej – poziom peroksydacji lipidów i aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej.

Fragmenty wątroby przeznaczone do badań immunohistochemicznych utrwalano w płynie Bouina przez 24 godziny, w temperaturze pokojowej a następnie krojono na skrawki o grubości 5µm.

### **3.5. Metodyka badań**

#### **3.5.1. Przygotowanie frakcji subkomórkowych:**

Do odważonych fragmentów tkanek dodawano 50 mM bufor Tris-HCl o pH=7,55 z 0,25 M roztworem sacharozy i homogenizowano.

Homogenat odwirowano w wirówce z chłodzeniem (4°C) przez 20 min przy 10000 obrotów/minutę. Otrzymany nadsącz zawierający frakcję cytozolową przelano do krioprobówek i zamrożono.

Osad przemyto 3ml 1,15% roztworu KCl, poddano homogenizacji i odwirowano przez 45 min przy 40000 obrotów/minutę. Nadsącz odrzucono, osad przemyto 2ml 0,1M buforu fosforanowego z glicerolem o pH=7,4 i zhomogenizowano. Otrzymany homogenat stanowił frakcję mikrosomalną, którą umieszczono w krioprobówkach i zamrożono.

#### **3.5.2. Oznaczanie stężenia glutationu zredukowanego (GSH)**

##### **Zasada oznaczenia:**

Zastosowano metodę Ellmana, polegającą na redukcji kwasu 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzooesowego) (DTNB) przez związki tiolowe do barwnego kwasu 2-nitro-5-merkaptobenzooesowego, którego absorbcję mierzy się przy długości fali  $\lambda = 412$  nm. Oznaczenia wykonano w homogenacie wątroby po uprzednim odbiałczeniu kwasem sulfosalicylowym, ponieważ obecność w strukturze białka grup tiolowych -SH mogłaby wpłynąć na reakcję z DTNB [256].

**Odczynniki:**

- 0,1 M bufor potasowo-sodowo-fosforanowy  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{PO}_4$ , pH=7,4
- 4% kwas sulfosalicylowy
- 0,1 mM kwas 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy) (DTNB)
- 2 mM roztwór glutationu zredukowanego (GSH) w 0,1 M buforze

**Przebieg oznaczenia:**

Przeprowadzono homogenizację 1g tkanki wątrobowej z 3ml buforu fosforanowego oraz 0,5g tkanki nerki z 1,5 ml buforu fosforanowego w temperaturze 4°C. W celu usunięcia białka, do 0,4ml homogenatu dodawano 0,8ml kwasu sulfosalicylowego. Po wytrąceniu białka próby wymieszano, a następnie odwirowano przez 10 min z prędkością 10 000 obrotów/minutę. Do 0,2ml otrzymanego supernatantu dodawano 1,8ml roztworu DTNB w celu uzyskania zabarwienia. Po 60 min mierzono absorbancję powstałego związku kompleksowego przy długości fali  $\lambda=412$  nm. Sporządzono równanie regresji krzywej kalibracji i na jej podstawie wyznaczono stężenie glutationu wyrażone w jednostkach  $\mu\text{mol GSH/g}$  tkanki. Do krzywej kalibracji wykorzystano 2 mM roztwór GSH w buforze.

**3.5.3. Oznaczanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych we frakcji cytozolowej wątroby i nerek****3.5.3.1. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)****Zasada oznaczania:**

Zasada metody opiera się na reakcji utleniania adrenaliny do adrenochromu w środowisku zasadowym, a produktem pośrednim jest anionorodnik ponadtlenkowy. Szybkość hamowania reakcji utleniania adrenaliny jest wyznacznikiem aktywności SOD, która rozkłada anionorodnik w środowisku reakcji. Pomiaru zmian absorbancji dokonuje się przy długości fali  $\lambda=320$  nm [257].

**Odczynniki:**

- 50 mM bufor węglanowy, pH=10,2 zawierający 0,1 mM EDTA
- 10 mM roztwór chlorowodoru adrenaliny w 20 mM roztworze HCl
- 100 U/ml roztwór dysmutazy ponadtlenkowej w buforze – do wykonania krzywej kalibracji

### **Przebieg oznaczania:**

Przed wykonaniem oznaczenia roztwory buforu węglanowego i chlorowodoru adrenaliny umieszczono w łaźni wodnej w temperaturze 37°C. Do kuwet kwarcowych odmierzano 10µl frakcji cytozolowej wątroby lub nerek rozcieńczonej solą fizjologiczną w stosunku 1:10, następnie 80µl roztworu chlorowodoru adrenaliny i uzupełniono buforem węglanowym do objętości 3ml. Składnikiem, który zapoczątkował reakcję był roztwór chlorowodoru adrenaliny. Szybkość zmian absorbancji przy długości fali  $\lambda=320$  nm jest miarą hamowania reakcji utleniania adrenaliny. Pomiary rozpoczęto w 180 sekundzie przebiegu reakcji i kontynuowano przez okres 60 sekund. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej wyznaczono w oparciu o równanie krzywej wzorcowej i wyrażono w jednostkach  $U \times mg^{-1}$  białka. Krzywą kalibracji uzyskano wykorzystując handlowy preparat dysmutazy ponadtlenkowej.

### **3.5.3.2. Oznaczanie aktywności katalazy (CAT)**

#### **Zasada oznaczania:**

Oparta jest na pomiarze szybkości rozkładu nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) przez enzym. Do oznaczenia aktywności wykorzystuje się spadek absorbancji  $H_2O_2$  mierzony przy długości fali  $\lambda=240$  nm [247].

#### **Odczynniki:**

- 50 mM bufor potasowo-fosforanowy  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH=7,0
- 54 mM roztwór nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) w 50 mM buforze, pH=7,0 sporządzony bezpośrednio przed użyciem

#### **Przebieg oznaczania:**

Do oznaczeń używano kuwet kwarcowych o grubości 1cm, a odczynniki były termostatowane w łaźni wodnej w temp. 37°C.

Próbki cytozolu wątroby lub nerek rozcieńczano roztworem soli fizjologicznej w stosunku 1:10. Do kuwety wprowadzono 10µl frakcji cytozolowej, a następnie 3ml roztworu  $H_2O_2$  w buforze fosforanowym i umieszczano w łaźni wodnej w temp. 37°C. Po wymieszaniu dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali  $\lambda=240$  nm po upływie 60 sekund. Za jednostkę aktywności przyjęto taką ilość enzymu, która w ciągu 60 sekund rozkłada 1µmol nadtlenu wodoru, czyli powoduje spadek absorbancji  $H_2O_2$



o 0,0145 jednostki w czasie 60 sekund w objętości 3ml, w kuwecie o grubości 1cm. Aktywność enzymu wyrażona została w jednostkach  $U \times mg^{-1}$  białka.

### 3.5.3.3. Oznaczanie aktywności peroksydazy glutationowej ( $GP_x$ )

#### Zasada oznaczania:

Stosowano metodę pośrednią, w której wykorzystuje się katalizowaną przez enzym reakcję pomiędzy glutationem a  $H_2O_2$ . Powstały disulfid glutationu jest redukowany przez reduktazę glutationową (GR) kosztem utlenienia NADPH. Spadek absorbancji NADPH mierzy się przy długości fali  $\lambda=340$  nm [252].

#### Odczynniki:

- 50 mM bufor potasowo-fosforanowy  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH=7,0 zawierający 1 mM EDTA
- 1 mM roztwór azydki sodu ( $NaN_3$ ) w 50mM buforze fosforanowym, pH=7,0
- 1 U/ml roztwór reduktazy glutationowej (GR) w wodzie destylowanej
- 0,2 mM roztwór NADPH w 1% roztworze wodorowęglanu sodu ( $NaHCO_3$ )
- 1 mM roztwór glutationu (GSH) w 50mM buforze fosforanowym, pH=7,0
- 1,5 mM roztwór nadtlenku kumenu (CHPO) w buforze fosforanowym, pH=7,0

#### Przebieg oznaczenia:

Do oznaczenia używano kuwety spektrofotometrycznej wykonanej z optycznego polistyrenu (PS), a odczynniki termostatowano w łaźni wodnej w temp.  $37^\circ C$ . Do kuwety dodano odczynniki w następującej kolejności: 500 $\mu$ l buforu fosforanowego, następnie po 100 $\mu$ l roztworu  $NaN_3$ , roztworu GR, roztworu NADPH, roztworu GSH oraz 10 $\mu$ l frakcji cytozolowej wątroby (rozcieńczonej roztworem soli fizjologicznej w stosunku 1:10) lub 5 $\mu$ l frakcji cytozolowej nerek (nierozcieńczonej), a na koniec 100 $\mu$ l roztworu CHPO, który rozpoczynał reakcję. Dokonano pomiaru spadku absorbancji w ciągu 60 sekund, przy długości fali  $\lambda=340$  nm. Aktywność enzymu została wyrażona w jednostkach aktywności enzymu U w przeliczeniu na 1mg białka [ $U \times mg^{-1}$  białka]. Jako jednostkę aktywności przyjmuje się taką ilość enzymu, która w ciągu 1 minuty utlenia 1 $\mu$ mol GSH (0,5  $\mu$ mol NADPH). Przyjęto milimolowy współczynnik absorpcji dla NADPH przy  $\lambda=340$  nm równy  $\varepsilon=6,22$   $mmol^{-1} \times 1 \times cm^{-1}$ .

### 3.5.3.4. Oznaczanie aktywności reduktazy glutationowej (GR)

#### Zasada oznaczenia:

Reduktaza glutationowa jest katalizatorem reakcji redukcji utlenionego glutationu (GSSG) w obecności NADPH, który ulega utlenieniu i przemianie w NADP<sup>+</sup>. Wielkością mierzoną jest spadek absorpcji światła o długości fali  $\lambda=340$  nm [252].

#### Odczynniki:

- 0,1 M bufor potasowo-fosforanowy K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,6
- 0,1 mM roztwór NADPH w 0,1 M buforze fosforanowym
- 0,5 mM roztwór EDTA w 0,1 M buforze fosforanowym
- 1 mM roztwór glutationu utlenionego (GSSG) w 0,1 M buforze fosforanowym

#### Przebieg oznaczenia:

Do oznaczenia używano kuwety spektrofotometrycznej o grubości 1cm wykonanej z optycznego polistyrenu (PS), odczynniki termostatowano w łaźni wodnej w temp. 37°C. Do kuwety dodawano następujące objętości odczynników w określonej kolejności:

#### Wątroba (cytozol rozcieńczony roztworem soli fizjologicznej 1:10)

- Dla grupy kontrolnej: 755μl buforu fosforanowego, 30μl roztworu NADPH, 100μl roztworu EDTA, 100μl roztworu GSSG, 15μl frakcji cytoplazmatycznej, która inicjowała reakcję.
- Pozostałe próby sporządzono przez zmieszanie 850μl buforu fosforanowego, 20μl roztworu NADPH, 50μl roztworu EDTA, 50μl roztworu GSSG, oraz 25μl frakcji cytoplazmatycznej, która inicjowała reakcję.

#### Nerki

- 730μl buforu fosforanowego, 40μl roztworu NADPH, 100μl roztworu EDTA, 100μl roztworu GSSG, 25μl nierozcieńczonej frakcji cytozolowej, która inicjowała reakcję.

Dokonano pomiaru spadku absorbancji w ciągu 60 sekund, przy długości fali  $\lambda=340$  nm.

Aktywność enzymu została wyrażona w jednostkach aktywności U w przeliczeniu na 1mg białka [U x mg<sup>-1</sup> białka]. Jako jednostkę aktywności przyjmuje się taką ilość

enzymu, która w ciągu 1 minuty utlenia 1  $\mu\text{mol}$  NADPH. Przyjęto milimolowy współczynnik absorpcji dla NADPH przy  $\lambda=340$  nm równy  $\varepsilon=6,22 \text{ mmol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$ .

### **3.5.3.5. Oznaczanie aktywności S-transferazy glutationowej (GST)**

#### **Zasada oznaczania:**

S-transferaza glutationowa katalizuje reakcję pomiędzy glutationem a 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem, w wyniku której powstaje barwny koniugat. Szybkość powstawania koniugatu mierzy się spektrofotometrycznie [252].

#### **Odczynniki:**

- 0,1 M bufor sodowo-fosforanowy  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH=6,5
- 20 mM roztwór glutationu (GSH) w 0,1 M buforze fosforanowym
- 20 mM roztwór 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) w 95% alkoholu etylowym

#### **Przebieg oznaczenia:**

Do oznaczenia używano kuwety spektrofotometrycznej o grubości 1cm wykonanej z optycznego polistyrenu (PS), a odczynniki termostatowano w łaźni wodnej w temp. 37°C. Do kuwety dodano 898  $\mu\text{l}$  buforu fosforanowego, następnie 50  $\mu\text{l}$  roztworu GSH oraz 15  $\mu\text{l}$  frakcji cytozolowej wątroby (rozcieńczonej roztworem soli fizjologicznej w stosunku 1:10) lub 5  $\mu\text{l}$  frakcji cytozolowej nerek (nierozcieńczonej), a na koniec 50  $\mu\text{l}$  roztworu CHPO, który rozpoczynał reakcję. Dokonano pomiaru spektrofotometrycznego w ciągu 60 sekund, przy długości fali  $\lambda=340$  nm.

Za jednostkę aktywności przyjęto taką ilość enzymu, która w ciągu 1 minuty katalizuje formowanie się 1  $\mu\text{mol}$  barwnego koniugatu (2,4-dinitrofenylo-S-glutationu). Przyjęto milimolowy współczynnik absorpcji dla powstającego koniugatu przy  $\lambda=340$  nm równy  $\varepsilon=9,6 \text{ mmol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$ .

### **3.5.3.6. Oznaczanie aktywności oksydoreduktazy NADP(H):chinon (NQO1)**

#### **Zasada oznaczania:**

Oznaczenie aktywności enzymu polegało na pomiarze redukcji 2,6-dichloroindolofenolu w obecności NADPH przy długości fali  $\lambda=600\text{nm}$  [248].

### **Odczynniki:**

- 50 mM bufor Tris-HCl, pH=7,4
- 0,07% roztwór albuminy krystalicznej z surowicy bydlęcej w 50 mM buforze
- 0,01% roztwór Tween 20 (Polisorbat 20) w 50 mM buforze
- 0,005 mM dinukleotyd flawinowy (FAD)
- 2 mM roztwór NADPH
- 0,01 mM roztwór dikumarolu
- 0,04 mM roztwór 2,6-dichloroindofenolu (DCIP)

### **Przebieg oznaczania:**

Do oznaczenia używano kuwety spektrofotometrycznej o grubości 1cm wykonanej z optycznego polistyrenu (PS), a odczynniki termostatowano w łaźni wodnej w temp. 37°C.

#### ➤ **frakcja cytozolowa wątroby**

Do kuwety dodano następujące odczynniki: 100µl roztworu albuminy, 15µl roztworu Tween 20, 1010 µl buforu Tris-HCl, 100µl roztworu FAD, 100µl roztworu NADPH, 100µl roztworu dikumarolu (do próby ślepej zamiast dikumarolu dodano 100µl buforu Tris-HCl) oraz frakcję cytozolową w objętości odpowiadającej 0,2 – 0,4mg białka, a na koniec 140µl roztworu DCIP, który jako akceptor elektronów inicjował reakcję.

#### ➤ **frakcja cytozolowa nerek**

Do kuwety dodano następujące odczynniki: 200µl roztworu albuminy, następnie 30µl roztworu Tween 20, 2050 µl buforu Tris-HCl, 200µl roztworu FAD, 200µl roztworu NADPH, 200µl roztworu dikumarolu (do próby ślepej zamiast dikumarolu dodano 200µl buforu Tris-HCl) oraz frakcję cytozolową w objętości odpowiadającej 0,2 – 0,4mg białka, a na koniec 100µl roztworu DCIP, który jako akceptor elektronów inicjował reakcję.

Dokonano pomiaru spektrofotometrycznego w ciągu 60 sekund od momentu rozpoczęcia reakcji przy długości fali  $\lambda=600$  nm w temp. 37°C. Miarą aktywności była ta część enzymu, która była hamowana przez dikumarol. Aktywność enzymu wyrażono w molach powstałego zredukowanego 2,6-dichloroindolofenolu  $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  białka.

### 3.5.3.7. Oznaczanie aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PD)

#### Zasada oznaczania:

Aktywność enzymu oznaczono na podstawie pomiaru przyrostu stężenia NADPH przy długości fali  $\lambda=340$  nm [254].

#### Odczynniki:

- 0,1 M bufor trietanolaminy TEA-HCl, pH=7,6
- 0,1 M roztwór chlorku magnezu ( $MgCl_2$ )
- 0,03 M roztwór glukozy-6-fosforanu
- 13 mM NADP

#### Przebieg oznaczania:

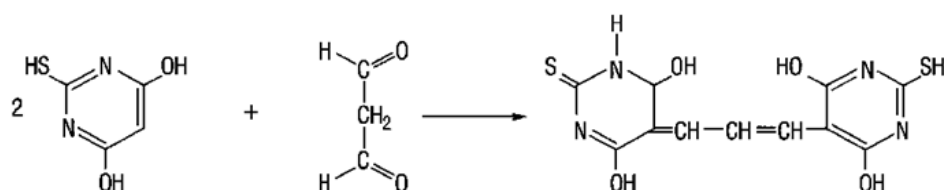
Do kuwety z optycznego polistyrenu dodawano: 2,5ml buforu TEA-HCl (oznaczanie w wątrobie) lub 2,35 ml buforu TEA-HCl (oznaczanie w nerkach), 200 $\mu$ l roztworu  $MgCl_2$ , 100 $\mu$ l roztworu glukozy-6-fosforanu oraz 100 $\mu$ l roztworu NADP. Zawartość kuwety mieszano i inkubowano przez 5 minut w temp. 37°C. Reakcję inicjowało dodanie zawiesiny mikrosomów w ilości 50 $\mu$ l (wątroba) lub 250 $\mu$ l (nerki). Absorbancję mierzono przez 3 minuty przy długości fali  $\lambda=340$  nm.

### 3.5.4. Oznaczanie markerów uszkodzeń oksydacyjnych

#### 3.5.4.1. Oznaczanie poziomu peroksydacji lipidów (LPO)

#### Zasada oznaczania:

Poziom peroksydacji lipidów oceniano na podstawie stężenia aldehydu dimalonowego (MDA), produktu rozkładu hydroperoksy kwasów tłuszczowych. W metodzie tej wykorzystuje się reakcję MDA z kwasem tiobarbiturowym (TBA), w wyniku której powstaje barwny addukt oznaczany spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda = 532$  nm [255] (ryc. 3.1).



Ryc. 3.1. Reakcja dialdehydu malonowego z kwasem tiobarbiturowym [23]

### **Odczynniki:**

- 150 mM bufor Tris-HCl pH=7,4
- 0,01 mM roztwór siarczanu(VI) żelaza(II) (FeSO<sub>4</sub>)
- 0,05 mM roztwór kwasu L(+)-askorbinowego
- Odczynnik TCA-HCl-TBA-BHT (HTBT) – przygotowany *ex tempore*

Odczynnik HTBT sporządzono poprzez zmieszanie 16,8g kwasu trichlorooctowego (TCA), 100ml 0,125 M kwasu solnego (HCl), 0,416g kwasu tiobarbiturowego (TBA) oraz etanolowego roztworu butylohydroksytoluenu (BHT) otrzymanego przez rozpuszczenie 0,015g BHT w 10 ml 96% alkoholu etylowego. Całość na 10 min umieszczono w ultrapłuczce.

### **Przebieg oznaczenia:**

#### Etap I - Stymulacja

1. Peroksydacja endogenna – nieindukowana

Próba składała się z frakcji mikrosomalnej zawierającej 1,5mg białka oraz takiej ilości buforu Tris-HCl, aby końcowa objętość próby wynosiła 1500  $\mu$ l. Następnie przeprowadzono 60 min inkubację w temperaturze 37°C.

2. Peroksydacja stymulowana nieenzymatycznie przy pomocy układu Fe<sup>2+</sup>/askorbinian

Próba składała się z odpowiedniej objętości buforu Tris-HCl, frakcji mikrosomalnej zawierającej 1mg białka, 15  $\mu$ l 0,05 mM roztworu kwasu L(+)-askorbinowego i poddana została preinkubacji przez 2 minuty w temperaturze 37°C. Następnie dodano 15  $\mu$ l 0,01 mM roztworu FeSO<sub>4</sub>, który zainicjował reakcję peroksydacji i próbę inkubowano przez 60 min w temperaturze 37°C.

#### Etap II - oznaczanie produktów peroksydacji

Po przeprowadzonej inkubacji do każdej próby dodano po 2ml mieszaniny HTBT. Próby ogrzewano 15min w łaźni wodnej w temp. 90°C. Mieszaninę oziębiono, a powstały osad odwirowano przez 10 min przy prędkości 5000 obrotów/minutę i zmierzono absorbancję klarownego nadsącza przy długości fali  $\lambda$ = 532 nm.

Zawartość MDA została obliczona w oparciu o molowy współczynnik absorbancji dla  $\lambda$ = 532 nm, równy  $\epsilon$ = 1,56 x 10<sup>5</sup> mmol<sup>-1</sup> x 1 x cm<sup>-1</sup>. Ponieważ z kwasem tiobarbiturowym reagują oprócz MDA również inne produkty peroksydacji lipidów (TBARS; ang. *thiobarbituric acid reactive substances*), przyjęto wyrażanie

poziomu peroksydacji lipidów w jednostkach TBARS [nmol TBARS x min<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup> białka].

#### **3.5.4.2. Oznaczanie stężenia grup karbonylowych w wątrobie**

##### **Zasada oznaczenia:**

Oznaczenia wykonano metodą immunoenzymatyczną stosując komercyjny zestaw odczynników [249].

##### **Odczynniki:**

- Biocell PC Test – Protein Karbonyl Enzyme-Assay Kit – test immunoenzymatyczny-ELISA (*ang. Enzyme-linked immunosorbent assay*) firmy BIOCELL CORPORATION LTD.

##### **Przebieg oznaczenia**

Fragmenty wątroby (0,5g) homogenizowano w 2,5 ml 50 mM buforu sodowo-fosforanowego (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) o pH=6,7 w temp. 4°C.

Oznaczenie zostało wykonane zgodnie z procedurą opisaną przez producenta. Wykonanie testu rozpoczyna się od izolacji oksydacyjnie zmodyfikowanych białek obecnych w homogenacie przy użyciu dinitrofenylohydrazyny (DNP). Powstały kompleks po naniesieniu na płytkę ELISA zostaje zaadsorbowany na ściankach studzienek. Następnie substancje niebiałkowe oraz niezwiązana DNP ulegają wymywaniu ze studzienek, a do zaadsorbowanych białek dodaje się przeciwciało anti-DNP, a w kolejnym etapie peroksydazę chrzanową związaną ze streptawidyną. Następnie dodawany jest odczynnik tworzący barwny produkt i na koniec odczynnik hamujący reakcję<sup>1</sup>. Zmianę barwy mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda=450$  nm. Stężenie grup karbonylowych białek obliczono przy pomocy równania regresji krzywej kalibracji i wyrażono w jednostkach nmol/mg białka.

#### **3.5.4.3. Badanie uszkodzeń DNA metodą elektroforezy kometowej (Commet Assay, SCGE)**

##### **Zasada oznaczania:**

Metoda Commet Assay (*ang. single cell gel electrophoresis*) służy do pomiaru poziomu jednoniciowych i dwuniciowych pęknięć DNA oraz umożliwia pośrednią

---

<sup>1</sup> Skład odczynników nie został podany przez producenta.

ocenę potencjału naprawczego komórki. Polega na elektroforetycznym rozdziale jądrowego DNA, co umożliwia monitorowanie fragmentacji DNA. Komórki umieszcza się na szkiełku mikroskopowym w roztworze agarozy i przeprowadza się lizę alkaliczną powodującą uwolnienie DNA z jądra komórkowego. Kolejnym etapem jest przeprowadzenie elektroforezy w środowisku alkalicznym, w trakcie której DNA migruje w kierunku anody. Prędkość migracji uwarunkowana jest stopniem jego fragmentacji. Po zakończonym rozdziale preparat z DNA poddawany jest neutralizacji, a następnie barwieniu fluorescencyjnemu. Ostatnim etapem jest analiza mikroskopowa z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego sprzężonego z cyfrowym aparatem fotograficznym i komputerem. Obraz mikroskopowy wyglądem przypomina komętę, której „głowę” stanowi nieuszkodzony DNA unieruchomiony przed lizą, natomiast w świecącym „ogonie” zawarte są przerwane nici DNA uwolnione ze struktur jądrowych wskutek działania pola elektromagnetycznego [246].

#### **Odczynniki:**

- Buforowany roztwór sacharozy, pH 7,55 o składzie:
    - 250 mmol/l sacharoza
    - 50 mmol/l Tris
    - 25 mmol/l KCl,
    - 100 mmol/l MgCl<sub>2</sub>,
  - 1% roztwór wodny agarozy przyczepnej o normalnej temperaturze topnienia (NMP)
  - 1% roztwór agarozy o niskiej temperaturze topnienia (LMP) w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS)
  - Bufor do lizy pH=8,0 chłodzony przed użyciem o składzie:
    - 100mM Na<sub>2</sub>EDTA (32,7 g/l)
    - 2,5M NaCl (146,1 g/l)
    - 10mM Tris-HCl (1,211 g/l)
- Bezpośrednio przed użyciem zmieszano 89ml buforu z:
- 10ml 10% sulfotlenku dimetylu (DMSO)
  - 1ml 1% Triton X-100
- Bufor rozwijająco-elektroforetyczny (alkaliczny) pH>13,0 o składzie:
  - 300mM NaOH (12 g/l)



- 1mM Na<sub>2</sub>EDTA (0,322 g/l)
- Bufor do neutralizacji o pH=7,5 o składzie:
  - 0,4M Tris-HCl (48,44 g/l)
- 0,05 mg/ml roztwór bromku etydyny

### **Przebieg oznaczania:**

Skrawki wątroby homogenizowano w buforowanym roztworze sacharozy, pH 7,55 w proporcji 1 g tkanki na 2 ml buforu. Oznaczenia wykonano według przedstawionego niżej opisu.

#### 1. Przygotowanie szkiełek mikroskopowych:

Szkiełka mikroskopowe podstawowe pokryto 1% agarozą i wysuszono. Na suche szkiełka nałożono warstwę 1% agarozy NMP i przykryto szkiełkiem nakrywkowym. Po zestaleniu agarozy (ok. 10 min w +4°C) zdjęto szkiełka nakrywkowe i nałożono warstwę zawierającą homogenat zmieszany z agarozą o niskiej temp. topnienia, ponownie zakryto szkiełkiem nakrywkowym. Po zestaleniu warstwy agarozowej szkiełka nakrywkowe usunięto.

#### 2. Liza komórek:

Szkiełka podstawowe zanurzono na 1 godzinę w świeżo przygotowanym, wychłodzonym buforze lizującym, co spowodowało rozpad komórek.

#### 3. Rozwijanie nadskręconego DNA i elektroforeza:

Po przeprowadzonej lizie szkiełko umieszczono na 40 min. w aparacie do elektroforezy od strony anody, napełnionym świeżym, wychłodzonym buforem rozwijająco-elektroforetycznym, w celu rozwinięcia nadskręconego (ang. *supercoiled*) DNA. Elektroforezę prowadzono w temperaturze 4°C przez 20 minut przy 300 mA.

#### 4. Neutralizacja:

Po zakończeniu elektroforezy szkiełka umieszczono na 5 min. w wychłodzonym buforze do neutralizacji, przemywanie powtarzano 3x, używając świeżych porcji buforu, w celu usunięcia pozostałości detergentów i zasadowego buforu elektroforetycznego.

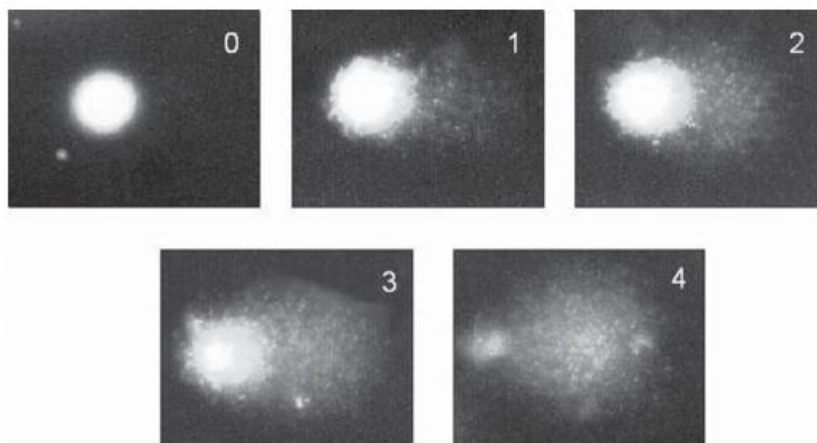
#### 5. Barwienie DNA:

Preparaty wybarwiono wodnym roztworem bromku etydyny (o stężeniu 5 mg/ml, który przed użyciem został rozcieńczony 100-krotnie wodą destylowaną) i oceniono pod mikroskopem fluorescencyjnym.

## 6. Analiza i obliczanie wyników:

Dla każdej próby oceniono 100 kolejnych „komet”, przyporządkowując do jednej z 5 klas, w zależności od stopnia uszkodzenia DNA (ryc. 3.2).

Wynik badania stanowi sumę arbitralnych punktów uzyskanych z przemnożenia numeru klasy przez liczbę „komet” w danej klasie.



Ryc. 3.2. Typowe przykłady komet z danej klasy i odpowiadające im zakresy uszkodzeń DNA [174]

### 3.5.5. Określanie ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne w wątrobie

#### 3.5.5.1. Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja

##### Zasada izolacji RNA:

Całkowity RNA izolowano według zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego i Sacchi. Izolacja opiera się na ekstrakcji mieszaniną zawierającą fenol, izotiocyanian guanidyny i chloroform. Stężenie RNA oznacza się fluorymetrycznie [250].

##### Odczynniki:

- TRIityd G (Applichem, Niemcy),
- chloroform, izopropanol, etanol (POCh, Polska),
- Quant-iT™ RNA Assay Kits (Invitrogen, USA),
- Zestaw do odwrotnej transkrypcji (Invitrogen, USA), w skład którego wchodzi:
  - 5-krotnie stężony bufor First Strand Buffer,
  - 0,1 M ditiotretitol (DTT),
  - odwrotna transkryptaza SuperScript™ II Reverse Transcriptase 200 U/μl,

- inhibitor rybonukleaz Rnase OUT 40 U/ $\mu$ l
- heksamery, oligo-dT, mieszanina deoksyrybonukleotydów dNTP 25mM (Novazym, Polska).

#### **Sprzęt:**

- probówki 0,2 ml oraz 1,7 ml (Axygen, USA),
- Qubit<sup>TM</sup> Fluorometer (Invitrogen, USA),
- termoblok TS-100C (Biosan, Łotwa).

#### **Przebieg izolacji RNA:**

Skrawki wątroby homogenizowano w 1ml TRI reagent i dodano 1ml odczynnika lizującego TRIityd G zawierającego fenol i izotiocyanian guanidyny. Następnie do prób dodano 200 $\mu$ l chloroformu, energicznie wytrząsano i inkubowano 5 minut na lodzie, po czym wirowano w temperaturze 4°C przez 15 minut z prędkością 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). W kolejnym etapie izolacji pobierano 500  $\mu$ l fazy wodnej i przenoszono do nowych probówek. RNA wytrącano przez dodanie izopropanolu w stosunku objętościowym 1:1. Próby mieszano i umieszczano w temperaturze -80°C. Po upływie 24 godz. wytrącony RNA wirowano w temperaturze 4°C przez 15 minut z prędkością 15000xg. Następnie usuwano supernatant, a powstały osad RNA przemywano dwukrotnie schłodzonym 75% etanolem, po czym wirowano w temperaturze 4°C przez 15 minut z prędkością 15000xg. Po usunięciu alkoholu etylowego osad RNA osuszono i rozpuszczono w 20  $\mu$ 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  $\mu$ g całkowitego RNA. Stężenie RNA oznaczano fluorometrycznie z wykorzystaniem zestawu Quant-iT<sup>TM</sup> RNA Assay Kits.

#### **Przebieg odwrotnej transkrypcji:**

Całą procedurę wykonywano w komorze laminarnej na lodzie. Do 1  $\mu$ g RNA dodawano 4  $\mu$ l 2,5 mM dNTP, 0,5 $\mu$ l oligo(dT) oraz 0,5 $\mu$ l losowych heksamerów. Próby mieszano, wirowano i inkubowano w termobloku TS-100C w temperaturze 65°C przez 5 minut w celu denaturacji RNA. Następnie próby wirowano, umieszczano na lodzie na

ok. 2 minuty i dodawano następujące odczynniki: 4 µl pięciokrotnie stężonego buforu First Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT, 0,5 µl odwrotnej transkryptazy SuperScript™ II Reverse Transcriptase 200 U/µl oraz 0,25 µl inhibitora rybonukleaz RNase OUT 40 U/µl. Próby wytrząsano, a następnie krótko wirowano i umieszczano w termobloku.

Syntezę cDNA przeprowadzano w czasie 50 minut w temperaturze 37°C. W celu zatrzymania reakcji próby inkubowano przez 15 min. w temp. 65°C. Uzyskany cDNA służył jako matryca do reakcji łańcuchowej polimerazy RT-qPCR.

### **3.5.5.2. Amplifikacja cDNA za pomocą metody RT-qPCR (ang. Real-time quantitative PCR)**

#### **Zasada oznaczenia:**

RT-qPCR jest metodą stosowaną wówczas, gdy materiałem wyjściowym jest RNA. Pierwszym etapem jest synteza cDNA komplementarnego do matrycy mRNA przy zastosowaniu odwrotnej transkryptazy. Metoda ta pozwala na stałe monitorowanie ilości amplifikowanego DNA na podstawie pomiaru sond lub barwników wprowadzonych do reakcji, które w wyniku połączenia się z powielanym DNA, emitują fluorescencję proporcjonalnie do ilości powstającego w czasie trwania reakcji produktu PCR [251]. Pomiaru można dokonać w sposób względny w stosunku do genu o stałej ekspresji, tzw. genu referencyjnego (ang. *housekeeping gene*, *HKG*), którym może być dowolny gen charakteryzujący się jednolitą ekspresją w różnych stadiach życia komórki [258].

#### **Odczynniki:**

- LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics, Niemcy) zawierający:
  - Bufor reakcyjny
  - 6,4 mM MgCl<sub>2</sub>
  - Mieszaninę deoksyrybonukleotydów dNTP
  - Polimerazę DNA Fast Start Taq

#### **Startery**

Przygotowano w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN, Warszawa. W tabeli zestawiono sekwencje starterów wykorzystanych w niniejszych badaniach.

## Sondy

- Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche Diagnostics, Niemcy) (tabela 3.2)

## Sprzęt

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

Tabela 3.2. Startery i sondy wykorzystane w reakcji RT-qPCR

Gen	Sekwencja (kierunek 5'→3')	Sekwencja (kierunek 3'→5')	Numer sondy (Roche)	Numer katalogowy sondy
Sod2	gcattttctggacaaacctga	ctccagcaactctcctttgg	#22	cat.no. 04686969001
Cat	cacctgaaggaccctgacat	tgatggagagactctggacaaa	#95	cat.no. 04692128001
Gpx1	cgacatcgaaccgatataga	atgccttaggggttgctagg	#56	cat.no. 04688538001
Gsr	gctttgattcactcatcagttcc	tgagaacttcttaactgtgagaacct	#17	cat.no. 04686900001
Nqo1	agcgcttgacactacgatcc	caatcagggctcttctcacc	#50	cat.no. 04688112001
G6pd	tgtagctggccagtatgatga	gcattcatgtggctgttgag	#75	cat.no. 04688988001
Akt1	gtgctgaggagatggaggtg	aactcgttcatggtcacacg	#117	cat.no. 04693515001
Gapd	ctctgctcctctgttcgac	acgaccaaatccggttgactc	#60	cat.no. 04688589001

## Przebieg oznaczenia:

Zmieniony poziom ekspresji wytypowanych genów został potwierdzony techniką RT-qPCR za pomocą aparatu LightCycler 480 oraz oprogramowania LightCycler Software 1.5.

Do reakcji użyto polimerazę typu *hot-start*, niewykazującą aktywności poniżej temperatury 75°C. Zastosowanie układu *hot-start* zapobiega powstawaniu nieswoistych produktów w trakcie przygotowywania mieszaniny reakcyjnej. Przeprowadzono pre-inkubację enzymu w temperaturze 95°C przez 10 minut w celu oderwania grup blokujących jego aktywność, grupy te są nietrwałe w wysokiej temperaturze.

Zmiany ilości przyrastającego produktu monitorowano poprzez pomiar sygnału fluorescencji emitowanej przez sondy zastosowane w reakcji. Emisja fluorescencji jest wprost proporcjonalna do ilości powstającego produktu. Pomiar fluorescencji

umożliwia monitorowanie przebiegu reakcji RT-qPCR, w której wyróżnia się następujące fazy:

Faza I - Nie obserwuje się przyrostu ilości produktu, reakcja zachodzi na poziomie tła.

Faza II - (faza logarytmicznego wzrostu) - obserwuje się bardzo szybki przyrost fluorescencji, która zachodzi powyżej tła. Moment, w którym reakcja amplifikacji wchodzi w tę fazę ( $C_p$ , ang. *crossing point*) zależy wyłącznie od początkowej ilości matrycy.

Faza III - (faza plateau) - następuje wysycenie reakcji, zahamowanie przyrostu ilości produktu w wyniku wyczerpania się substratów reakcji amplifikacji.

Reakcje RT-qPCR przeprowadzano na płytkach 96-dołkowych z wykorzystaniem zestawu LightCycler480 Probes Master.

Skład mieszaniny reakcyjnej (10 $\mu$ l):

- 5 $\mu$ l LightCycler480 Probes Master,
- 1 $\mu$ l starterów (tabela 3.2)
- 1 $\mu$ l sondy (tabela 3.2)
- 1 $\mu$ l cDNA,
- 2 $\mu$ l wody.

Program amplifikacji:

- denaturacja wstępna – 95° C, 10 min. (aktywacja polimerazy),
- oznaczenie ilościowe ekspresji genów – 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.

Do oceny ekspresji genów posłużono się względną metodą ilościową (ang. *relative quantification*) umożliwiającą ustalenie względnej różnicy między badanymi próbkami (krotności wzrostu, zmiany ilości specyficznego cDNA po zastosowaniu DMU-212). 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*). Otrzymany wynik wskazuje czy ekspresja badanego genu zmienia się w stosunku do ekspresji genu referencyjnego.

### 3.5.6. Parametry chemii klinicznej

#### 3.5.6.1. Oznaczanie aktywności aminotransferaz - ALT i AST

Aminotransferazy są katalizatorami odwracalnych reakcji, w wyniku których następuje przeniesienie grupy aminowej z aminokwasu na ketokwas. Produktami tej reakcji są nowy ketokwas i nowy aminokwas. Aktywność obu enzymów oznaczano za pomocą testu firmy POINTE SCIENTIFIC.

#### Zasada oznaczenia aminotransferazy alaninowej (ALT)

Oparta jest na następujących reakcjach enzymatycznych:

1. L-alanina +  $\alpha$ -ketoglutaran  $\xrightarrow{\text{ALT}}$  pirogronian + L-glutaminian
2. pirogronian + NADH + H<sup>+</sup>  $\xrightarrow{\text{LDH}}$  L-mleczan + NADH<sup>+</sup> + H<sub>2</sub>O

W pierwszej reakcji katalizowanej przez aminotransferazę alaninową (ALT) następuje przeniesienie grupy aminowej z L-alaniny na  $\alpha$ -ketoglutaran, w wyniku czego powstaje pirogronian, który w następnej reakcji przy udziale dehydrogenazy mleczanowej (LDH) ulega redukcji do mleczanu. Reakcji towarzyszy utlenienie NADH do NAD. Równocześnie następuje spadek absorbancji przy długości fali 340 nm, który jest proporcjonalny do zmian aktywności ALT.

#### Zasada oznaczania aminotransferazy asparaginowej (AST)

1. L-asparaginian +  $\alpha$ -ketoglutaran  $\xrightarrow{\text{AST}}$  szczawiooctan + L-glutaminian
2. Szczawiooctan + NADH<sup>+</sup> + H<sup>+</sup>  $\xrightarrow{\text{MDH}}$  L-jabłczan + NAD<sup>+</sup> + H<sub>2</sub>O

W pierwszej reakcji katalizowanej przez aminotransferazę asparaginianową (AST) następuje przeniesienie grupy aminowej z L-asparaginianu na  $\alpha$ -ketoglutaran, w wyniku czego powstaje szczawiooctan, który w następnej reakcji przy udziale dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) ulega redukcji do L-jabłczanu. Reakcji towarzyszy utlenienie NADH do NAD. Równocześnie następuje spadek absorbancji przy długości fali 340 nm, który jest proporcjonalny do zmian aktywności AST.

### Przebieg oznaczenia

1 ml odczynnika inkubowanego wcześniej przez 5 minut w temperaturze 37°C odmierzone do kuwety. Następnie dodano 100 µl osocza i dokładnie wymieszano. Pomiarów absorbancji dokonano przy długości fali 340 nm, w temperaturze 37°C dokładnie po 1 minucie oraz przez następne 2 minuty w odstępach 30-sekundowych.

### Obliczanie wyników

Aktywność aminotransferaz została obliczona według następującego wzoru:

$$\text{IU/l} = \frac{\Delta \text{abs/min} \times 1,1 \times 1000}{6,22 \times 0,1 \times 1} = \Delta \text{abs/min} \times 1768$$

1,1 – objętość całkowita

1000 – zamiana IU/ml na IU/l

6,22 – współczynnik absorbancji milimolowej

0,1 – objętość próbki

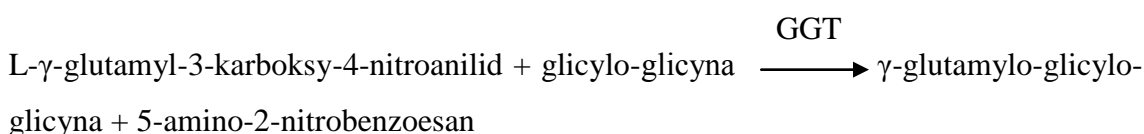
1 – długość drogi optycznej

### 3.5.6.2. Oznaczanie aktywności $\gamma$ -glutamylotransferazy (GGT)

GGT jest katalizatorem reakcji przeniesienia grupy  $\gamma$ -glutamylowej z donora, którym mogą być peptydy  $\gamma$ -glutamylowe lub glutation na akceptor, takim jak  $\alpha$ -aminokwas, substrat  $\gamma$ -glutamyłowy lub glicylo-glicyna.

### Zasada oznaczenia

Aktywność  $\gamma$ -glutamylotransferazy oznaczono za pomocą testu firmy ALPHA DIAGNOSTIC, opartego na następującej reakcji enzymatycznej:



W reakcji katalizowanej przez  $\gamma$ -glutamylotransferazę (GGT) następuje przeniesienie grupy glutamylowej z substratu na cząsteczkę glicylo-glicyny, w efekcie której powstaje 5-amino-2-nitrobenzoesan. Szybkość powstawania tego produktu mierzona przy długości fali 405 nm jest proporcjonalna do aktywności GGT w badanej próbce.



### Przebieg oznaczenia

1 ml odczynnika inkubowanego wcześniej przez 5 minut w temperaturze 37°C odmierzone do kuwety. Następnie dodano 50 µl osocza i dokładnie wymieszano. Pomiarów absorbancji dokonano przy długości fali 405 nm, w temperaturze 37°C dokładnie po 1 minucie oraz przez następne 3 minuty w odstępach 60-sekundowych.

### Obliczanie wyników

Aktywność  $\gamma$ -glutamylotransferazy została obliczona według następującego wzoru:

$$\text{IU/l} = \frac{\Delta\text{abs}/\text{min} \times 1,05 \times 1000}{9,5 \times 0,05 \times 1} = \Delta\text{abs}/\text{min} \times 2211$$

1,05 – objętość całkowita

1000 – zamiana IU/ml na IU/l

9,5 – współczynnik absorbancji milimolowej 5-amino-2-nitrobenzoesu

0,05 – objętość pojedynczej próby

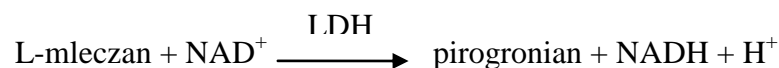
1 – długość drogi optycznej

### 3.5.6.3. Oznaczanie aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH)

Dehydrogenaza mleczanowa jest enzymem z klasy oksydoreduktaz biorącym udział w reakcji utleniania kwasu mlekowego do pirogronianu oraz w reakcji odwrotnej – redukcji pirogronianu do mleczanu.

### Zasada oznaczania

Aktywność dehydrogenazy mleczanowej oznaczono za pomocą testu firmy POINTE SCIENTIFIC, opartego na następującej reakcji enzymatycznej:



W reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę mleczanową następuje utlenianie L-mleczanu do pirogronianu, z równoczesną redukcją  $\text{NAD}^+$  do NADH. Rekcji towarzyszy zmiana absorbancji mierzonej przy długości fali 340 nm, która jest proporcjonalna do aktywności LDH w badanej próbce.

### Przebieg oznaczenia

1 ml odczynnika inkubowanego wcześniej przez 5 minut w temperaturze 37°C odmierzone do kuwety. Następnie dodano 25 µl osocza i dokładnie wymieszano.

Pomiarów absorbancji dokonano przy długości fali 405 nm, w temperaturze 37°C dokładnie po 1 minucie oraz przez następne 2 minuty w odstępach 30-sekundowych.

#### **Obliczanie wyników**

Aktywność dehydrogenazy mleczanowej została obliczona według następującego wzoru:

$$\text{IU/l} = \frac{\Delta\text{abs}/\text{min} \times 1,025 \times 1000}{6,22 \times 0,025 \times 1} = \Delta\text{abs}/\text{min} \times 6592$$

gdzie:

1000 – zamiana IU/ml na IU/l

1,025 – objętość całkowita

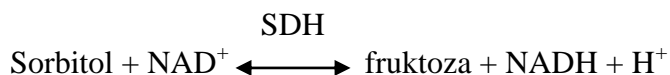
0,025 – objętość próby

6,22 – współczynnik absorbancji milimolowej NADH

1 – długość drogi optycznej

#### **3.5.6.4. Oznaczanie aktywności dehydrogenazy sorbitolowej (SDH)**

Dehydrogenaza sorbitolowa (SDH) katalizuje proces utleniania sorbitolu do fruktozy przebiegający według reakcji:



#### **Zasada oznaczania**

Aktywność dehydrogenazy sorbitolowej została oznaczona przy pomocy testu SIGMA DIAGNOSTIC, który polega na pomiarze szybkości spadku absorbancji przy długości fali 340 nm w roztworze zawierającym enzym oraz fruktozę.

#### **Przebieg oznaczenia**

Do kuwety odmierzonego 1 ml roztworu NADH w buforze TRIZMA (przygotowanego przez odważenie 4 mg NADH i uzupełnienie do 40 cm<sup>3</sup> buforem TRIZMA). Następnie dodano 25µl osocza krwi. Zawartość kuwety dokładnie wymieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Po tym czasie dodano 0,25 ml β-D(-)fruktozy o stężeniu 72 g/dl i dokonano pomiarów absorbancji przy długości fali 340 nm, w temperaturze 25°C, przez 5 minut w odstępach 60-sekundowych.

### Obliczanie wyników

Aktywność dehydrogenazy sorbitolowej została obliczona według następującego wzoru:

$$\text{SDH (sigma/ml)} = \frac{\Delta\text{abs/ min} \times 1,5 \times 60}{0,00622 \times 0,25} = \Delta\text{abs/min} \times 58000 \times \text{TC}$$

1,5 – objętość roztworu reakcyjnego

60 – zamiana  $\Delta\text{abs/min}$  na  $\Delta\text{abs/h}$

0,00622 – współczynnik mikromolowy

0,25 – objętość próbki

TC – korekta temperatury (dla temperatury 25°C TC=1)

### 3.5.6.5. Oznaczanie stężenia kreatyniny

#### Zasada oznaczania

Oznaczenia wykonano wykorzystując test firmy POINTE SCIENTIFIC POLAND. Metoda polega na reakcji kreatyniny z kwasem pikrynowym w środowisku alkalicznym.

Szybkość powstawania kompleksu o żółtopomarańczowej barwie jest wprost proporcjonalna do stężenia kreatyniny w próbce. Pomiarów absorbancji dokonuje się przy długości fali 510 nm.

#### Przebieg oznaczenia

Odmierzono 1 ml odczynnika roboczego (mieszanina kwasu pikrynowego i wodorotlenku sodowego 1:5) do kuwety i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 5 minut. Dodano 50  $\mu\text{l}$  próbki i zmierzono absorbancję wobec próby ślepej odczynnikowej po 1 minucie (abs. 1) i po 2 minutach (abs. 2).

### Obliczanie wyników

Stężenie kreatyniny obliczono na podstawie wzorów:

Różnica absorbancji:  $\Delta\text{abs.} = \text{abs. 2} - \text{abs. 1}$

$$\text{kreatynina (mg/dl)} = \frac{\Delta\text{abs. próby}}{\Delta\text{abs. astandard}} \times \text{stężenie standard (mg/dl)}$$

Stężenie standardu (g/dl) = 2,5

### **3.5.7. Badania immunohistochemiczne**

Badania immunohistochemiczne zostały wykonane w Katedrze Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Na skrawkach wątroby o grubości 5  $\mu\text{m}$  przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne za pomocą zestawu Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (kod 5007). W skład zestawu wchodzi odczynnik detekcyjny, zawierający szkielet dekstranowy sprzężony z wieloma cząsteczkami peroksydazy i z wtórnymi przeciwciałami. Reakcja obrazowana była przy pomocy chromogenu DAB-diaminobenzyny z dodatkiem nadtlenku wodoru.

Badania przeprowadzono z użyciem następujących przeciwciał przeznaczonych do preparatów zatopionych w parafinie:

PCNA – monoklonalne przeciwciało mysie anty-ludzkie, zastosowane rozcieńczenie 1:100, firmy Santa Cruz Biotechnology INC, kod sc.56;

GSTp – poliklonalne przeciwciało królicze anty-ludzkie, zastosowane rozcieńczenie 1:100, firmy Sigma Aldrich, kod HPA 019869

Ki67 – monoklonalne przeciwciało mysie anty- ludzkie, zastosowane rozcieńczenie 1:200, firma Dako, Denmark, kod M7248

p53 - monoklonalne przeciwciało mysie anty-ludzkie, zastosowane rozcieńczenie 1:1000, firmy Novus Biologicals®, kod NBP1-4119;

Rb1 - monoklonalne przeciwciało mysie anty-ludzkie, zastosowane rozcieńczenie 1:50, firmy Santa Cruz Biotechnology, INC, kod cs-73598;

GGT1 - monoklonalne przeciwciało mysie antyludzkie, zastosowane rozcieńczenie 1:50, firmy Santa Cruz Biotechnology, INC, kod cs-100746;

TGF alpha - poliklonalne przeciwciało królicze anty-ludzkie, zastosowane rozcieńczenie 1:100, firmy Novus Biologicals®, kod NB;

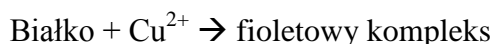
Podczas reakcji immunocytochemicznych wykonywano reakcje kontrolne negatywne umieszczając na oczyszczonych skrawkach wątroby mysie IgG1 (Negative Control, Dako, kod X0931) lub PBS, zamiast swoistego przeciwciała.

### **3.5.8. Oznaczanie białka całkowitego**

#### **Zasada oznaczenia:**

Zastosowano metodę biuretową, w której jony  $\text{Cu}^{2+}$  przyłączone zostają do wiązań peptydowych, co powoduje powstawanie barwnego związku kompleksowego.

Reakcja zachodzi w środowisku zasadowym. Stężenie związku barwnego mierzy się kolorymetrycznie przy długości fali  $\lambda=540$  nm [259].



**Odczynniki:**

- 600 mM roztwór wodorotlenku sodu (NaOH)
- 12 mM roztwór siarczanu miedzi (II)
- 32 mM roztwór winianu sodowo-potasowego ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ )
- 30 mM roztwór jodku potasu (KI)
- Niereaktywne stabilizatory

**Przebieg oznaczenia:**

Do próbek odmierzone odpowiednio: do pierwszej 20 $\mu$ l soli fizjologicznej (próba ślepa), do kolejnych 20 $\mu$ l frakcji cytozolowej (próby badane) i do ostatniej 20 $\mu$ l standardu białka. Następnie do wszystkich próbek dodano 1ml odczynnika. Całość dokładnie wymieszano w wytrząsarce i inkubowano 3min w temp. 37°C. Zmierzono absorbancję przy długości fali  $\lambda=540$  nm. Stężenie białka obliczono według wzoru:

$$\text{Białko całkowite [g/dl]} = \frac{\text{Abs. próbki}}{\text{Abs. standardu}} \times \text{stężenie standardu [g/dl]}$$

**3.5.9. Analiza statystyczna wyników**

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programu GraphPad v.5.0 (GraphPad Prism Software, USA) oraz Microsoft Excel 2007.

Do oszacowania wpływu DMU-212 na parametry obrony antyoksydacyjnej zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (*one-way ANOVA*). Różnice pomiędzy grupami badano przy pomocy Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test i przyjęto za statystycznie istotne na poziomie  $p<0,05$ .

Do oszacowania wpływu DMU-212 na poziom ekspresji badanych genów zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (*one-way ANOVA*). Ponadto, wyniki analizowano testem post-hoc Student-Newman-Keuls. Wartość średniej z prób kontrolnych przyjęto jako 100%. Różnice pomiędzy grupami przyjęto za statystycznie istotne na poziomie  $p<0,05$ .

## 4. WYNIKI BADAŃ

Wyniki oznaczeń przedstawiono w 32 tabelach i na 37 rycinach:

- parametry statusu antyoksydacyjnego w wątrobie: tabele 4.1 – 4.12 oraz ryciny 4.1 – 4.12
- ekspresja genów kodujących enzymy antyoksydacyjne: tabele 4.13 – 4.19 oraz ryciny 4.13 – 4.19
- wybrane parametry funkcji wątroby i nerek: tabela 4.20
- badania immunohistochemiczne: ryciny 4.20 – 4.27
- parametry statusu antyoksydacyjnego w nerkach: tabele 4.21 – 4.30 oraz ryciny 4.28 – 4.37
- średni przyrost masy ciała: tabela 4.31
- względne masy narządów: tabela 4.32

Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SD, n=8 – dla parametrów statusu antyoksydacyjnego w wątrobie i nerkach; wybranych parametry funkcji wątroby i nerek; średniego przyrostu masy ciała; względnych mas narządów.

Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SD, n=5 - dla ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne.

W tabelach i na wykresach zastosowano następujące symbole:

↑ ↓ - zwiększenie lub zmniejszenie wartości badanego parametru względem grupy kontrolnej lub grupy otrzymującej NDEA/PB

\* (•)- różnica znamionna statystycznie dla  $p < 0,05$

\*\* (••)- różnica znamionna statystycznie dla  $p < 0,01$

\*\*\* (•••) - różnica znamionna statystycznie dla  $p < 0,001$

bz – bez zmian

\* - zmiana względem grupy kontrolnej

• - zmiana względem grupy otrzymującej NDEA/PB

#### 4.1. Wpływ 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-212) na parametry obrony antyoksydacyjnej w wątrobie szczurów narażonych na NDEA/PB

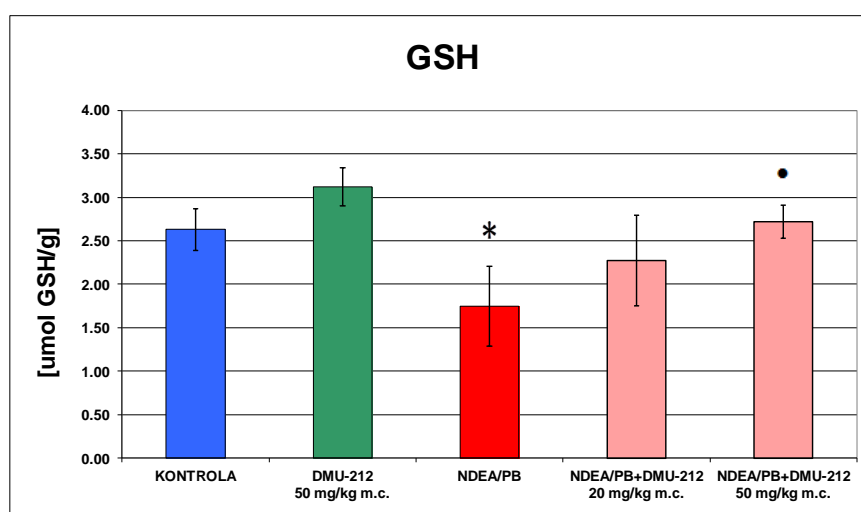
##### 4.1.1. Zredukowany glutation (GSH)

W wątrobie szczurów narażonych na NDEA/PB nastąpiło 33% obniżenie poziomu GSH. U zwierząt otrzymujących obie dawki DMU-212 stężenie GSH wzrosło, odpowiednio o 30% i 55% osiągając poziom zbliżony do oznaczonego w grupie kontrolnej. W grupie otrzymującej sam DMU-212 nastąpił 19% (nieznamienny statystycznie) wzrost poziomu GSH (tabela 4.1; ryc. 4.1).

Tabela 4.1. Stężenie glutationu zredukowanego (GSH) w wątrobie szczurów

Ekspozycja	Stężenie GSH [umol GSH/g] średnia ± SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrawaną
kontrola	2,63 ± 0,24	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	3,12 ± 0,22	↑19	-
NDEA/PB	1,75 ± 0,46	↓33*	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	2,27 ± 0,52	-	↑30
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	2,72 ± 0,19	-	↑55•

Różnica znamienne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \*p<0,05 oraz w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB •p<0,05



Ryc. 4.1. Stężenie glutationu zredukowanego w wątrobie szczurów

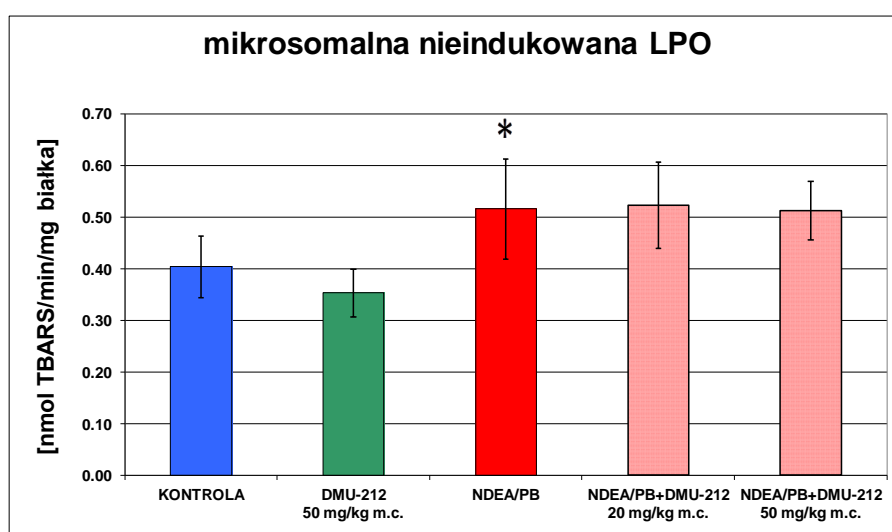
#### 4.1.2. Poziom peroksydacji lipidów (LPO) nieindukowanej

W wątrobie zwierząt narażonych na NDEA/PB odnotowano 28% wzrost peroksydacji lipidów we frakcji mikrosomalnej wątroby. U zwierząt otrzymujących obie dawki DMU-212 nie obserwowano żadnych znamienych statystycznie różnic w porównaniu z grupą zatrwaną. W wątrobie szczurów, którym podawano sam DMU-212 nastąpiło niewielkie nieznamienne statystycznie obniżenie tego parametru w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 4.2; ryc. 4.2).

Tabela 4.2. Poziom mikrosomalnej nieindukowanej peroksydacji lipidów (LPO) w wątrobie szczurów

<b>Ekspozycja</b>	<b>LPO [nmol TBARS/min/mg białka] średnia ± SD</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą kontrolną</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą zatrwaną</b>
<b>kontrola</b>	0,40 ± 0,06	-	-
<b>DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	0,35 ± 0,05	↓13	-
<b>NDEA/PB</b>	0,52 ± 0,10	↑28*	-
<b>NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.</b>	0,52 ± 0,08	-	bz
<b>NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	0,51 ± 0,06	-	bz

Różnica znamienna statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \*p<0,05; bz – bez zmian



Ryc. 4.2. Poziom mikrosomalnej nieindukowanej peroksydacji lipidów (LPO) w wątrobie szczurów



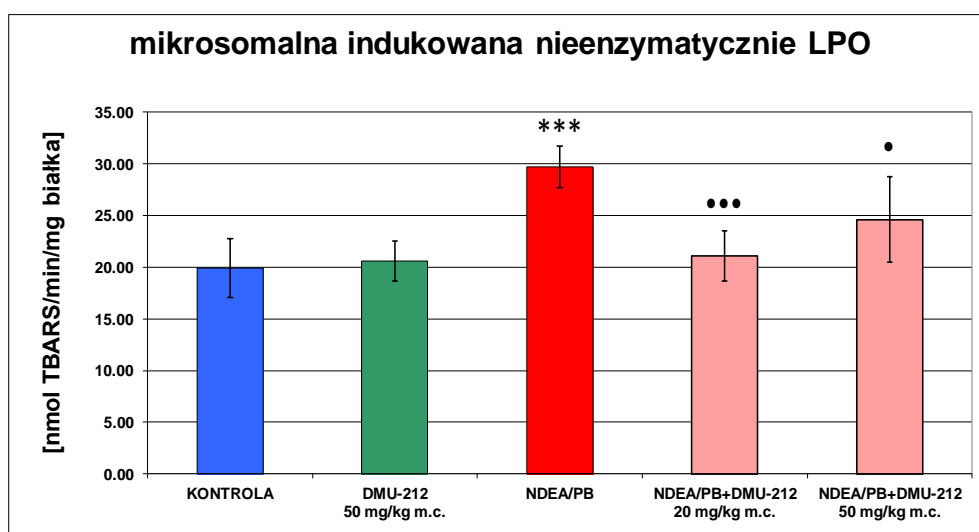
#### 4.1.3. Poziom peroksydacji lipidów (LPO) indukowanej nieenzymatycznie

W wątrobie zwierząt narażonych na NDEA/PB odnotowano wysoki, 49% wzrost peroksydacji lipidów we frakcji mikrosomalnej wątroby. Podawanie szczurom obu dawek DMU-212 w pewnym stopniu zmniejszyło nasilenie uszkodzeń powodując obniżenie poziomu TBARS o 29% i 19%. U szczurów otrzymujących sam DMU-212 nie stwierdzono żadnych zmian tego parametru w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 4.3; ryc. 4.3).

Tabela 4.3. Poziom mikrosomalnej indukowanej nieenzymatycznie (układem  $Fe^{2+}$ /askorbinian) peroksydacji lipidów (LPO) w wątrobie szczurów

Ekspozycja	LPO [nmol TBARS/min/mg białka] średnia ± SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrwaną
kontrola	19,91 ± 2,84	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	20,62 ± 1,95	bz	-
NDEA/PB	29,70 ± 2,0	↑49***	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	21,09 ± 2,42	-	↓29•••
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	24,62 ± 4,16	-	↓19•

Różnica znamiennej statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \*\*\* $p < 0,001$  oraz w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB • $p < 0,05$ ; ••• $p < 0,001$



Ryc. 4.3. Poziom mikrosomalnej indukowanej nieenzymatycznie (układem  $Fe^{2+}$ /askorbinian) peroksydacji lipidów (LPO) w wątrobie szczurów

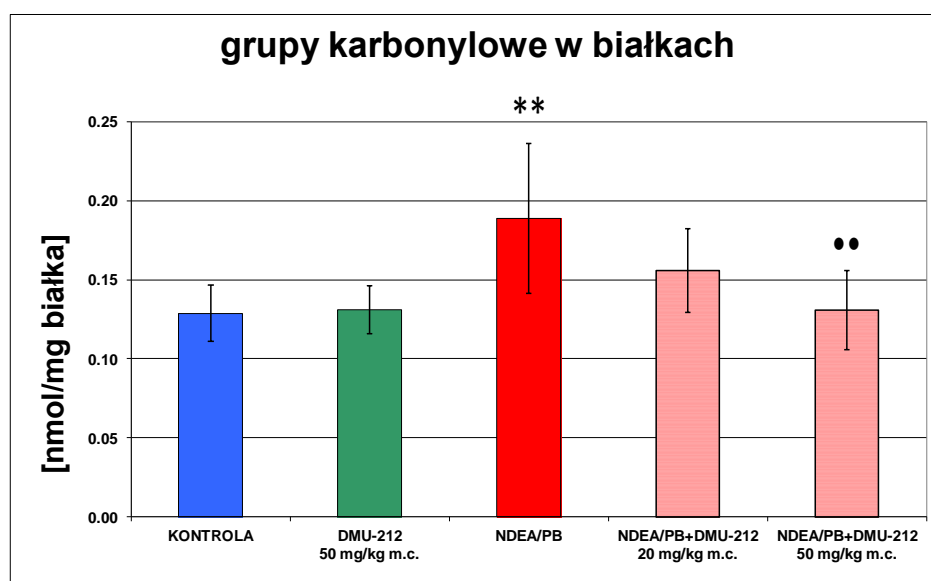
#### 4.1.4. Stężenie grup karbonylowych w białkach

W wątrobie zwierząt narażonych na NDEA/PB odnotowano 47% wzrost stężenia grup karbonylowych. Podawanie szczurom DMU-212 zmniejszyło nasilenie uszkodzeń powodując obniżenie stężenia grup karbonylowych zależnie od dawki, odpowiednio o 17% i 31%. U szczurów otrzymujących sam DMU-212 nie stwierdzono żadnych zmian tego parametru w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 4.4; ryc. 4.4).

Tabela 4.4. Stężenie grup karbonylowych w białkach w wątrobie szczurów

Ekspozycja	Stężenie grup karbonylowych [nmol/mg białka] średnia ± SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrwaną
kontrola	0,13 ± 0,02	-	-
DMU-212	0,13 ± 0,02	bz	-
50mg/kg m.c.			
NDEA/PB	0,19 ± 0,05	↑47**	-
NDEA/PB+DMU-212	0,16 ± 0,03	-	↓17
20mg/kg m.c.			
NDEA/PB+DMU-212	0,13 ± 0,02	-	↓31**
50mg/kg m.c.			

Różnica znamienne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \*\*p<0,01 oraz w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB \*\*p<0,01; bz – bez zmian



Ryc. 4.4. Stężenie grup karbonylowych w białkach w wątrobie szczurów

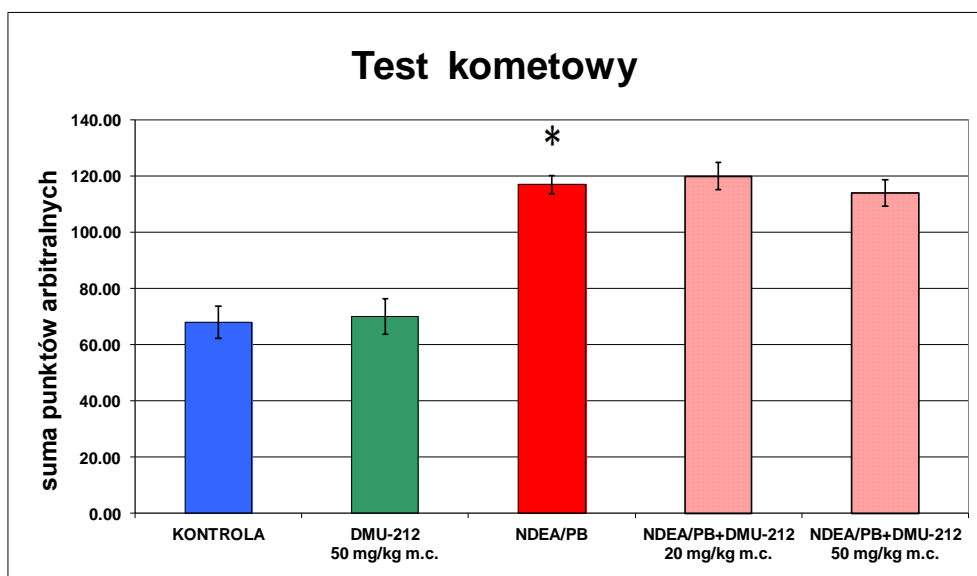
#### 4.1.5. Poziom uszkodzenia DNA (test kometowy)

W wątrobie zwierząt narażonych na NDEA/PB odnotowano 47% wzrost uszkodzenia DNA. Żadna z zastosowanych dawek DMU-212 nie obniżyła tej wartości. U szczurów otrzymujących sam DMU-212 nie stwierdzono zmian tego parametru w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 4.5; ryc. 4.5).

Tabela 4.5. Poziom uszkodzeń DNA w wątrobie szczurów

<b>Ekspozycja</b>	<b>Uszkodzenie DNA [suma punktów arbitralnych] średnia ± SD</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą kontrolną</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą zatrwaną</b>
<b>kontrola</b>	68 ± 6	-	-
<b>DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	70 ± 6	bz	-
<b>NDEA/PB</b>	117 ± 3	↑47*	-
<b>NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.</b>	120 ± 5	-	bz
<b>NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	114 ± 5	-	bz

Różnica znamienna statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \*p<0,05; bz – bez zmian



Ryc. 4.5. Poziom uszkodzeń DNA w wątrobie szczurów

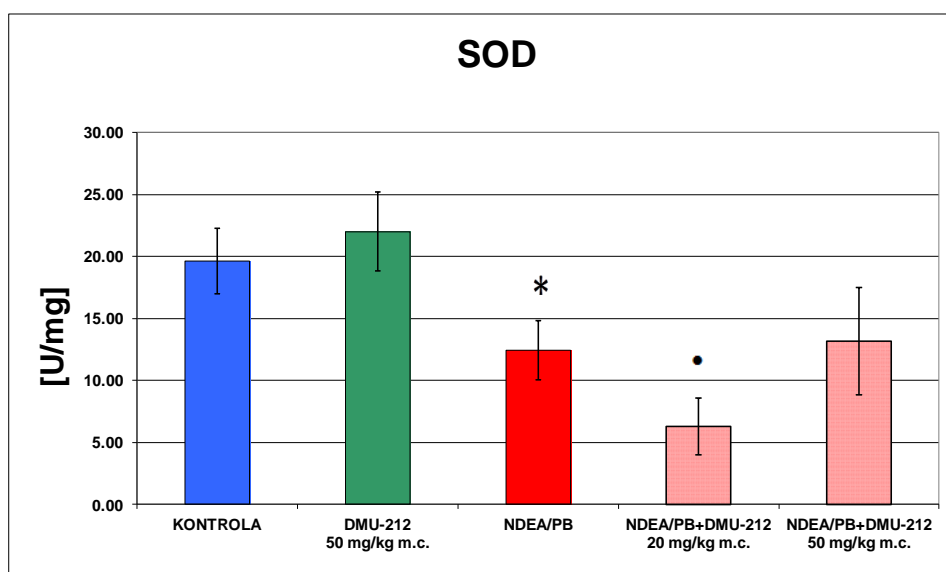
#### 4.1.6. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)

W wątrobie szczurów narażonych na NDEA/PB aktywność SOD obniżyła się o 37%. U szczurów otrzymujących łącznie NDEA/PB i niższą dawkę DMU-212 nastąpił znaczny, 49% spadek aktywności enzymu w porównaniu z grupą narażoną na NDEA/PB. Podawanie samego DMU-212 nie wpłynęło zasadniczo na aktywność SOD (tabela 4.6; ryc. 4.6).

Tabela 4.6. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w wątrobie szczurów

Ekspozycja	Aktywność SOD [U/mg] średnia ± SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrowaną
kontrola	19,64 ± 2,64	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	22,02 ± 3,17	↑12	-
NDEA/PB	12,44 ± 2,37	↓37*	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	6,30 ± 2,30	-	↓49•
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	13,17 ± 4,31	-	bz

Różnica znamienne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \* $p < 0,05$  oraz w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB • $p < 0,05$ ; bz – bez zmian



Ryc. 4.6. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w wątrobie szczurów

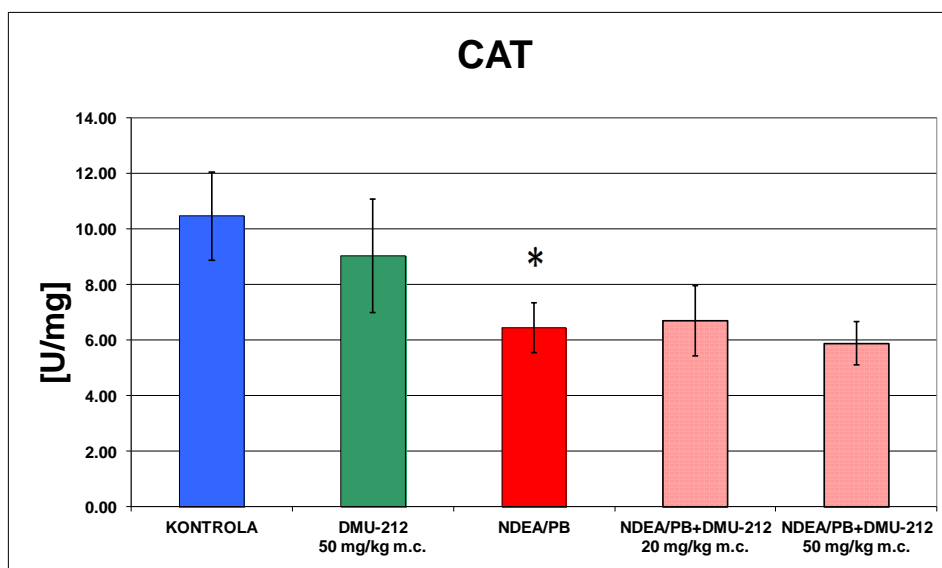
#### 4.1.7. Katalaza (CAT)

W wątrobie szczurów narażonych na NDEA/PB aktywność CAT obniżyła się o 38% i nie uległa zmianie pod wpływem obu dawek DMU-212. Sam związek badany spowodował nieznaczne obniżenie aktywności enzymu (o 14%) w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 4.7; ryc. 4.7).

Tabela 4.7. Aktywność katalazy (CAT) w wątrobie szczurów

Ekspozycja	Aktywność CAT [U/mg] średnia ± SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrawaną
kontrola	10,47 ± 1,58	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	9,04 ± 2,04	↓14	-
NDEA/PB	6,45 ± 0,89	↓38*	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	6,71 ± 1,27	-	bz
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	5,88 ± 0,78	-	↓9

Różnica znamionna statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \*p<0,05; bz - bez zmian



Ryc. 4.7. Aktywność katalazy (CAT) w wątrobie szczurów

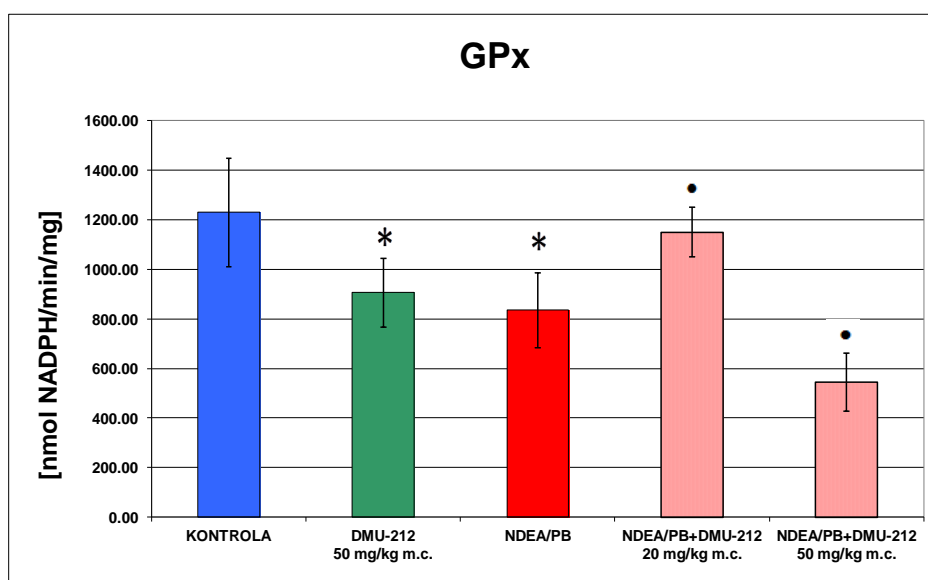
#### 4.1.8. Peroksydaza glutationowa (GPx)

W wątrobie szczurów narażonych na NDEA/PB aktywność GPx obniżyła się o 32%. Wzrost aktywności enzymu o 38% nastąpił tylko w grupie otrzymującej niższą dawkę DMU-212, natomiast wyższa dawka spowodowała obniżenie jego aktywności o 35%. Sam związek badany spowodował 26% obniżenie aktywności enzymu w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 4.8; ryc. 4.8).

Tabela 4.8. Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) w wątrobie szczurów

Ekspozycja	Aktywność GPx [nmol NADPH/min/mg] średnia ± SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrwaną
kontrola	1230 ± 220	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	906 ± 138	↓26*	-
NDEA/PB	835 ± 150	↓32*	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	1151 ± 100	-	↑38•
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	545 ± 116	-	↓35•

Różnica znamienne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \* $p < 0,05$  oraz w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB • $p < 0,05$



Ryc. 4.8. Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) w wątrobie szczurów

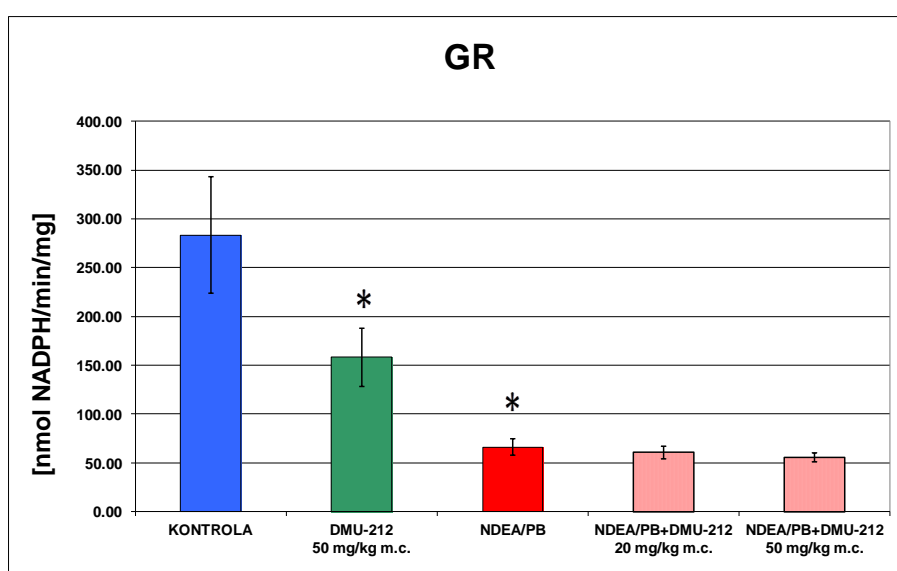
#### 4.1.9. Reduktaza glutationowa (GR)

Aktywność reduktazy glutationowej uległa znacznemu obniżeniu, o 77%, w wątrobie szczurów narażonych na NDEA/PB. Żadna z zastosowanych dawek DMU-212 nie spowodowała zwiększenia aktywności enzymu w porównaniu z grupą zatrawaną. Natomiast sam związek badany obniżył aktywność GR o 44% w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 4.9; ryc. 4.9).

Tabela 4.9. Aktywność reduktazy glutationowej (GR) w wątrobie szczurów

<b>Ekspozycja</b>	<b>Aktywność GR [nmol NADP/min/mg] średnia ± SD</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą kontrolną</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą zatrwaną</b>
<b>kontrola</b>	283,45 ± 59,88	-	-
<b>DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	158,09 ± 30,08	↓44*	-
<b>NDEA/PB</b>	66,07 ± 8,37	↓77*	-
<b>NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.</b>	60,63 ± 6,30	-	↓8
<b>NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	55,69 ± 4,73	-	↓16

Różnica znamienne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \*p<0,05



Ryc. 4.9. Aktywność reduktazy glutationowej (GR) w wątrobie szczurów

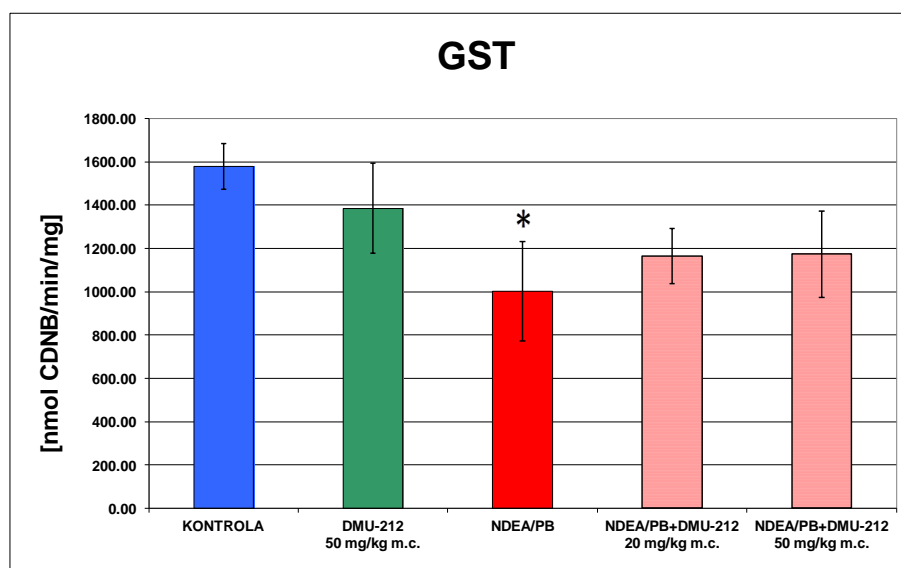
#### 4.1.10. S-transferaza glutationowa (GST)

W wątrobie szczurów narażonych na NDEA/PB aktywność GST obniżyła się o 37%. Obie dawki związku badanego spowodowały wyraźny, chociaż nieznamienisty statystycznie wzrost aktywności GST o 16% i 17%. U zwierząt otrzymujących sam DMU-212 nastąpiło niewielkie obniżenie aktywności enzymu w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 4.10; ryc. 4.10).

Tabela 4.10. Aktywność S-transferazy glutationowej (GST) w wątrobie szczurów

Ekspozycja	Aktywność GST [nmol DCNB/min/mg] średnia ± SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrwaną
kontrola	1579 ± 105	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	1386 ± 207	↓12	-
NDEA/PB	1003 ± 229	↓37*	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	1166 ± 128	-	↑16
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	1174 ± 200	-	↑17

Różnica znamienista statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \*p<0,05



Ryc. 4.10. Aktywność S-transferazy glutationowej (GST) w wątrobie szczurów



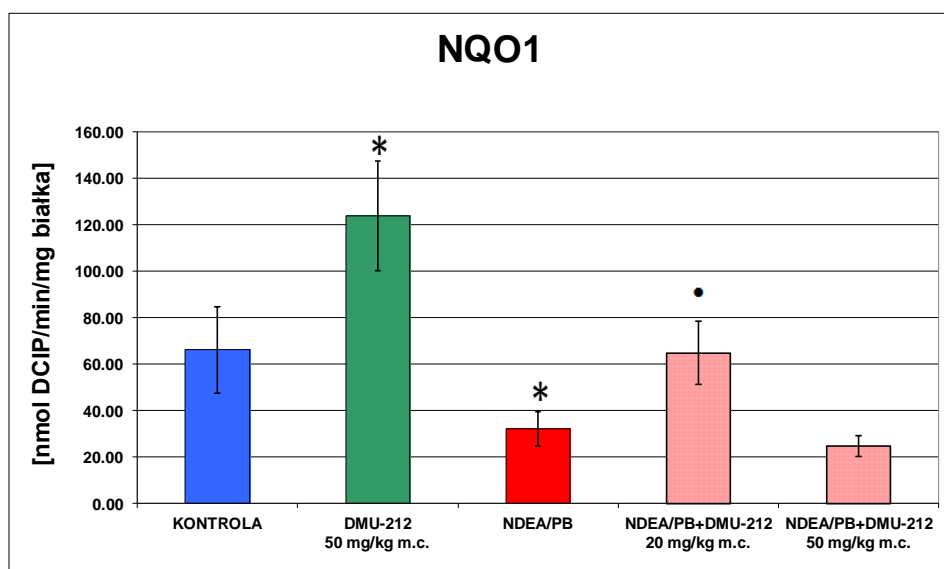
#### 4.1.11. Oksydoreduktaza NADP(H):chinon (NQO1)

W wątrobie szczurów narażonych na NDEA/PB aktywność NQO1 znacznie się obniżyła, o 51%, ale powróciła do stanu zbliżonego do grupy kontrolnej u zwierząt traktowanych niższą dawką DMU-212. Wyższa dawka spowodowała niezamienne statystycznie obniżenie aktywności enzymu o 23%. Znaczny wzrost aktywności NQO1, o 87%, zanotowano w grupie otrzymującej sam DMU-212 (tabela 4.11; ryc. 4.11).

Tabela 4.11. Aktywność oksydoreduktazy NADP(H):chinon (NQO1) w wątrobie szczurów

Ekspozycja	Aktywność NQO1 [nmol DCIP/min/mg białka] średnia ± SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrwaną
kontrola	66,24 ± 18,68	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	123,82 ± 23,60	↑87*	-
NDEA/PB	32,13 ± 7,44	↓51*	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	64,91 ± 13,66	-	↑102•
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	24,86 ± 4,52	-	↓23

Różnica znamienne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \* $p < 0,05$  oraz w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB • $p < 0,05$



Ryc. 4.11. Aktywność oksydoreduktazy NADP(H):chinon (NQO1) w wątrobie szczurów

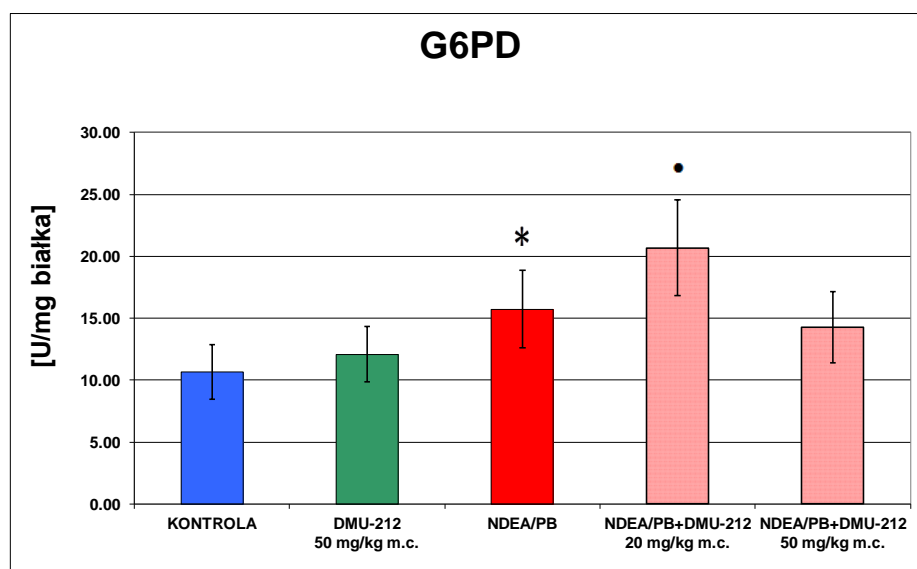
#### 4.1.12. Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD)

W wątrobie szczurów narażonych na NDEA/PB aktywność G6PD zwiększyła się o 48%. Podawanie niższej dawki DMU-212 spowodowało dalszy, 31% wzrost aktywności enzymu w porównaniu z grupą narażoną na NDEA/PB. Zanotowano również lekki wzrost aktywności G6PD w grupie otrzymującej sam DMU-212 (tabela 4.12; ryc. 4.12).

Tabela 4.12. Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PD) w wątrobie szczurów

Ekspozycja	Aktywność G6PD [U/mg białka] średnia ± SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrawaną
kontrola	10,66 ± 2,21	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	12,10 ± 2,25	↑13	-
NDEA/PB	15,73 ± 3,13	↑48*	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	20,67 ± 3,86	-	↑31•
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	14,26 ± 2,88	-	↓9

Różnica znamionna statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \*p<0,05 oraz w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB •p<0,05



Ryc. 4.12. Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PD) w wątrobie szczurów

## 4.2. Wpływ 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-212) na ekspresję genów kodujących enzymy antyoksydacyjne w wątrobie szczurów narażonych na NDEA/PB

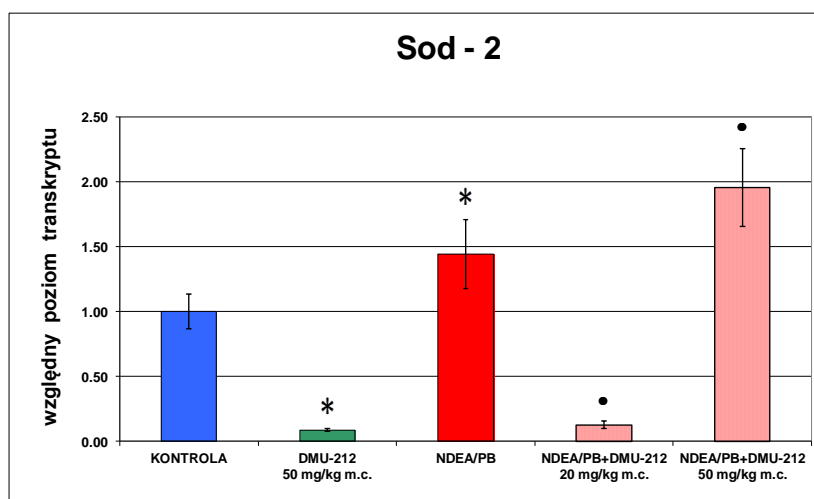
### 4.2.1. Sod-2

U szczurów narażonych na NDEA/PB zaobserwowano wzrost ekspresji transkryptu mRNA dysmutazy ponadtlenkowej o 44%. Pod wpływem obu dawek DMU-212 nastąpiła zmiana w przeciwnych kierunkach: 92% obniżenie oraz 36% wzrost poziomu transkryptu u szczurów otrzymujących odpowiednio niższą i wyższą dawkę związku. Sam DMU-212 spowodował znaczne, 92% obniżenie ekspresji mRNA w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 4.13; ryc. 4.13).

Tabela 4.13. Zmiany poziomu mRNA Sod-2 w wątrobie szczurów

Ekspozycja	Względny poziom transkryptu sod-2 średnia ± SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrawaną
kontrola	1,00 ± 0,13	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	0,09 ± 0,01	↓92*	-
NDEA/PB	1,44 ± 0,26	↑44*	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	0,13 ± 0,03	-	↓92•
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	1,96 ± 0,29	-	↑36•

Różnica znamiennej statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \*p<0,05 oraz w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB •p<0,05



Ryc. 4.13. Zmiany poziomu mRNA Sod-2 w wątrobie szczurów

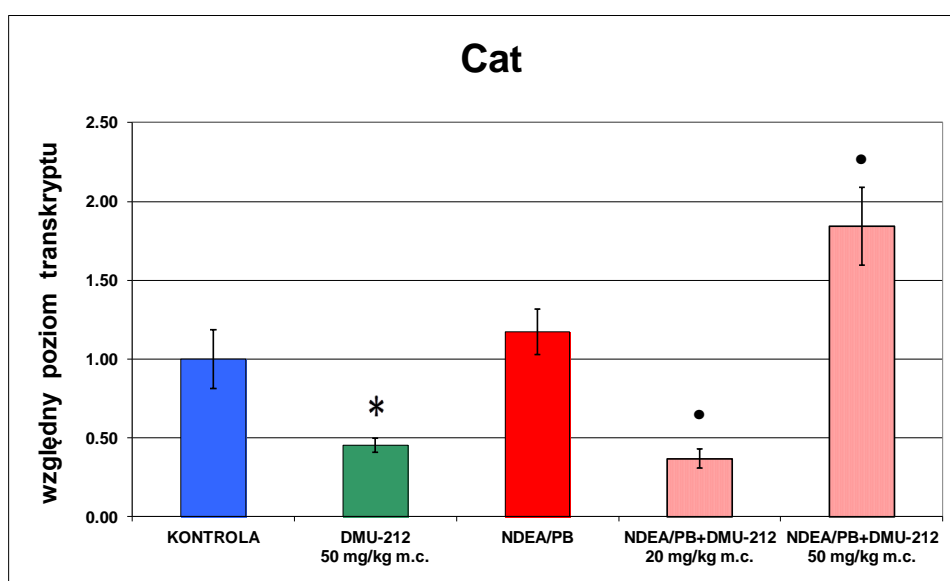
#### 4.2.2. Cat

U szczurów narażonych na kancerogen nie zanotowano zmian w poziomie transkryptu Cat w porównaniu z grupą kontrolną. Łączne podanie NDEA/PB i DMU-212 spowodowało 68% obniżenie oraz 57% wzrost ekspresji mRNA, odpowiednio po niższej i wyższej dawce, w porównaniu z grupą narażoną na kancerogen. Pod wpływem samego związku badanego nastąpiło 55% obniżenie poziomu transkryptu (tabela 4.14; ryc. 4.14).

Tabela 4.14. Zmiany poziomu mRNA Cat w wątrobie szczurów

Ekspozycja	Względny poziom transkryptu Cat średnia ± SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrwaną
kontrola	1,00 ± 0,18	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	0,45 ± 0,04	↓55*	-
NDEA/PB	1,17 ± 0,15	bz	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	0,37 ± 0,06	-	↓68•
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	1,84 ± 0,25	-	↑57•

Różnica znamienne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \* $p < 0,05$  oraz w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB • $p < 0,05$ ; bz – bez zmian



Ryc. 4.14. Zmiany poziomu mRNA Cat w wątrobie szczurów

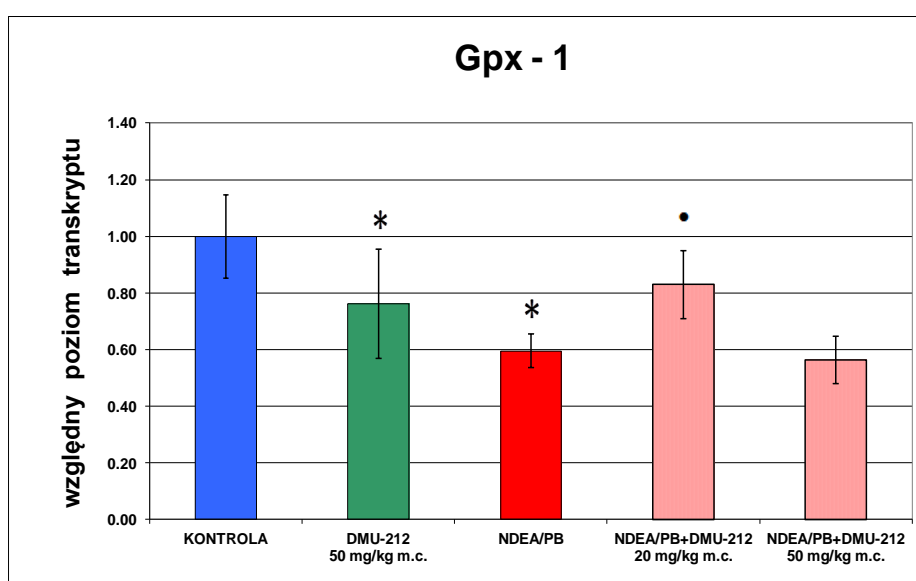
### 4.2.3. Gpx-1

W grupie szczurów narażonych na NDEA/PB obserwowano 40% obniżenie poziomu transkryptu w porównaniu z grupą kontrolną. Łączne podanie kancerogenu i związku badanego spowodowało zmianę, 41% wzrost ekspresji mRNA, tylko w grupie otrzymującej niższą dawkę w porównaniu z wartościami uzyskanymi u szczurów narażonych na kancerogen. Sam DMU-212 spowodował 24% obniżenie poziomu transkryptu (tabela 4.15; ryc. 4.15).

Tabela 4.15. Zmiany poziomu mRNA Gpx-1 w wątrobie szczurów

<b>Ekspozycja</b>	<b>Względny poziom transkryptu Gpx-1 średnia ± SD</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą kontrolną</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą zatrawaną</b>
<b>kontrola</b>	1,00 ± 0,15	-	-
<b>DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	0,76 ± 0,19	↓24*	-
<b>NDEA/PB</b>	0,59 ± 0,06	↓40*	-
<b>NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.</b>	0,83 ± 0,12	-	↑41•
<b>NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	0,56 ± 0,08	-	bz

Różnica znamienne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \*p<0,05 oraz w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB •p<0,05; bz – bez zmian



Ryc. 4.15. Zmiany poziomu mRNA Gpx-1 w wątrobie szczurów

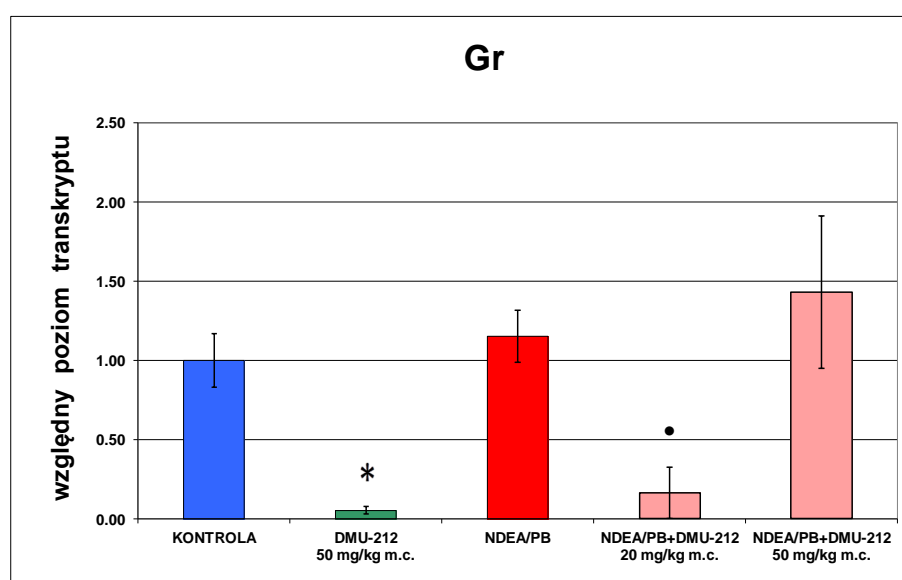
#### 4.2.4. Gr

Narażenie na NDEA/PB nie spowodowało zmiany poziomu transkryptu enzymu w porównaniu z grupą kontrolną. Skutkiem łącznego podania kancerogenu i DMU-212 było 86% obniżenie i 24% wzrost ekspresji mRNA, odpowiednio po niższej i wyższej dawce związku. Po podaniu samego DMU-212 nastąpiło 95% obniżenie poziomu mRNA (tabela 4.16; ryc. 4.16).

**Tabela 4.16.** Zmiany poziomu mRNA Gr w wątrobie szczurów

Ekspozycja	Względny poziom transkryptu Gr średnia ± SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrwaną
kontrola	1,00 ± 0,17	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	0,05 ± 0,02	↓95*	-
NDEA/PB	1,15 ± 0,17	Bz	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	0,16 ± 0,16	-	↓86•
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	1,43 ± 0,48	-	↑24

Różnica znamienne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \*p<0,05 oraz w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB •p<0,05; bz – bez zmian



Ryc. 4.16. Zmiany poziomu mRNA Gr w wątrobie szczurów

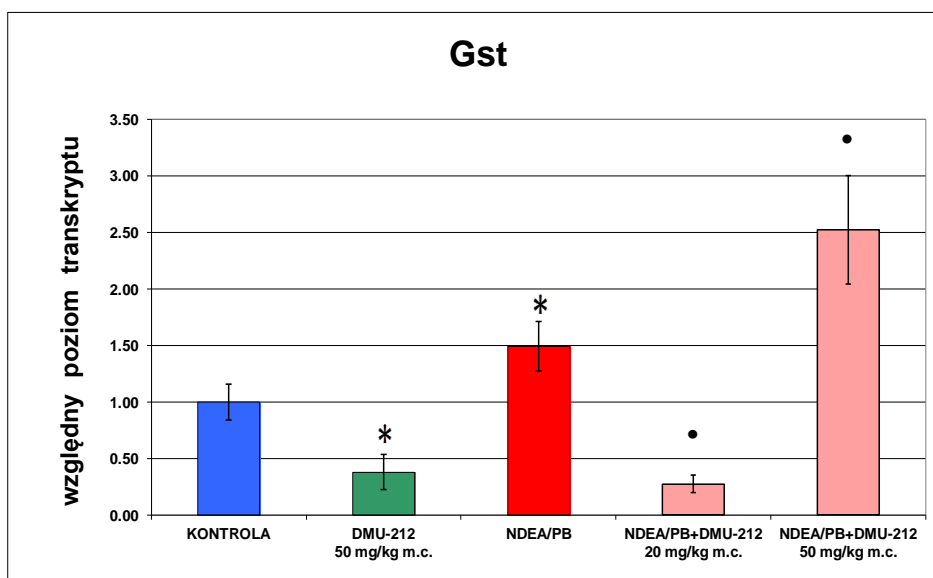
#### 4.2.5. Gst

U szczurów narażonych na NDEA/PB nastąpił 49% wzrost poziomu transkryptu w porównaniu z grupą kontrolną. W grupach, które dodatkowo otrzymywały badany związek obserwowano 82% obniżenie i 69% wzrost poziomu mRNA, odpowiednio po niższej i wyższej dawce. Podanie samego DMU-212 spowodowało 62% obniżenie ekspresji mRNA w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 4.17; ryc. 4.17).

Tabela 4.17. Zmiany poziomu mRNA Gst w wątrobie szczurów

Ekspozycja	Względny poziom transkryptu Gst średnia $\pm$ SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrawaną
kontrola	1,00 $\pm$ 0,16	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	0,38 $\pm$ 0,15	↓62*	-
NDEA/PB	1,49 $\pm$ 0,22	↑49*	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	0,28 $\pm$ 0,08	-	↓82•
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	2,53 $\pm$ 0,48	-	↑69•

Różnica znamiennej statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \* $p < 0,05$  oraz w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB • $p < 0,05$



Ryc. 4.17. Zmiany poziomu mRNA Gst w wątrobie szczurów

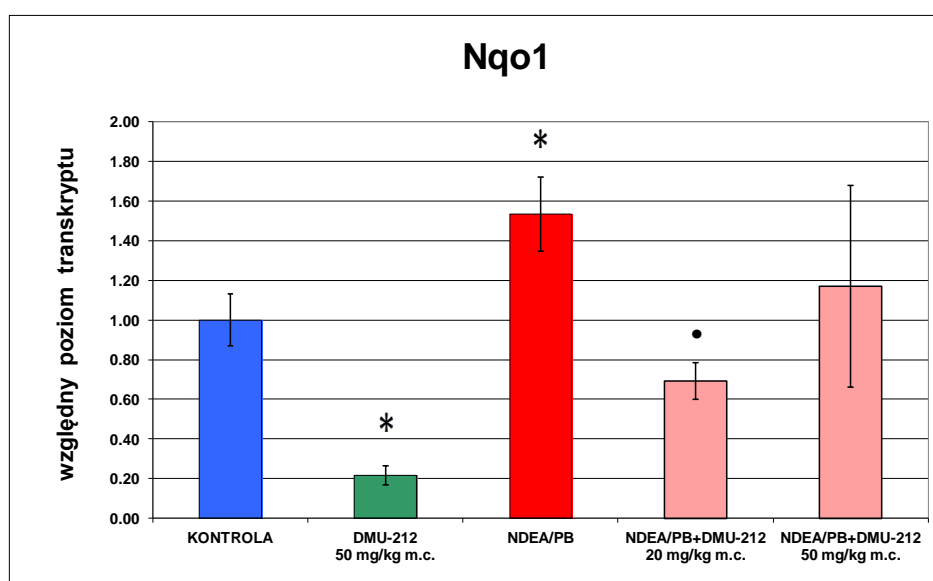
#### 4.2.6. Nqo1

Narażenie szczurów na kancerogen spowodowało 53% wzrost ekspresji mRNA enzymu. Po łącznym podaniu NDEA/PB i obu dawek DMU-212 obserwowano obniżenie poziomu transkryptu, odpowiednio o 55% i 24%. U zwierząt otrzymujących sam DMU-212 zanotowano 79% obniżenie poziomu mRNA w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 4.18; ryc. 4.18).

Tabela 4.18. Zmiany poziomu mRNA Nqo1 w wątrobie szczurów

Ekspozycja	Względny poziom transkryptu Nqo1 średnia $\pm$ SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrawaną
kontrola	1,00 $\pm$ 0,13	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	0,22 $\pm$ 0,05	↓79*	-
NDEA/PB	1,53 $\pm$ 0,19	↑53*	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	0,69 $\pm$ 0,09	-	↓55•
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	1,17 $\pm$ 0,51	-	↓24

Różnica znamiennej statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \* $p < 0,05$  oraz w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB • $p < 0,05$



Ryc. 4.18. Zmiany poziomu mRNA Nqo1 w wątrobie szczurów

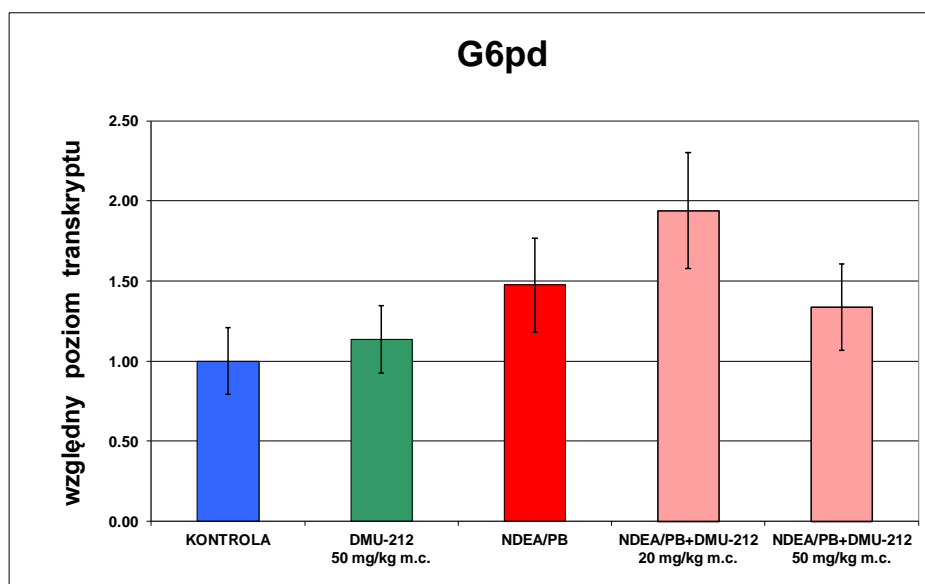


#### 4.2.7. G6pd

U szczurów narażonych na kancerogen nastąpił 47% wzrost poziomu transkryptu. Łączne podanie NDEA/PB i DMU-212 spowodowało zmianę ekspresji mRNA w przeciwnych kierunkach: 31% wzrost i 10% obniżenie, odpowiednio po niższej i wyższej dawce. Zauważono również lekki wzrost ekspresji G6pd w grupie otrzymującej sam DMU-212 w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 4.19; ryc. 4.19).

Tabela 4.19. Zmiany poziomu mRNA G6pd w wątrobie szczurów

Ekspozycja	Względny poziom transkryptu G6pd średnia $\pm$ SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrutą
kontrola	1,00 $\pm$ 0,21	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	1,14 $\pm$ 0,21	$\uparrow$ 13	-
NDEA/PB	1,48 $\pm$ 0,29	$\uparrow$ 47	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	1,94 $\pm$ 0,36	-	$\uparrow$ 31
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	1,34 $\pm$ 0,27	-	$\downarrow$ 10



Ryc. 4.19. Zmiany poziomu mRNA G6pd w wątrobie szczurów

#### 4.3. Wpływ 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-212) na wybrane parametry funkcji wątroby i nerek u szczurów narażonych na NDEA/PB.

U szczurów narażonych na NDEA/PB odnotowano znamienne statystycznie wzrost aktywności markerów funkcji wątroby w surowicy: aminotransferazy asparaginianowej (AST) o 35%, gamma-glutamylotransferazy (GGT) o 54%, dehydrogenazy mleczanowej (LDH) o 25%, dehydrogenazy sorbitolowej (SDH) o 42%. Obserwowano również 51% wzrost stężenia kreatyniny, markera funkcji nerek. Aktywność LDH i SDH w surowicy zwierząt narażonych na NDEA/PB obniżyła się pod wpływem obu dawek DMU-212 odpowiednio o 17% i 12% (LDH) oraz o 32% (SDH). Stężenie kreatyniny obniżyło się o 25% u szczurów otrzymujących niższą dawkę związku. Sam związek badany znacząco podwyższył aktywność GGT, o 31% (tabela 4.20).

Tabela 4.20. Wpływ 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu na wybrane parametry funkcji wątroby i nerek u szczurów

Parametry	Ekspozycja				
	Kontrola	DMU-212	NDEA/PB	NDEA/PB + DMU-212 20mg/kg m.c.	NDEA/PB + DMU-212 50mg/kg m.c.
ALT [IU/l]	49,6 ± 9,5	48,0 ± 8,9	57,5 ± 8,9	45,6 ± 6,1 [↓21%]	46,6 ± 6,9 [↓19%]
AST [IU/l]	59,2 ± 4,3	68,7 ± 8,4	79,9 ± 8,9 <sup>A)</sup> [↑35%]	72,2 ± 10,3	75,2 ± 9,7
GGT [IU/l]	4,44 ± 0,63	5,81 ± 0,71 <sup>A)</sup> [↑31%]	6,83 ± 0,99 <sup>A)</sup> [↑54%]	6,41 ± 0,88	6,37 ± 0,66
LDH [IU/l]	202,4 ± 38,4	173,5 ± 36,6	253,3 ± 18,7 <sup>A)</sup> [↑25%]	210,8 ± 21,8 <sup>B)</sup> [↓17%]	221,8 ± 35,2 <sup>B)</sup> [↓12%]
SDH [IU/l]	5,12 ± 0,79	4,85 ± 0,97	7,25 ± 0,88 <sup>A)</sup> [↑42%]	4,94 ± 1,0 <sup>B)</sup> [↓32%]	4,91 ± 0,74 <sup>B)</sup> [↓32%]
Kreatynina [mg/dl]	0,46 ± 0,09	0,43 ± 0,09	0,69 ± 0,14 <sup>A)</sup> [↑51%]	0,52 ± 0,10 <sup>B)</sup> [↓25%]	0,58 ± 0,13

W nawiasach podano procent zmian;

A) zmiana znamienne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną,  $p < 0,05$

B) zmiana znamienne statystycznie w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB,  $p < 0,05$

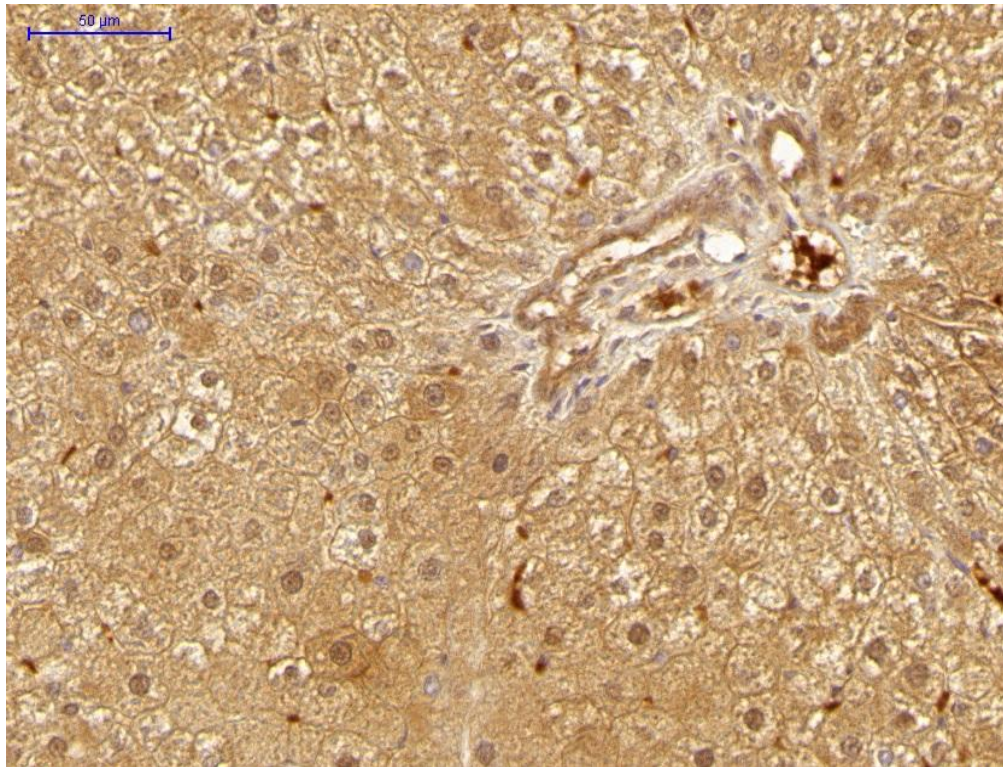
ALT - aminotransferaza alaninowa; AST - aminotransferaza asparaginianowa;

GGT-  $\gamma$ - glutamylotransferaza; LDH - dehydrogenaza mleczanowa;

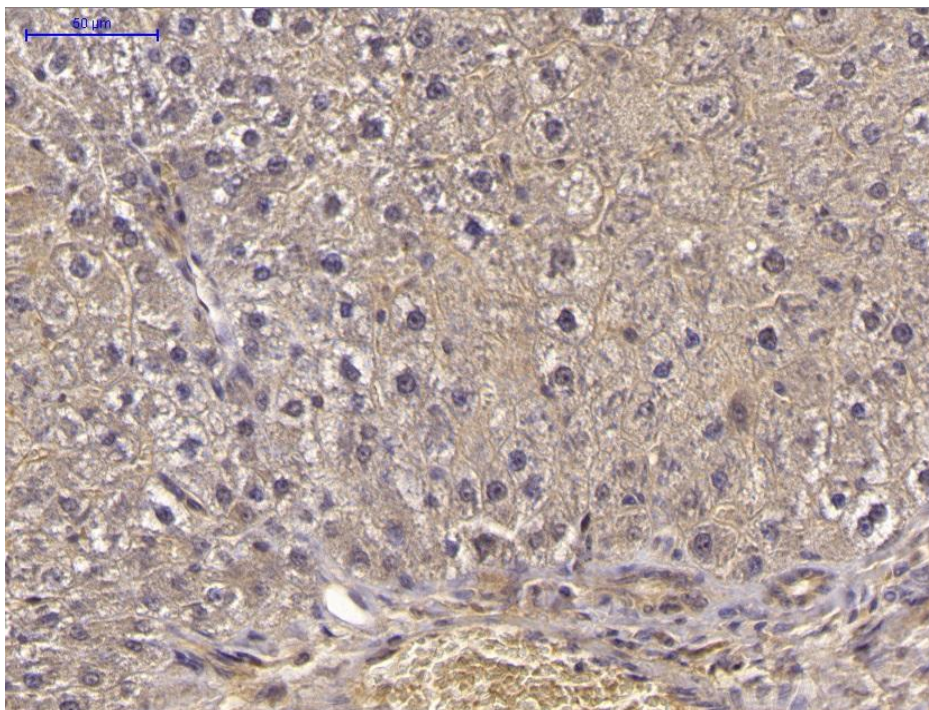
SDH - dehydrogenaza sorbitolowa

#### **4.4. Wpływ 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-212) na ekspresję wybranych białek w wątrobie szczurów narażonych na NDEA/PB - badania immunohistochemiczne**

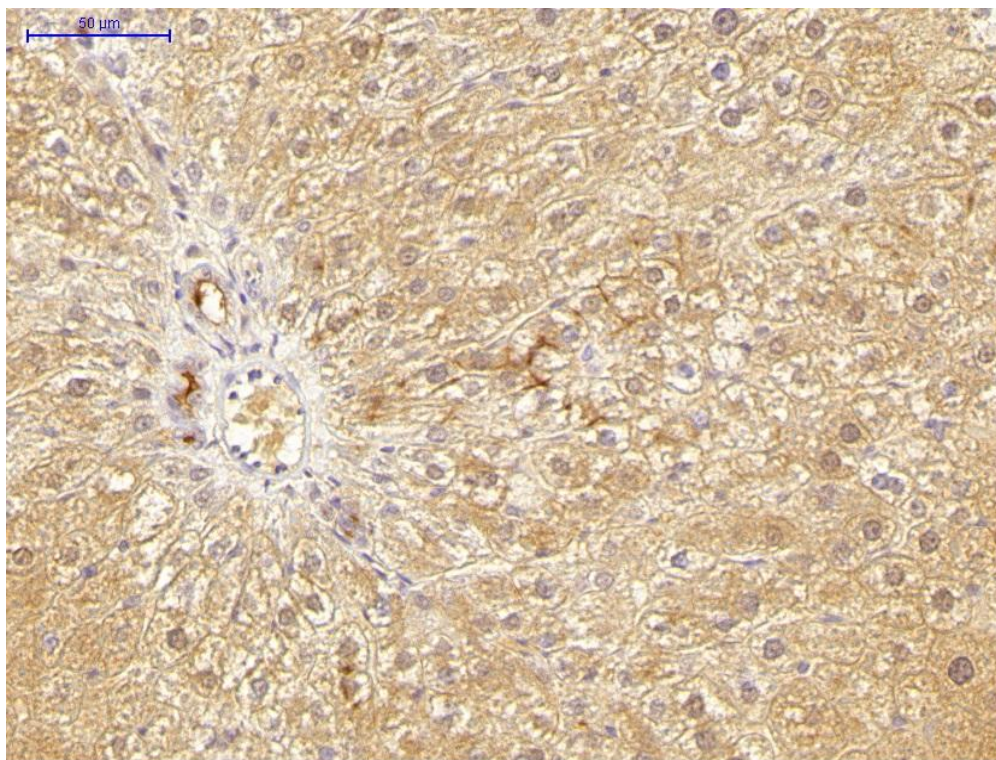
- W żadnej grupie szczurów nie zanotowano ekspresji następujących białek:
  - pGST (izoforma łożyskowa S-transferazy glutationowej)
  - Ki67 (niehistonowe białko jądrowe)
  - PCNA (jądrowy antygen komórek proliferujących)
- Zarówno w grupie kontrolnej jak też u zwierząt otrzymujących sam DMU-212 nie obserwowano ekspresji następujących białek:
  - p53 (*ang. protein 53*),
  - gamma-glutamylotransferaza (GGT),
  - Rb1 (*ang. retinoblastoma associated protein*),
  - czynnik wzrostu TGF $\alpha$  (*ang. transforming growth factor  $\alpha$* )
- Pod wpływem NDEA/PB wystąpiła wyraźna ekspresja p53, GGT, TGF $\alpha$  (ryc. 4.20, ryc. 4.22, ryc. 4.26) oraz obserwowano pojedyncze komórki z ekspresją Rb1 (ryc. 4.24).
- U zwierząt, którym podawano obie dawki DMU-212 ekspresja białka p53 została zahamowana (ryc. 4.21). Ekspresja GGT uległa zmniejszeniu tylko w grupie zwierząt otrzymujących niższą dawkę DMU-212 (ryc. 4.23). Ekspresja białka Rb1 u zwierząt z zainicjowaną kancerogenezą zanikła pod wpływem wyższej dawki DMU-212 (ryc. 4.25). Podawanie DMU-212 nie zmniejszyło ekspresji TGF $\alpha$  (ryc. 4.27).



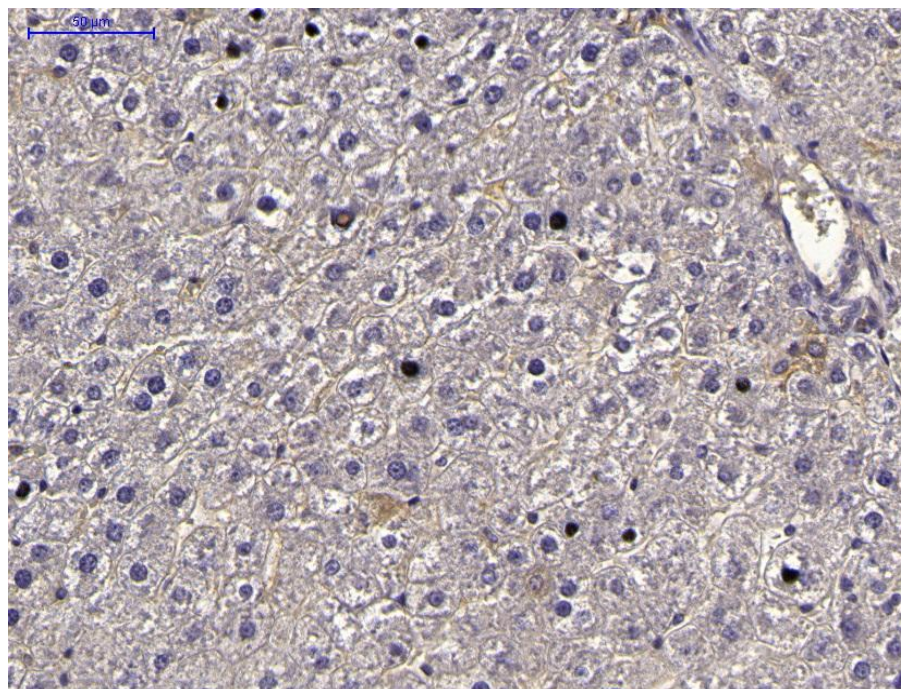
Ryc. 4.20. Immunohistochemiczne barwienie białka p53.  
Obraz wątroby szczura narażonego na NDEA/PB



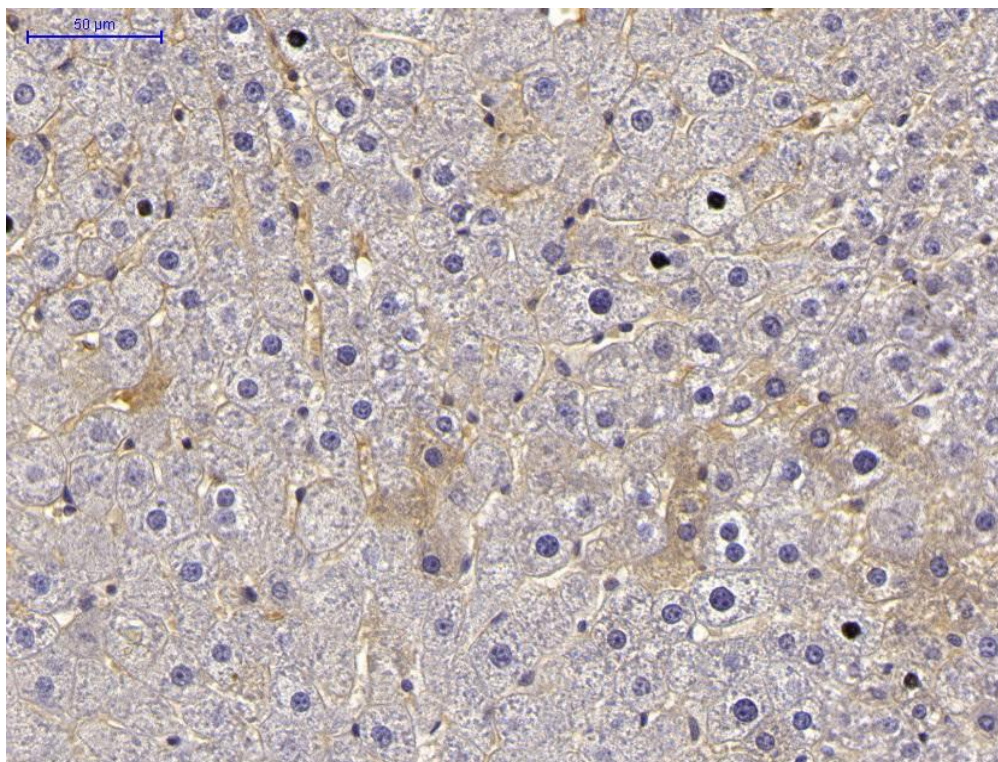
Ryc. 4.21. Immunohistochemiczne barwienie białka p53.  
Obraz wątroby szczura otrzymującego łącznie NDEA/PB i DMU-212. Widoczne  
zmniejszenie ekspresji p53



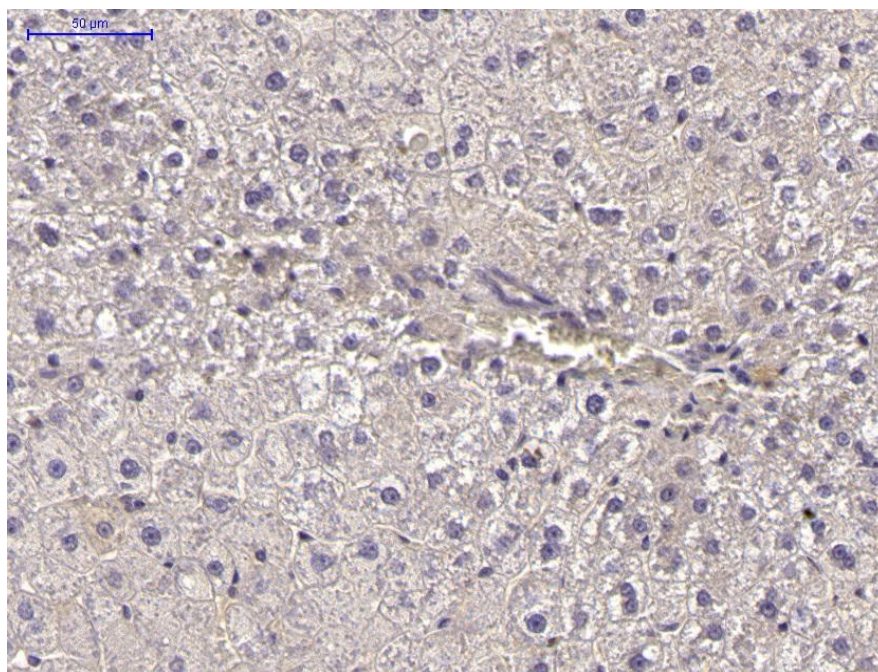
Ryc. 4.22. Immunohistochemiczne barwienie białka GGT.  
Obraz wątroby szczura narażonego na NDEA/PB



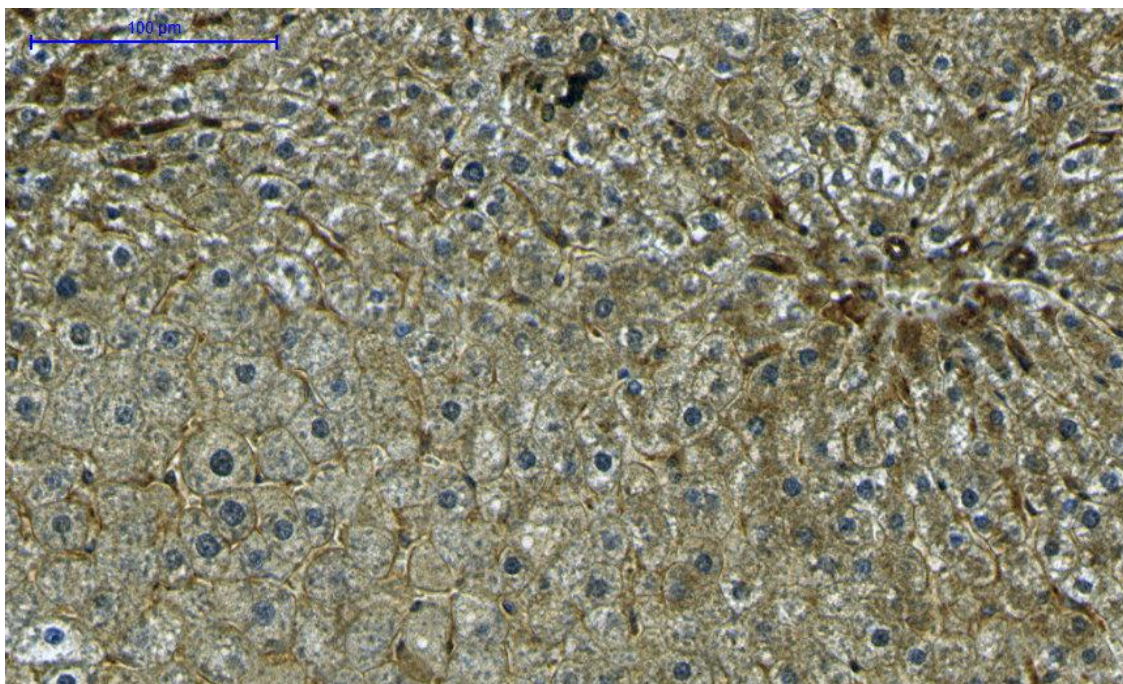
Ryc. 4.23. Immunohistochemiczne barwienie GGT.  
Obraz wątroby szczura otrzymującego łącznie NDEA/PB i DMU-212 (20mg/kg m.c.).  
Widoczne zmniejszenie ekspresji GGT



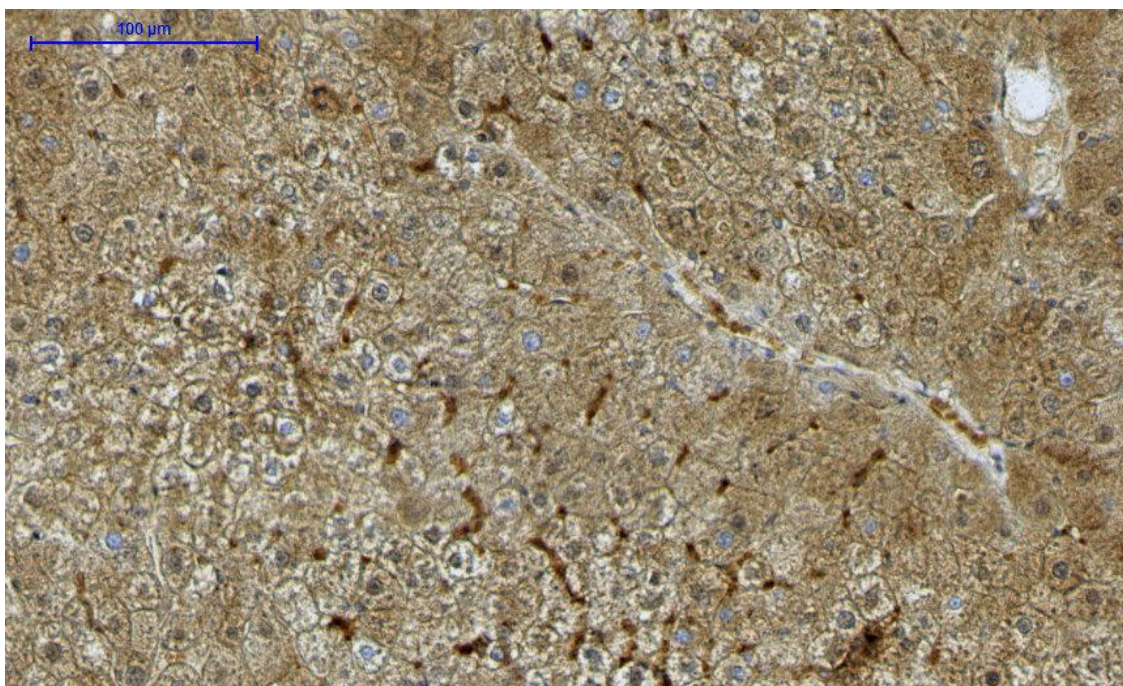
Ryc. 4.24. Immunohistochemiczne barwienie białka Rb1.  
Obraz wątroby szczura narażonego na NDEA/PB



Ryc. 4.25. Immunohistochemiczne barwienie białka Rb1.  
Obraz wątroby szczura otrzymującego łącznie NDEA/PB i DMU-212 (50 mg/kg mc).  
Widoczne zmniejszenie ekspresji Rb1



Ryc. 4.26. Immunohistochemiczne barwienie białka TGF $\alpha$ .  
Obraz wątroby szczura narażonego na NDEA/PB



Ryc. 4.27. Immunohistochemiczne barwienie białka TGF $\alpha$ .  
Obraz wątroby szczura otrzymującego łącznie NDEA/PB i DMU-212. Ekspresja białka  
nie zmniejszyła się

#### 4.5. Wpływ 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu (DMU-212) na parametry obrony antyoksydacyjnej w nerkach szczurów narażonych na NDEA/PB

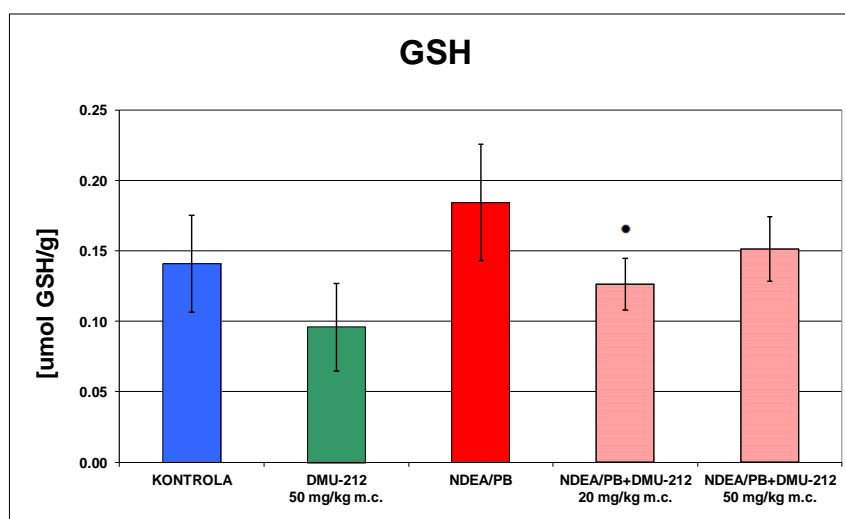
##### 4.5.1. Glutation zredukowany (GSH)

W nerkach szczurów narażonych na NDEA/PB odnotowano 31% nieznamienny statystycznie wzrost poziomu GSH. Obie dawki DMU-212 spowodowały obniżenie zawartości GSH do poziomu zbliżonego do wartości oznaczonych w grupie kontrolnej. Sam związek badany spowodował obniżenie stężenia GSH o 32% (różnica nieznamienna statystycznie) w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 4.21; ryc. 4.28).

Tabela 4.21. Stężenie glutationu zredukowanego (GSH) w nerkach szczurów

Ekspozycja	Stężenie GSH [umol GSH/g] średnia ± SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrawaną
kontrola	0,14 ± 0,03	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	0,10 ± 0,03	↓32	-
NDEA/PB	0,18 ± 0,04	↑31	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	0,13 ± 0,02	-	↓31•
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	0,15 ± 0,02	-	↓18

Różnica znamienna statystycznie w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB  
•p<0,05



Ryc. 4.28. Stężenie glutationu zredukowanego (GSH) w nerkach szczurów



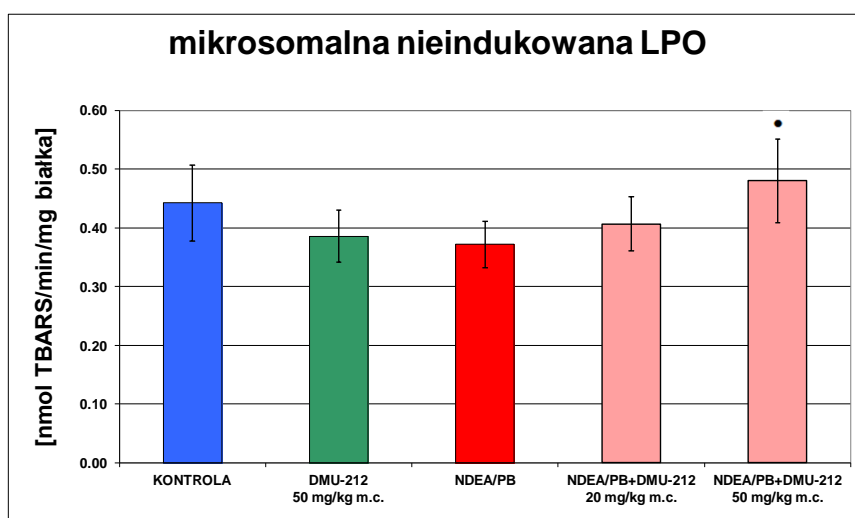
#### 4.5.2. Poziom peroksydacji lipidów (LPO) nieindukowanej

W nerkach zwierząt narażonych na NDEA/PB odnotowano niewielkie, 16% obniżenie poziomu peroksydacji lipidów we frakcji mikrosomalnej nerek. Podawanie szczurom wyższej dawki DMU-212 w pewnym stopniu zwiększyło nasilenie uszkodzeń powodując wzrost poziomu TBARS o 29%. U szczurów otrzymujących sam DMU-212 nie stwierdzono istotnej statystycznie zmiany tego parametru w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 4.22; ryc. 4.29).

Tabela 4.22. Poziom mikrosomalnej nieindukowanej peroksydacji lipidów (LPO) w nerkach szczurów

<b>Ekspozycja</b>	<b>LPO [nmol TBARS/min/mg białka] średnia ± SD</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą kontrolną</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą zatrwaną</b>
<b>kontrola</b>	0,44 ± 0,07	-	-
<b>DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	0,39 ± 0,04	↓13	-
<b>NDEA/PB</b>	0,37 ± 0,04	↓16	-
<b>NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.</b>	0,41 ± 0,05	-	↑9
<b>NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	0,48 ± 0,07	-	↑29•

Różnica znamiennej statystycznie w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB  
•p<0,05



Ryc. 4.29. Poziom mikrosomalnej nieindukowanej peroksydacji lipidów (LPO) w nerkach szczurów

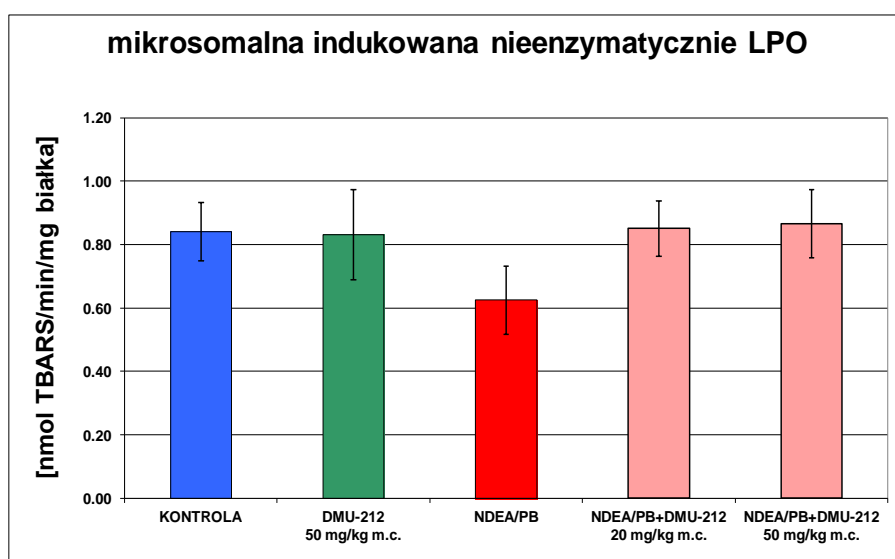
### 4.5.3. Poziom peroksydacji lipidów (LPO) indukowanej nieenzymatycznie

W nerkach zwierząt narażonych na NDEA/PB poziom peroksydacji lipidów w frakcji mikrosomalnej obniżył się o 26% w porównaniu do grupy kontrolnej ale powrócił do stanu zbliżonego do grupy kontrolnej u zwierząt traktowanych obiema dawkami DMU-212. Z kolei u szczurów otrzymujących sam DMU-212 nie stwierdzono żadnych zmian w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 4.23; ryc. 4.30).

Tabela 4.23. Poziom mikrosomalnej indukowanej nieenzymatycznie (układem  $Fe^{2+}$ /askorbinian) peroksydacji lipidów (LPO) w nerkach szczurów

<b>Ekspozycja</b>	<b>LPO [nmol TBARS/min/mg białka] średnia ± SD</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą kontrolną</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą zatrwaną</b>
<b>kontrola</b>	0,84 ± 0,09	-	-
<b>DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	0,83 ± 0,14	bz	-
<b>NDEA/PB</b>	0,62 ± 0,11	↓26	-
<b>NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.</b>	0,85 ± 0,09	-	↑36
<b>NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	0,87 ± 0,11	-	↑39

bz – bez zmian



Ryc. 4.30. Poziom mikrosomalnej indukowanej nieenzymatycznie (układem  $Fe^{2+}$ /askorbinian) peroksydacji lipidów (LPO) w nerkach szczurów

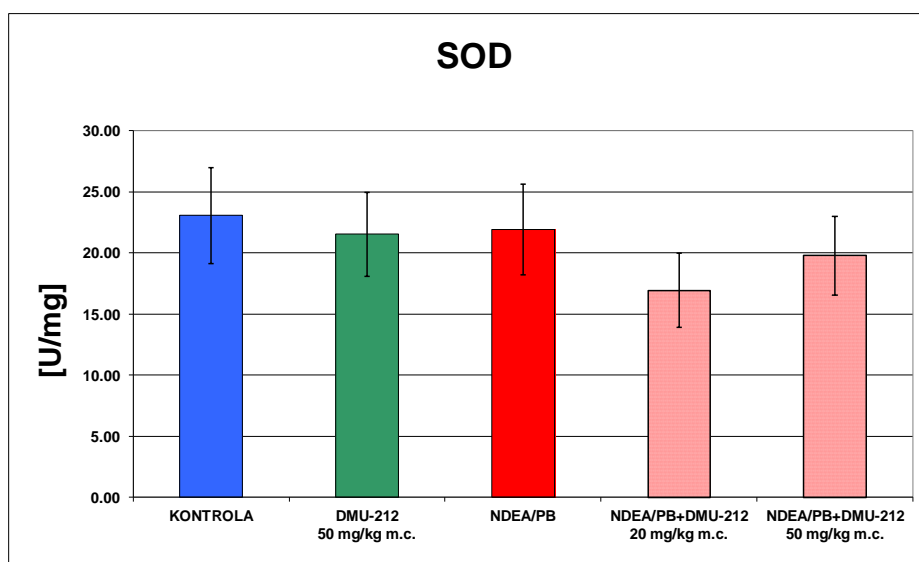
#### 4.5.4. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)

W nerkach szczurów narażonych na NDEA/PB nie wykazano zmiany aktywności SOD. Aktywność enzymu uległa obniżeniu pod wpływem obu dawek DMU-212 odpowiednio o 23% i 10%, jednak zmiana ta nie była znamienna statystycznie. U szczurów otrzymujących sam DMU-212 nie stwierdzono zmiany aktywności enzymu w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 4.24; ryc. 4.31).

Tabela 4.24. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w nerkach szczurów

<b>Ekspozycja</b>	<b>Aktywność SOD [U/mg] średnia ± SD</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą kontrolną</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą zatrwaną</b>
<b>kontrola</b>	23,07 ± 3,94	-	-
<b>DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	21,52 ± 3,44	bz	-
<b>NDEA/PB</b>	21,92 ± 3,70	bz	-
<b>NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.</b>	16,94 ± 3,04	-	↓23
<b>NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	19,80 ± 3,22	-	↓10

bz – bez zmian



Ryc. 4.31. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w nerkach szczurów

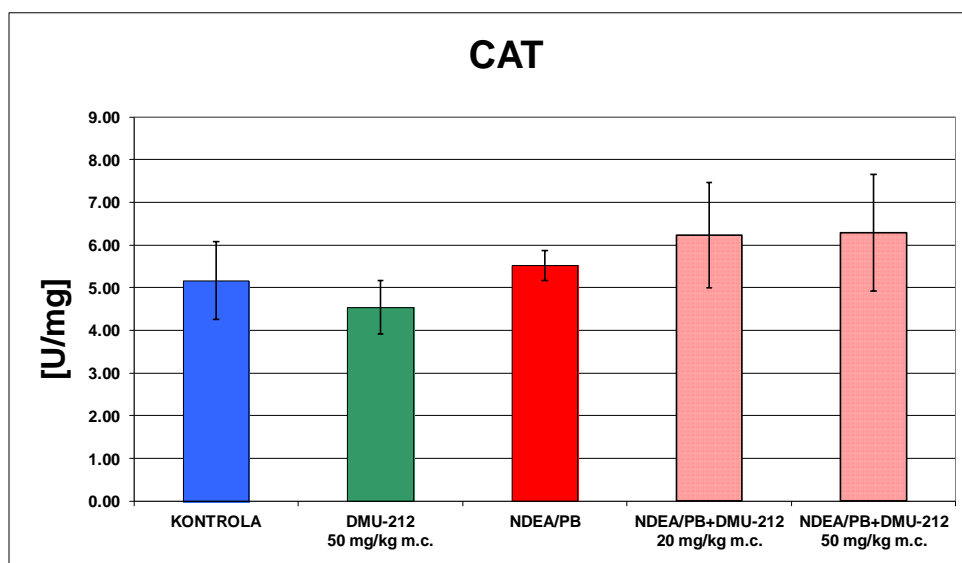
#### 4.5.5. Katalaza (CAT)

Niewielkie zmiany aktywności CAT obserwowane w nerkach szczurów nie wykazywały znamienności statystycznej. Podanie NDEA/PB nie wpłynęło na zmianę aktywności enzymu. Sam związek badany spowodował 12% obniżenie aktywności enzymu w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast w grupach szczurów traktowanych łącznie NDEA/PB i DMU-212 nastąpił nieznaczny wzrost aktywności enzymu (13% i 14%) (tabela 4.25; ryc. 4.32).

Tabela 4.25. Aktywność katalazy (CAT) w nerkach szczurów

<b>Ekspozycja</b>	<b>Aktywność CAT [U/mg] średnia ± SD</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą kontrolną</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą zatrwaną</b>
<b>kontrola</b>	5,17 ± 0,91	-	-
<b>DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	4,54 ± 0,63	↓12	-
<b>NDEA/PB</b>	5,52 ± 0,36	bz	-
<b>NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.</b>	6,23 ± 1,23	-	↑13
<b>NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	6,29 ± 1,36	-	↑14

bz – bez zmian



Ryc. 4.32. Aktywność katalazy (CAT) w nerkach szczurów

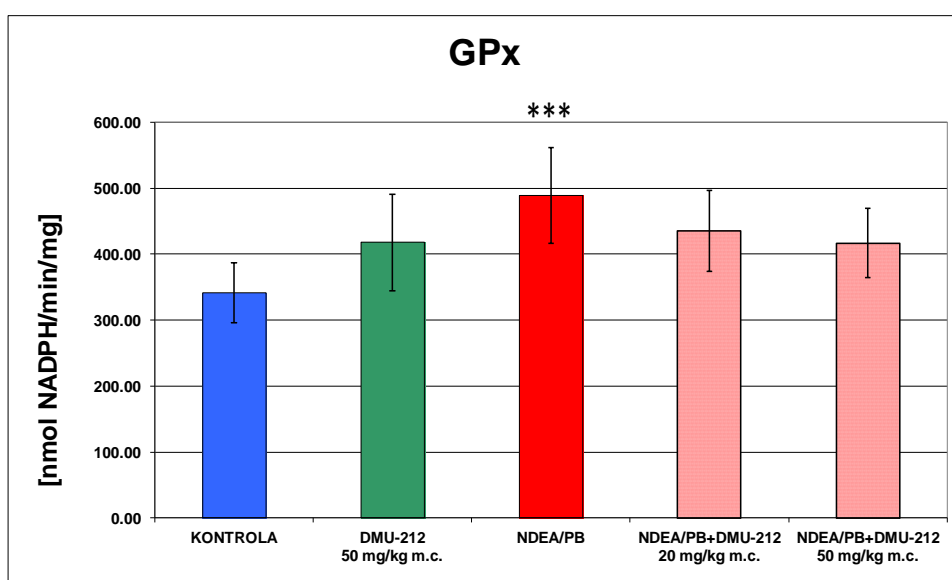
#### 4.5.6. Peroksydaza glutationowa (GPx)

W nerkach szczurów narażonych na NDEA/PB odnotowano 43% wzrost aktywności GPx. Obie dawki DMU-212 spowodowały niezamienne statystycznie obniżenie aktywności enzymu, odpowiednio o 11% i 15%. U zwierząt, którym podawano sam DMU-212 nastąpił wyraźny chociaż nieznamienisty statystycznie wzrost aktywności GPx o 22% (tabela 4.26; ryc. 4.33).

Tabela 4.26. Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) w nerkach szczurów

Ekspozycja	Aktywność GPx [nmol NADPH/min/mg] średnia ± SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrwaną
kontrola	341,54 ± 45,06	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	417,83 ± 72,91	↑22	-
NDEA/PB	488,36 ± 72,47	↑43***	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	434,90 ± 61,04	-	↓11
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	416,41 ± 52,41	-	↓15

Różnica znamienista statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \*\*\*p < 0,001



Ryc. 4.33. Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) w nerkach szczurów

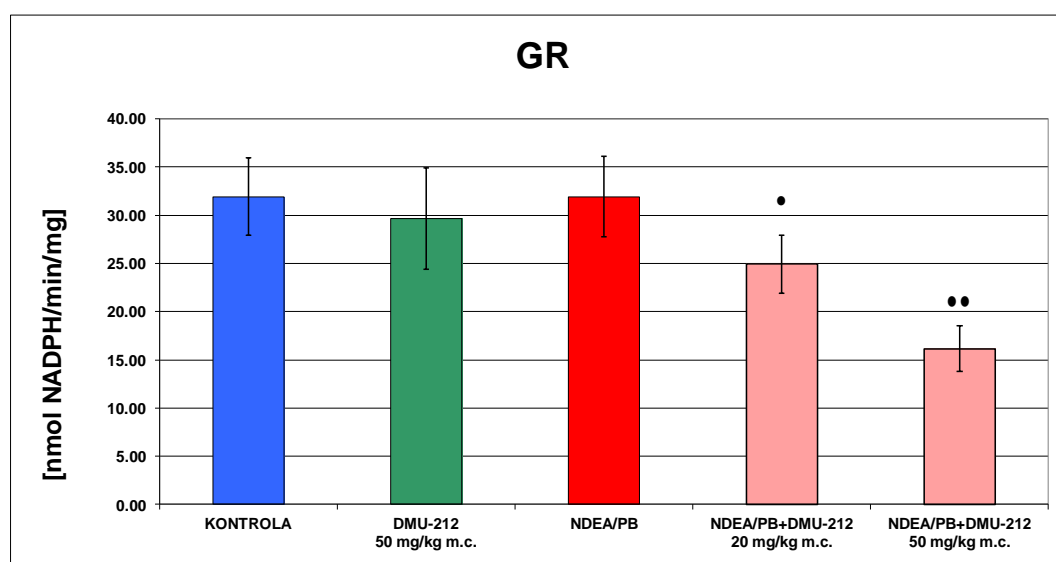
#### 4.5.7. Reduktaza glutationowa (GR)

W nerkach szczurów narażonych na NDEA/PB oraz otrzymujących sam DMU-212 aktywność GR nie uległa zmianie. Natomiast w grupach, którym podawano łącznie NDEA/PB i DMU-212 nastąpiło zależne od dawki obniżenie aktywności enzymu, odpowiednio o 22% i 49% (tabela 4.27; ryc. 4.34).

Tabela 4.27. Aktywność reduktazy glutationowej (GR) w nerkach szczurów

Ekspozycja	Aktywność GR [nmol NADP/min/mg] średnia ± SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrutą
kontrola	31,93 ± 4,00	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	29,67 ± 5,25	bz	-
NDEA/PB	31,92 ± 4,17	bz	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	24,92 ± 3,01	-	↓22•
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	16,15 ± 2,37	-	↓49••

Różnica znamienne statystycznie w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB  
•p<0,05, •• p < 0,01; bz – bez zmian



Ryc. 4.34. Aktywność reduktazy glutationowej (GR) w nerkach szczurów

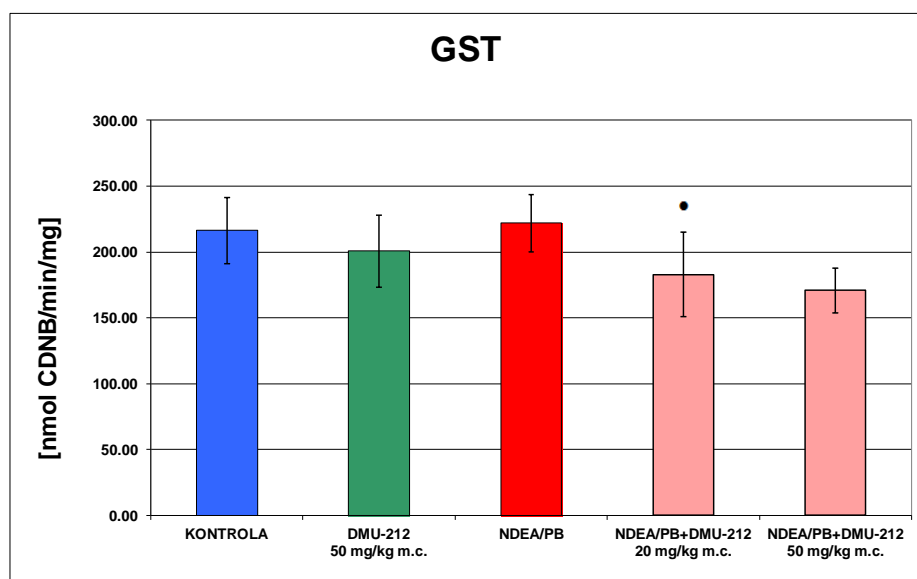
#### 4.5.8. S-transferaza glutationowa (GST)

Identyczny układ wyników uzyskano dla S-transferazy glutationowej. W nerkach szczurów narażonych na NDEA/PB i otrzymujących sam DMU-212 aktywność GST nie uległa zmianie. Natomiast w grupach, którym podawano łącznie NDEA/PB i DMU-212 nastąpiło obniżenie aktywności enzymu, odpowiednio o 18% i 23% w porównaniu z grupą zatrwaną (tabela 4.28; ryc. 4.35).

Tabela 4.28. Aktywność S-transferazy glutationowej (GST) w nerkach szczurów

<b>Ekspozycja</b>	<b>Aktywność GST [nmol DCNB/min/mg] średnia ± SD</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą kontrolną</b>	<b>% zmian w porównaniu z grupą zatrwaną</b>
<b>kontrola</b>	216,33 ± 24,98	-	-
<b>DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	200,65 ± 27,34	bz	-
<b>NDEA/PB</b>	221,87 ± 21,59	bz	-
<b>NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.</b>	182,84 ± 32,18	-	↓18•
<b>NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.</b>	170,76 ± 17,01	-	↓23

Różnica znamienne statystycznie w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB  
•p<0,05; bz – bez zmian



Ryc. 4.35. Aktywność S-transferazy glutationowej (GST) w nerkach szczurów

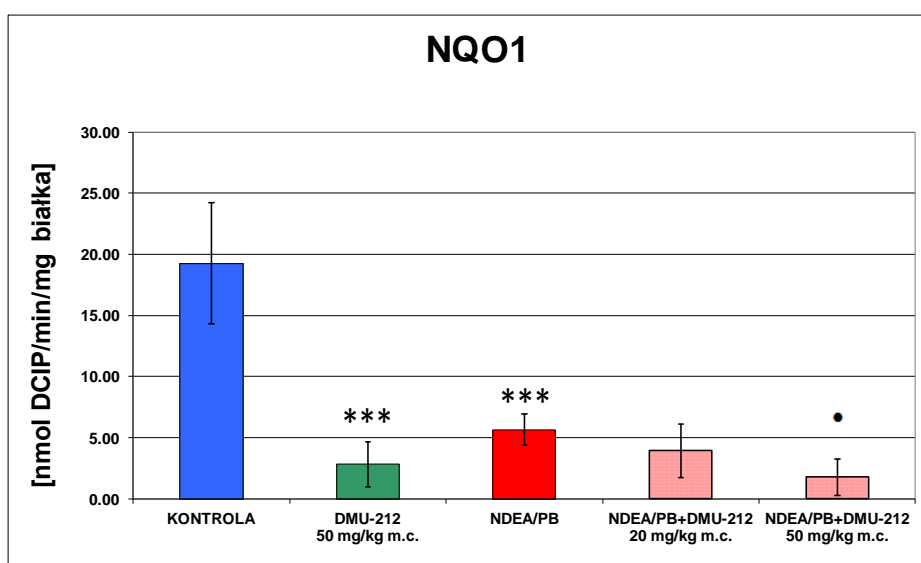
#### 4.5.9. Oksydoreduktaza NADP(H):chinon (NQO1)

W nerkach szczurów narażonych na NDEA/PB odnotowano znaczne obniżenie aktywności NQO1, o 71%. Podobnie znaczące obniżenie aktywności enzymu, o 85%, stwierdzono w grupie otrzymującej sam DMU-212. Obie dawki związku spowodowały dalsze obniżenie aktywności enzymu, odpowiednio o 31% i 69%, w porównaniu z grupą narażoną na NDEA/PB (tabela 4.29; ryc. 4.36).

Tabela 4.29. Aktywność oksydoreduktazy NADP(H):chinon (NQO1) w nerkach szczurów

Ekspozycja	Aktywność NQO1 [nmol DCIP/min/mg białka] średnia ± SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrawaną
kontrola	19,26 ± 4,96	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	2,81 ± 0,72	↓85***	-
NDEA/PB	5,66± 1,26	↓71***	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	3,92 ± 2,19	-	↓31
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	1,77 ± 0,51	-	↓69•

Różnica znamionna statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną \*\*\*p<0,001 oraz w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB •p<0,05



Ryc. 4.36. Aktywność oksydoreduktazy NADP(H):chinon (NQO1) w nerkach szczurów



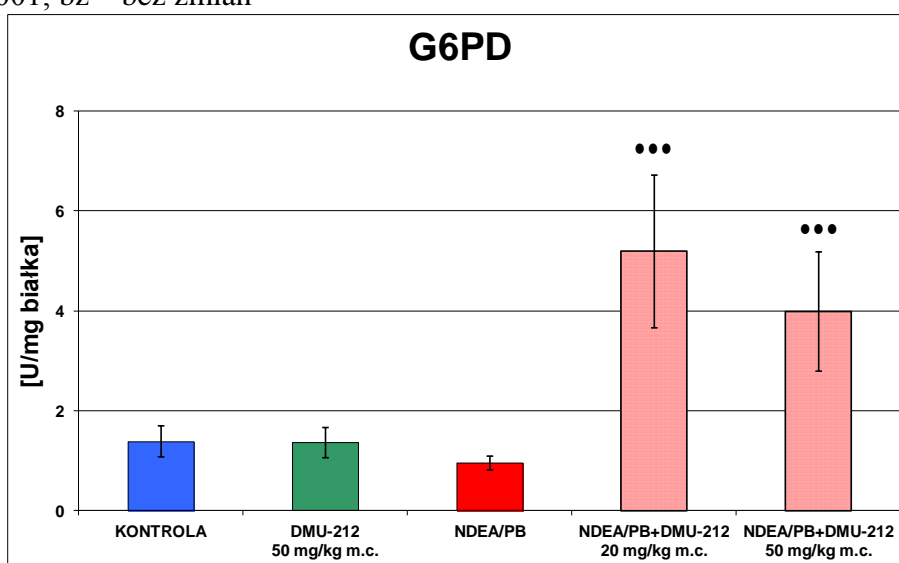
#### 4.5.10. Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD)

W nerkach szczurów narażonych na NDEA/PB odnotowano obniżenie aktywności G6PD o 31 %, chociaż zmiana ta nie miała charakteru znamienności statystycznej. Obie dawki DMU-212 spowodowały znaczący wzrost aktywności enzymu, odpowiednio 4,5- i ponad 3-krotny w porównaniu z grupą narażoną na NDEA/PB. Z kolei w grupie otrzymującej sam DMU-212 nie zaobserwowano zmian (tabela 4.30; ryc. 4.37).

Tabela 4.30. Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PD) w nerkach szczurów

Ekspozycja	Aktywność G6PD [U/mg białka] średnia ± SD	% zmian w porównaniu z grupą kontrolną	% zmian w porównaniu z grupą zatrawaną
kontrola	1,38 ± 0,31	-	-
DMU-212 50mg/kg m.c.	1,36 ± 0,31	bz	-
NDEA/PB	0,95 ± 0,14	↓31	-
NDEA/PB+DMU-212 20mg/kg m.c.	5,19 ± 1,53	-	↑447***
NDEA/PB+DMU-212 50mg/kg m.c.	3,98 ± 1,20	-	↑320***

Różnica znamienna statystycznie w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB  
 \*\*\*p<0,001; bz – bez zmian



Ryc. 4.37. Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PD) w nerkach szczurów

#### 4.6. Przyrost masy ciała zwierząt i masy wybranych narządów

Podczas trwania eksperymentu mierzono masy ciała wszystkich zwierząt użytych w doświadczeniu. Pomiary wykonano po 1 tygodniu, po 4 tygodniu i następnie co 4 tygodnie. Wyniki zamieszczono w tabeli 4.31.

Tabela 4.31. Średni przyrost masy ciała szczurów [g]

Czas	Ekspozycja				
	Kontrola	DMU-212	NDEA/PB	NDEA/PB + DMU-212 20mg/kg m.c.	NDEA/PB + DMU-212 50mg/kg m.c.
1 tydzień	53,1 ± 4,3	47,1 ± 6,0 <sup>A)</sup>	9,8 ± 2,0 <sup>A)</sup>	18,1 ± 4,0 <sup>B)</sup>	15,9 ± 2,3 <sup>B)</sup>
4 tydzień	109,8 ± 5,6	110,2 ± 6,8	141,2 ± 7,5 <sup>A)</sup>	136,6 ± 4,9	128,6 ± 5,5 <sup>B)</sup>
8 tydzień	77,6 ± 6,9	83,7 ± 6,0	90,8 ± 6,6 <sup>A)</sup>	97,7 ± 4,8	86,2 ± 5,5
12 tydzień	29,0 ± 4,5	27,6 ± 5,6	37,1 ± 4,7 <sup>A)</sup>	43,7 ± 4,0 <sup>B)</sup>	35,4 ± 3,6
16 tydzień	21,6 ± 5,9	28,2 ± 4,8 <sup>A)</sup>	33,0 ± 5,0 <sup>A)</sup>	23,6 ± 5,3 <sup>B)</sup>	23,2 ± 1,6 <sup>B)</sup>

A) zmiana znamionna statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną,  $p < 0,05$

B) zmiana znamionna statystycznie w porównaniu z grupą otrzymującą NDEA/PB,  $p < 0,05$

Największe różnice w przyroście masy ciała wystąpiły po 1 tygodniu doświadczenia w grupie narażonej na NDEA/PB w porównaniu do grupy kontrolnej – około 80% obniżenie. U szczurów otrzymujących łącznie NDEA/PB i DMU-212 obserwowano mniejsze obniżenie tego parametru (o 16% - 18%) w porównaniu z grupą narażoną na NDEA/PB co może świadczyć o korzystnym działaniu badanego związku.

Z kolei w następnych tygodniach przyrost masy ciała szczurów, które otrzymały NDEA/PB był o 17% - 30% większy niż u zwierząt w grupie kontrolnej. W grupach traktowanych łącznie NDEA/PB i DMU-212 wystąpiły niezależne od dawki i czasu eksperymentu zmiany w odniesieniu do zwierząt narażonych na NDEA/PB: 10% zmniejszenie przyrostu w grupie 50 mg/kg po 4 tygodniach, 19% zwiększenie przyrostu w grupie 20 mg/kg po 12 tygodniach oraz 30% zmniejszenie przyrostu w obu grupach po 16 tygodniach.

Podczas sekcji zwierząt pobrano wątrobę, nerki, płuca, śledzionę i zmierzono ich masę. Wyniki pomiarów w postaci względnych mas przedstawiono w tabeli 4.32.

Tabela 4.32. Względne masy narządów <sup>x</sup>

Narząd	Ekspozycja				
	Kontrola	DMU-212	NDEA/PB	NDEA/PB + DMU-212 20mg/kg m.c.	NDEA/PB + DMU-212 50mg/kg m.c.
<b>Wątroba</b>	36,57 ± 2,66	39,17 ± 2,80	41,78 ± 2,54 <sup>A)</sup>	44,74 ± 7,24	46,49 ± 3,71
<b>Nerki</b>	6,48 ± 0,47	6,51 ± 0,40	5,98 ± 0,62	6,31 ± 0,61	6,48 ± 0,58
<b>Śledziona</b>	2,14 ± 0,17	2,11 ± 0,25	1,87 ± 0,24 <sup>A)</sup>	1,95 ± 0,26	2,05 ± 0,15
<b>Płuca</b>	4,14 ± 0,40	4,18 ± 0,30	4,03 ± 0,27	4,04 ± 0,37	4,44 ± 0,69

A) zmiana znamienna statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną, p<0,05

x – masa narządu/masa ciała x 1000

Jedynymi znamiennymi statystycznie zmianami mas narządów zaobserwowanymi w niniejszym eksperymencie były niewielki wzrost masy wątroby i obniżenie masy śledziony u szczurów narażonych na NDEA/PB. Ze względu na niewielkie natężenie tych zmian nie przypisuje się im znaczenia biologicznego.

Zastosowany w pracy model kancerogenezy chemicznej polegający na podaniu pojedynczej dawki NDEA nie ma na celu wywołania wyraźnych efektów toksycznych. Pomiar masy ciała, stosowany powszechnie w badaniach na zwierzętach, jest mało

specyficznym, ale dość czułym wskaźnikiem uszkodzeń wywołanych przez ksenobiotyki. Przedstawione wyżej wyniki wskazują, że toksyczne działanie NDEA ujawniło się bezpośrednio po podaniu kancerogenu natomiast w następnych tygodniach przyrost masy ciała szczurów był nawet większy niż w grupie kontrolnej. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono wyjaśnienia tego zjawiska. Wprawdzie wielu autorów stosowało identyczny model eksperymentu jednak w publikacjach nie zamieszczali wyników kontroli masy ciała zwierząt [160,161,162,163]. Wpływ DMU-212 na omawiany parametr u zwierząt narażonych na NDEA był niewielki i mało konsekwentny pod względem kierunku zmian i zależności od dawki, stąd trudno mu przypisać większe znaczenie.

## 5. DYSKUSJA

Rak wątrobowokomórkowy (HCC – *hepatocellular carcinoma*) jest piątą najczęściej diagnozowaną chorobą na świecie i drugą najczęstszą przyczyną zgonów u mężczyzn [164,165]. HCC jest również główną przyczyną śmierci wśród pacjentów z marskością wątroby [166]. Ponadto nowotwór ten jest rzadko wykrywany w początkowym etapie, a po wykryciu leczenie jest znacznie utrudnione i często daje niepomyślne rokowania [167].

Pomimo znacznego postępu w diagnostyce i terapii nowotworów medycyna nie dysponuje skutecznymi środkami do leczenia HCC. Zatwierdzony przez Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) oraz Europejską Agencję Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA) sorafenib, inhibitor wielu kinaz (ang. *multikinase inhibitor*) wydłuża przeżycie chorych z HCC o około 3 miesiące [168].

W terapii nowotworów dominują obecnie chemioterapia i radioterapia, inwazyjne metody powodujące uszkodzenie również zdrowych komórek. W takiej sytuacji na znaczeniu zyskuje chemoprewencja, postępowanie polegające na hamowaniu powstawania nowotworu na różnych etapach jego rozwoju nie dopuszczając do fazy inwazji. Udowodniono, że wiele substancji naturalnych pochodzenia roślinnego wykazuje takie właściwości [169].

Sz szczególnie dużym zainteresowaniem wśród tych substancji cieszy się pochodna stylbenu, resweratrol. Jednak cechą ograniczającą zastosowanie resweratrolu jako czynnika chemoprewencyjnego jest jego niska biodostępność, spowodowana intensywnym sprzężaniem z kwasem siarkowym i glukuronowym [170]. Skłania to do poszukiwań analogów tego naturalnego stylbenu, które zachowując aktywność biologiczną resweratrolu charakteryzowałyby się lepszą biodostępnością i większą trwałością w ustroju. Jednym z analogów resweratrolu o obiecujących właściwościach jest przedmiot niniejszych badań 3,4,5,4'-tetrametoksystylben, określany jako DMU-212. Zastąpienie trzech grup hydroksylowych w strukturze resweratrolu grupami metoksyłowymi oraz dodanie jednej grupy metoksylovej w pozycji 4' pierścienia fenylovego, doprowadziło do zwiększenia biodostępności tej pochodnej [247].

Doniesienia wielu autorów dowodzą, że DMU-212 jest związkiem o potencjalnym, wielokierunkowym działaniu przeciwnowotworowym [2–5]. Jednak

dane o aktywności przeciwnowotworowej DMU-212 pochodzą głównie z badań *in vitro* i nielicznych eksperymentów z wykorzystaniem modeli zwierzęcych [3,7].

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny czy istnieje związek pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną DMU-212 a potencjalnymi właściwościami chemoprewencyjnymi i przeciwnowotworowymi w modelu zwierzęcym. Cel ten realizowano oznaczając wybrane parametry stresu oksydacyjnego w wątrobie szczurów narażonych na N-nitrozodietyloloaminę, którym równolegle podawano badany związek. Przeprowadzono też analizę ekspresji mRNA wybranych enzymów antyoksydacyjnych oraz oznaczono metodą immunohistochemiczną ekspresję kilku białek, wczesnych markerów procesu nowotworowego w wątrobie.

### **5.1. Parametry stresu oksydacyjnego**

Udowodniona rola stresu oksydacyjnego w etiologii nowotworów uzasadnia stosowanie naturalnych i syntetycznych przeciwutleniaczy w zapobieganiu tym chorobom. W celu monitorowania stanu zaawansowania procesu patologicznego oraz skuteczności badanych przeciwutleniaczy stosuje się odpowiednie biomarkery odzwierciedlające uszkodzenia najważniejszych makrocząsteczek komórkowych. Powszechnie stosowanym markerem peroksydacji lipidów jest dialdehyd malonowy (MDA) oznaczany na podstawie reakcji z kwasem tiobarbiturowym. Ponieważ inne związki powstające w procesie peroksydacji również reagują z tym odczynnikiem, poziom peroksydacji lipidów wyraża się często jako *thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)*. Pomimo szerokiego stosowania metody jest ona przedmiotem pewnych zastrzeżeń, z których najważniejsze to brak selektywności oraz powstawanie barwnych artefaktów pod wpływem ogrzewania w silnie kwaśnym środowisku. Jednak wielu autorów podkreśla, że metoda ta jest odpowiednia w pewnych układach eksperymentalnych, w których chodzi głównie o wykazanie różnic tego parametru pomiędzy grupami zwierząt, a nie o oznaczenie bezwzględnej zawartości produktów peroksydacji lipidów [171,172]. Poza tym uważa się, że pomiar TBARS jest wiarygodnym markerem w odniesieniu do zdefiniowanych systemów takich jak liposomy i mikrosomy a nie powinien być stosowany do płynów ustrojowych i tkanek [173]. Uszkodzenie lipidów w mikrosomach wątroby oceniano stosując dwie formy testu z kwasem tiobarbiturowym: oznaczano poziom samorzutnej (nieindukowanej) oraz indukowanej nieenzymatycznie ( $\text{Fe}^{2+}$  /askorbinian) peroksydacji lipidów. Test bez

indukcji pozwala na ocenę tylko bieżącego stanu uszkodzenia natomiast stymulacja procesu peroksydacji w izolowanych mikrosomach *ex vivo* informuje o ich wrażliwości po narażeniu zwierzęcia na różne czynniki uszkadzające np. związki chemiczne.

Często stosowanym markerem oksydacyjnych uszkodzeń białek są grupy karbonylowe (ang. *protein carbonyls, PC*). Są one bardziej stabilne niż inne produkty uszkodzenia białek oraz wrażliwe na suplementację przeciwutleniaczami. Poza tym indukcja grup karbonylowych jest względnie trudna, stąd ich obecność świadczy o wystąpieniu silnego stresu oksydacyjnego [63]. Metoda ELISA z zastosowaniem przeciwciał anti-DNP (*dinitrofenylohydrazyna*) jest czuła i powtarzalna oraz wymaga niewielkich ilości materiału.

Uszkodzenie DNA jest jednym z podstawowych czynników dających początek procesowi kancerogenezy, dlatego poszukując nowych środków chemoprewencyjnych należy brać pod uwagę zdolność przeciwdziałania mutacjom. Do analizy uszkodzeń DNA zastosowano elektroforezę żelową pojedynczych komórek określaną terminem test kometowy (*comet assay*). Metoda ta identyfikuje jedno- lub dwu-niciowe pęknięcia DNA oraz modyfikacje chemiczne, które mogą przekształcić się w pęknięcia. Test ten umożliwia detekcję uszkodzeń oraz określenie sprawności ich naprawy [174].

Przeprowadzony eksperyment potwierdził prawidłowy wybór modelu doświadczalnego o czym świadczy długotrwały pro-oksydacyjny efekt pojedynczej dawki NDEA/PB utrzymujący się przez 16 tygodni. W wątrobie szczurów otrzymujących NDEA/PB nastąpił 28% wzrost poziomu samorzutnej (ryc. 4.2) oraz 49% wzrost stymulowanej peroksydacji lipidów (ryc. 4.3). Niektórzy autorzy stosujący ten sam model kancerogenezy u szczura stwierdzili znaczny, 2–10-krotny, wzrost poziomu peroksydacji lipidów w wątrobie [159,160–163,175]. Jednak w innych doniesieniach wzrost stężenia TBARS był zbliżony do opisanego w niniejszej pracy, 65–82% [176–178].

W przeciwieństwie do obserwowanego w niniejszym eksperymencie umiarkowanego poziomu uszkodzenia białka, 47% wzrost stężenia grup karbonylowych, inni autorzy zanotowali około 3-krotny wzrost zawartości tego markera pod wpływem NDEA/PB [175,163]. Efektem długotrwałego stresu oksydacyjnego było też 33% obniżenie zasobów zredukowanego glutationu w wątrobie w zakresie zbliżonym do obserwowanego przez innych autorów, 37–52% [160,176–178]. Są też doniesienia, w których opisano brak zmian tego parametru [161], a nawet wzrost

stężenia [157,159, 167,179–181] u szczurów narażonych na NDEA. Przyczyną tych rozbieżności mogą być różnice w odstępach czasu pomiędzy podawaniem NDEA a pobieraniem próbek wątroby. Przyczyn wspomnianych wyżej różnic w poziomie wątrobowego glutationu u zwierząt narażonych na NDEA można też upatrywać w mechanizmie syntezy tego tripeptydu. Pierwszym etapem syntezy GSH jest reakcja cysteiny i kwasu glutaminowego katalizowana przez syntetazę  $\gamma$ -glutamylcysteiny ( $\gamma$  GCS). Pomędzy tym etapem syntezy a stężeniem GSH w komórce istnieje ujemne sprzężenie zwrotne, co oznacza, że obniżenie stężenia glutationu, na przykład pod wpływem stresu oksydacyjnego, może spowodować przejściowy wzrost aktywności  $\gamma$  GCS, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu zawartości GSH [182].

Obniżenie stężenia GSH skutkuje szybkim wzrostem stężenia nadtlenków lipidów [183], co może spowodować nagromadzenie  $H_2O_2$  w komórce, a w konsekwencji jej uszkodzenie. Gdy poziom GSH obniży się o 80–90% dochodzi do kumulacji disulfidu glutationu (GSSG), co powoduje zahamowanie aktywności peroksydazy glutationowej (GPx) oraz wysycenie reduktazy glutationowej (GR) [184]. Obniżenie stężenia GSH w komórce może też być spowodowane powstawaniem koniugatów GSH z ksenobiotykami. Są to reakcje spontaniczne lub katalizowane przez S-transferazy glutationowe obecne w cytozolu wątroby [185].

Obserwowany w niniejszym eksperymencie wzrost poziomu uszkodzeń DNA pod wpływem NDEA/PB był prawdopodobnie spowodowany przez elektrofilowe metabolity kancerogenu i/lub reaktywne formy tlenu (RFT). Powstający w procesie biotransformacji NDEA jon karbonyowy jest zdolny do nukleofilowego alkilowania DNA i innych ważnych dla organizmu makrocząsteczek zawierających ugrupowanie nukleofilowe. Wzrost stężenia RFT prowadzi do zwiększenia liczby oksydacyjnych uszkodzeń DNA m.in. uszkodzeń pojedynczych zasad azotowych, pęknięć nici DNA, tworzenia adduktów [186,187] oraz zaniku sprawności systemów naprawy DNA. Nagromadzenie uszkodzeń oksydacyjnych DNA ostatecznie może doprowadzić do zapoczątkowania procesu kancerogenezy [188,189].

Dotychczasowe badania prowadzone z wykorzystaniem testu kometowego wykazały, że ekspozycja szczurów na NDEA uszkadza DNA zarówno w wątrobie [190,191], jak również w leukocytach krwi [192].

Podawanie obu dawek DMU-212 szczurom potraktowanym wcześniej NDEA/PB zmniejszyło w pewnym stopniu uszkodzenia oksydacyjne lipidów,



odpowiednio o 29% i 19%, oraz białek o 17% i 31%. Jednak poziom uszkodzeń DNA wywołanych przez NDEA/PB (47%) nie obniżył się (ryc. 4.5).

Korzystnym efektem wywołanym przez badany związek był wzrost stężenia najważniejszego przeciwutleniacza komórkowego, zredukowanego glutationu. Poziom glutationu obniżony pod wpływem NDEA/PB (33%) uległ podwyższeniu w sposób zależny od dawki, odpowiednio o 30% i 55% (ryc. 4.1).

Wiele przeciwutleniaczy polifenolowych ma zdolność indukowania ligazy glutaminowo-cysteinowej, enzymu katalizującego pierwszy etap syntezy glutationu [193]. Na przykład wykazano, że niektóre flawonoidy jak kwercetyna, kemferol, apigenina zwiększały ekspresję genu tego enzymu w linii komórkowej COS-1 powodując wzrost stężenia glutationu [194]. Można przypuszczać, że DMU-212, związek o strukturze polifenolu, może również na tej drodze indukować syntezę glutationu, co obserwowano szczególnie w grupach szczurów poddanych wcześniej działaniu NDEA/PB. Innej przyczyny wzrostu stężenia glutationu w tych grupach można upatrywać w mniejszym zużyciu GSH w wyniku zmniejszenia stresu oksydacyjnego przez DMU-212.

Zasadniczym elementem ochrony komórki przed stresem oksydacyjnym są enzymy antyoksydacyjne, których rola polega na rozkładzie reaktywnych form tlenu albo na hamowaniu ich powstawania. Jeżeli stężenie RFT osiągnie poziom, który przekracza zdolności przeciwutleniające komórki, następuje nieodwracalne uszkodzenie jej składników [195].

Do programu badań opisanych w niniejszej pracy oprócz typowych enzymów antyoksydacyjnych włączono również dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową ze względu na istotną rolę tego enzymu w utrzymaniu równowagi redoks w komórce. Enzym ten bierze udział w produkcji NADPH, kofaktora reduktazy glutationowej katalizującej regenerację zredukowanego glutationu na drodze redukcji disulfidu (GSSG).

Odpowiedź wszystkich enzymów antyoksydacyjnych na stres oksydacyjny wywołany przez NDEA/PB była konsekwentna – nastąpiło obniżenie ich aktywności o 32–77%. Podobny efekt, 16–60% obniżenie aktywności w analogicznym modelu doświadczalnym, obserwowali też inni autorzy [159,162,176,177]. Taką reakcję można przypisać inaktywacji enzymów przez wolne rodniki wytwarzane w procesie

biotransformacji NDEA [196], co znajduje potwierdzenie w opisanym wyżej wzroście poziomu peroksydacji lipidów.

Opublikowane dotychczas dane dotyczące wpływu NDEA na S-transferazę glutationową (GST) są dość rozbieżne. Niektórzy autorzy wykazali 30% - 40% obniżenie aktywności [160,178] natomiast w innych eksperymentach obserwowano wzrost aktywności enzymu o 70% [159] oraz 400% [161].

Według powszechnie akceptowanego poglądu, stres oksydacyjny o małym nasileniu wywołuje w komórce aktywację mechanizmu obronnego polegającego na indukcji cytoprotekcyjnych enzymów: antyoksydacyjnych, II fazy biotransformacji, katalizujących produkcję NADPH oraz naprawę DNA. Indukcja genów kodujących te enzymy jest regulowana przez fragment DNA określany jako element odpowiedzi antyoksydacyjnej (*ARE, antioxidant response element*). W procesie aktywacji genów zależnych od ARE biorą udział dwa białka: czynnik transkrypcyjny Nrf2 (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) oraz Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*). W warunkach fizjologicznych białka te tworzą w cytoplazmie kompleks, który ulega rozkładowi pod wpływem stresu oksydacyjnego. Uwolniony Nrf2 przemieszcza się do jądra, gdzie łączy się z ARE inicjując transkrypcję cytoprotekcyjnych genów [11,12]. Występujący w cytoplazmie kompleks Nrf2 – Keap1 spełnia funkcję sensora potencjału oksydoredukcyjnego [13,14]. Zwiększony stres oksydacyjny jest jednym z czynników wywołujących proces nowotworowy, natomiast Nrf2 regulujący enzymy przeciwutleniające, odgrywa zasadniczą rolę w zmniejszaniu poziomu RFT zdolnych do uszkodzenia DNA [15]. Badania wykazały, że niektóre związki naturalne, m.in. resweratrol, mogą aktywować układ Nrf2-Keap1-ARE [9,10]. Natomiast wysoki poziom RFT może powodować uszkodzenia enzymów prowadząc do obniżenia ich aktywności [197].

W niniejszym eksperymencie nie obserwowano mobilizacji systemu obronnego komórek wątroby wobec prooksydacyjnego działania NDEA/PB ponieważ nie nastąpił wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Można przypuszczać, że w warunkach eksperymentu nie zadziałał opisany wyżej mechanizm pobudzający transkrypcję genów kodujących oznaczane enzymy. Potwierdzają to badania Bishayee i wsp. którzy w podobnym eksperymencie nie stwierdzili translokacji Nrf2 do jądra pod wpływem NDEA/PB [163,175].

Jednak porównanie wyników ekspresji mRNA enzymów antyoksydacyjnych oraz ich aktywności w wątrobie szczurów narażonych na NDEA/PB ujawnia brak zgodności pomiędzy tymi parametrami. Odnotowano wzrost ekspresji genów *sod2*, *gst*, *nqo1* odpowiednio o 44%, 49% i 53% (ryc. 4.13; ryc. 4.17; ryc. 4.18), podczas gdy aktywność tych enzymów była obniżona w porównaniu z grupą kontrolną o 37%, 37% i 51% (ryc. 4.6; ryc. 4.10 - 4.11).

Podobną rozbieżność obserwowano u szczurów, które otrzymywały łącznie NDEA/PB + DMU-212. U zwierząt tych nie nastąpiły zmiany aktywności CAT, GR i GST, natomiast aktywność GPx i NQO1 wzrosła odpowiednio o 41% i 102% pod wpływem niższej dawki związku. Ta sama dawka DMU-212 spowodowała obniżenie aktywności SOD o 49%. Natomiast układ wyników pomiaru poziomu ekspresji mRNA większości enzymów (za wyjątkiem Gpx oraz G6pd) w tych grupach szczurów był konsekwentny: obniżenie ekspresji po niższej dawce DMU-212 w zakresie 55–92% oraz wzrost (za wyjątkiem G6pd i Nqo1) pod wpływem wyższej dawki o 24% - 69%, w porównaniu z grupą traktowaną tylko NDEA/PB. Poziom transkryptu *Nqo1* obniżył się pod wpływem obu dawek DMU-212, odpowiednio o 55% i 24%.

Rozbieżności pomiędzy aktywnością a ekspresją genu nie stwierdzono dla dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Zarówno kierunek jak też nasilenie zmian obu omawianych parametrów były zgodne w poszczególnych grupach zwierząt. U szczurów traktowanych NDEA/PB nastąpił 48% wzrost aktywności oraz poziomu mRNA. Frederiks i wsp. [198] również obserwowali wzrost aktywności G6PD w zmianach preneoplastycznych indukowanych w wątrobie szczura pod wpływem NDEA. Zjawisko to interpretowali jako reakcję obronną komórki ponieważ podwyższona aktywność enzymu ułatwia regenerację glutationu co oznacza większą odporność na działanie RFT. W grupie otrzymującej łącznie NDEA/PB i DMU-12 w dawce 20 mg/kg obserwowano 31% wzrost aktywności oraz poziomu transkryptu G6PD. Podobnie w grupie otrzymującej wyższą dawkę obserwowano niewielkie nieznamiennie statystycznie obniżenie zarówno aktywności jak i poziomu mRNA.

Inni autorzy również obserwowali brak korelacji pomiędzy poziomem białka i aktywnością różnych enzymów oraz ekspresją mRNA. Sugerują oni istnienie pewnego progu ekspresji mRNA, którego osiągnięcie jest niezbędne zanim nastąpi translacja białka [199]. Inną przyczyną tych rozbieżności mogą być modyfikacje post-transkrypcyjne i post-translacyjne oraz proteosomalna degradacja białka [200]. Ten

ostatni proces odbywa się w systemie proteasom-ubikwityna. Proteasomy obecne w cytozolu i jądrze są złożonymi kompleksami enzymatycznymi; ubikwityna jest białkiem o funkcji znacznika wskazującego substraty do zniszczenia. Sprawna degradacja białek przez ten szlak jest istotna dla transdukcji sygnału, regulacji transkrypcji, odpowiedzi na stres oraz kontroli czynności receptorów [201]. Wymienione czynniki sprawiają, że zmiany w transkrypcji genów nie są bezpośrednio odzwierciedlane przez aktywność enzymu w stopniu wynikającym z wielkości tych zmian [202].

Wyniki ekspresji mRNA prawie wszystkich enzymów antyoksydacyjnych wykazują pewną prawidłowość. Niższa dawka DMU-212 powodowała zmniejszenie ekspresji mRNA (oprócz GPx i G6pd) natomiast po wyższej dawce poziom transkryptu (oprócz Nqo1 i G6pd) wzrastał w porównaniu z grupą narażoną na NDEA/PB (ryc. 4.13 - 4.14; ryc. 4.16 - 4.17). Ten typ zależności efektu od dawki określa się jako dwufazowy (*biphasic dose-response*). Zjawisko dwufazowej reakcji na dawkę/stężenie było już obserwowane dla prototypowego związku, resweratrolu, głównie w modelach doświadczalnych z użyciem linii komórkowych [203,204]. Na przykład wykazano, że resweratrol dwufazowo moduluje proliferację ludzkich komórek nabłonka oraz komórek śledziony powodując stymulację ich wzrostu w niskich stężeniach oraz zahamowanie wzrostu pod wpływem wysokich stężeń. Podobnie niskie stężenia resweratrolu zwiększały ekspresję oksygenazy hemowej-1 w komórkach mięśni gładkich aorty, ale efekt wyższych stężeń był odwrotny. Znacznie mniej przykładów tego typu odpowiedzi odnotowano w eksperymentach na zwierzętach. Wysokie dawki resweratrolu nasilały zmiany miażdżycowe u królików karmionych paszą wysokocholesterolową oraz powodowały uszkodzenie nerek, ale jednocześnie hamowały rozwój nowotworów [204]. Ponadto resweratrol działał ochronnie wobec wrzodów żołądka indukowanych indometacyną u myszy, ale tylko w niższych dawkach. Wyższe dawki zastosowane w cytowanym eksperymencie powodowały efekt przeciwny [205].

W literaturze opisano szereg innych związków o charakterze przeciwutleniaczy wykazujących efekt dwufazowy. Kwas kawowy dodawany do paszy indukował hiperplazję oraz guzy w żołądku i nerkach szczurów i myszy, natomiast dawka niższa o rząd wielkości powodowała efekt przeciwnowotworowy. Zmiany neurodegeneracyjne indukowane u myszy przez N-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydynę zostały

zahamowane przez niskie dawki zielonej herbaty, podczas gdy wyższe dawki nasilały efekt toksyczny. Genisteina w wysokich stężeniach hamowała wzrost komórek nowotworowych piersi *in vitro*, natomiast niższe o rząd wielkości stężenia indukowały proliferację [206]. Aktywność modelowego przeciwutleniacza  $\beta$ -karotenu także jest zależna od dawki. Niskie stężenia  $\beta$ -karotenu działały antyoksydacyjnie i przeciwzapalnie wobec komórek HL60, efekt wyższych stężeń był odwrotny, nastąpiła stymulacja wytwarzania prozapalnych mediatorów takich jak TNF $\alpha$  i IL-8 [207].

Dane te zdają się potwierdzać pogląd, że efekt antyoksydacyjny wielu związków polifenolowych występuje tylko w niższych dawkach, natomiast zbyt wysokie dawki mogą wykazywać paradoksalnie działanie prooksydacyjne [207]. Niektórzy badacze sugerują, że związki te wchodzi w interakcje z komórkowymi szlakami sygnałowymi i wpływają na ekspresję genów enzymów antyoksydacyjnych [208,209].

Podanie DMU-212 szczurom nienarażonym na kancerogen spowodowało niewielki nieznamienne statystycznie wzrost zawartości glutationu o 19% oraz lekkie (nieznamienne statystycznie) obniżenie nieindukowanej peroksydacji lipidów o 13% (ryc. 4.1) oraz (ryc. 4.2). Odpowiedź enzymów antyoksydacyjnych była zróżnicowana. Nastąpiło obniżenie aktywności CAT, GST, GPx oraz GR odpowiednio o 14%, 12%, 26% i 44% przy czym tylko dwie ostatnie zmiany wykazały znamienność statystyczną. Wzrost aktywności SOD nie był znamienny statystycznie, natomiast zanotowano znaczny, 87%, wzrost aktywności NQO1 (ryc. 4.11).

Obniżenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych mogło być spowodowane poprawą stanu redoks komórek wątroby na skutek podawania egzogenego przeciwutleniacza [210], o czym świadczą wspomniane wyżej niewielkie zmiany w poziomie GSH i peroksydacji lipidów. Interpretację tę potwierdza obniżona ekspresja mRNA wymienionych enzymów w tej grupie szczurów (ryc. 4.13 – ryc. 4.18).

Nie można również wykluczyć inhibicji wymienionych enzymów przez badany związek ponieważ zjawisko takie obserwowano w odniesieniu do innych polifenolowych przeciwutleniaczy. Breinhold i wsp. wykazali hamowanie aktywności CAT, GPx oraz GR w krwinkach czerwonych szczura pod wpływem chryzyny, kwercetyny i genisteiny [210]. Obniżenie aktywności GR obserwowano w komórkach wątroby szczura inkubowanych z delfinidyną, kemferolem, kwercetyną, luteoliną, naringeniną i apigeniną [211]. Niektórzy autorzy wyrażają pogląd, że obniżenie aktywności GR może paradoksalnie wykazywać korzystny efekt, ponieważ ułatwia to

utlenianie glutationu i wspomaga usuwanie nadtlenu wodoru z komórki. Jednak efekt taki występuje, jeżeli obniżeniu aktywności GR towarzyszy wzrost aktywności GPx, czego nie zanotowano w niniejszym eksperymencie [212].

Znaczny wzrost aktywności NQO1 może sugerować, że DMU-212 jest induktorem tego enzymu. NQO1 katalizuje dwuelektronową redukcję związków o strukturze chinonów prowadząc do ich detoksykacji. Substratami enzymu są związki o udowodnionych właściwościach kancerogennych: epoksydy, chinonoiminy, barwniki azowe oraz nitrozowe pochodne amin aromatycznych [213]. NQO1 ulega indukcji pod wpływem 3-metylocholantrenu, dioksyny,  $\beta$ -naftoflawonu oraz sulforafanu, a także wielu związków flawonoidowych, takich jak kemferol, galangina, kwercetyna, apigenina, genisteina [115]. Zdolność indukowania NQO1 wykazuje także resweratrol, co udowodniono podając szczurom ten związek przez 28 dni [214].

Indukcję enzymu odgrywającego istotną rolę w detoksykacji kancerogenów należy uznać za korzystną cechę aktywności biologicznej DMU-212 warunkującą w części potencjalne działanie chemoprewencyjne tego związku.

## **5.2 Badania immunohistochemiczne**

W celu wykazania zmian związanych z procesem kancerogenezy, w wątrobie szczurów wykonano oznaczenia ekspresji wybranych białek.

Ogniskowe zmiany ekspresji gamma-glutamylotransferazy (GGT) oraz izoformy łożyskowej S-transferazy glutationowej (pGST) uważane są za markery wczesnych zmian neoplastycznych. Poziom białka pGST jest bardzo niski w prawidłowych tkankach. Jego ekspresja wzrasta w wyniku narażenia na kancerogen, albo w pojedynczych komórkach albo w skupiskach komórek tworząc tzw. ogniska. Według powszechnie przyjętego poglądu ta forma GST jest dobrym markerem zmian preneoplastycznych w wątrobie [215].

W niniejszym eksperymencie nie stwierdzono ekspresji białka pGST w żadnej z grup, również u zwierząt narażonych na NDEA/PB. Podobne wyniki uzyskali Fukushima i wsp. [216], którzy nie obserwowali pGST-pozytywnych ognisk w wątrobie szczurów narażonych przez 16 tygodni na 10 ppm NDEA w wodzie do picia. Autorzy sugerują, że przyczyną była niska dawka kancerogenu. Można przypuszczać, że dawka NDEA zastosowana jednorazowo w prezentowanym eksperymencie była również zbyt niska, aby wywołać ekspresję tego białka. Ponadto wykazano, że fenobarbital

stosowany jako promotor kancerogenezy zainicjowanej przez NDEA/PB może hamować ekspresję pGST [217].

Gamma-glutamylotransferaza (GGT) katalizuje rozkład glutationu do pojedynczych aminokwasów, które są zużywane m.in. do resyntezy tego tripeptydu. Udział GGT w metabolizmie glutationu uzasadnia zaliczenie tego enzymu do składników systemu obrony komórki przed stresem oksydacyjnym. Wzmożona ekspresja GGT występuje w nowotworach różnych organów i tkanek u ludzi co znalazło potwierdzenie w aktywnie proliferujących preneoplastycznych ogniskach komórek w wątrobie zwierząt narażonych na kancerogeny. Reaktywne formy tlenu odgrywające istotną rolę w procesie kancerogenezy powodują jednocześnie wzrost ekspresji GGT obserwowany w guzach nowotworowych. Uzasadnia to wykorzystanie GGT jako markera wczesnych zmian neoplastycznych [218].

W niniejszym eksperymencie zanotowano wzrost ekspresji GGT w wątrobie szczurów narażonych na NDEA/PB (ryc. 4.22). DMU-212 spowodował obniżenie ekspresji tego białka jednak działanie takie wykazała tylko niższa dawka (ryc. 4.23). Przyczyna tego zjawiska jest trudna do wyjaśnienia na podstawie przyjętego w prezentowanej pracy zakresu badań.

Jądrowy antygen komórek proliferujących (PCNA) odgrywa zasadniczą rolę w replikacji i naprawie DNA, utrzymaniu struktury chromatyny oraz w kontroli cyklu komórkowego. Ponieważ poziom ekspresji PCNA jest ściśle związany z proliferacją i transformacją nowotworową, białko to znalazło zastosowanie jako marker proliferacji zarówno do oceny rozwoju nowotworu jak też skuteczności terapii przeciwnowotworowej [219].

W prezentowanym eksperymencie nie odnotowano ekspresji PCNA w wątrobie szczurów narażonych na NDEA. Przyczyną może być bardzo wczesny charakter potencjalnych zmian preneoplastycznych.

W wątrobie szczurów oznaczono też metodą immunohistochemiczną trzy inne białka, produkty genów supresorowych: Ki67, Rb1 oraz p53.

Ki67 jest niehistonowym białkiem jądrowym obecnym we wszystkich fazach cyklu komórkowego oprócz fazy G0. Liczba komórek wykazujących ekspresję tego białka obrazuje pulę komórek dzielących się i jest zależna od aktywności proliferacyjnej nowotworu. Uważa się, że białko to jest dobrym wskaźnikiem frakcji dzielących się komórek i wykorzystywane jest do prognozowania rozwoju niektórych nowotworów [220].

W wątrobie zwierząt narażonych na NDEA/PB nie zanotowano ekspresji Ki67, co może oznaczać, że potencjalne zmiany neoplastyczne miały charakter bardzo wczesny nie związany z hiperplazją komórek, o czym świadczy również wspomniany wcześniej brak ekspresji PCNA.

Funkcją białka RB (nazwa pochodzi od siatkówczaka – *retinoblastoma*-rzadkiego nowotworu oka spowodowanego mutacją w genie Rb1) jest zapobieganie podziałowi komórki z uszkodzonym DNA przez zatrzymanie cyklu komórkowego na etapie przejścia z fazy G1 do fazy S, co uniemożliwia replikację uszkodzonych genów. RB odgrywa istotną rolę w utrzymaniu stabilności genomu, moduluje apoptozę, różnicowanie komórek i angiogenezę [221]. Według przyjętego poglądu uważa się białko RB za antyapoptotyczne, które zatrzymuje cykl podziału komórki i przerywa proces wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnałów niezbędnych do wywołania apoptozy. Ostatnio wykazano jednak, że białko to w zależności od typu komórek i stopnia ufosforylowania może również stymulować proces apoptozy. W większości nowotworów u ludzi stwierdzono inaktywację/obniżoną ekspresję RB [221,222]. W wątrobie szczurów narażonych na NDEA/PB obserwowano ekspresję tego białka co można interpretować jako mobilizację systemu obronnego komórki (ryc. 4.24). Ekspresja RB nie wystąpiła jednak u zwierząt otrzymujących łącznie NDEA/PB oraz DMU-212 (ryc. 4.25). Może to sugerować zmniejszenie przeżycia komórek preneoplastycznych pod wpływem DMU-212.

Białko p53 uważane jest za „strażnika genomu” (*guardian of the genome*) i należy do czynników transkrypcyjnych odgrywających istotną rolę w procesie apoptozy. Najważniejszym sygnałem aktywującym p53 jest uszkodzenie DNA. Promieniowanie jonizujące, alkilacja zasad lub atak wolnych rodników może w różny sposób zmieniać strukturę DNA. Sygnał o uszkodzeniu jest przekazywany do białka p53, stymuluje jego wiązanie się z odpowiednimi sekwencjami DNA i pobudza ekspresję różnych genów kodujących białka odpowiedzialne m.in. za apoptozę, zatrzymanie cyklu komórkowego lub naprawę DNA. Dwa pierwsze procesy odgrywają najistotniejszą rolę w hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych. W większości nowotworów gen kodujący p53 jest nieaktywny z powodu mutacji co uniemożliwia produkcję prawidłowego białka, a tym samym zwiększa szansę komórek rakowych na przeżycie [223,224]. Akumulacja białka p53 występuje głównie po modyfikacjach post-translacyjnych, które hamują jego degradację proteosomalną [225].



Jak wspomniano wyżej jednym z czynników aktywujących p53 jest stres oksydacyjny, którego źródłem w niniejszym eksperymencie był zastosowany kancerogen.

U szczurów narażonych na NDEA/PB nastąpił wzrost ekspresji p53 (ryc. 4.20), natomiast podawanie DMU-212 spowodowało wyraźne osłabienie immunoreaktywności (ryc. 4.21). Można wnioskować, że pod wpływem DMU-212 nastąpiło polepszenie statusu antyoksydacyjnego w wątrobie, co pociągnęło za sobą zmniejszoną aktywację p53.

Transformujący czynnik wzrostu alfa, TGF $\alpha$  (*transforming growth factor  $\alpha$* ) jest ważnym autokrynnym czynnikiem wzrostu hepatocytów. Wprawdzie występuje w wielu prawidłowych tkankach jednak jego ekspresja jest nasiloną w spontanicznych i wywołanych eksperymentalnie guzach oraz w transformowanych komórkach. TGF $\alpha$  stymuluje proliferację komórek rakowych w wątrobie na drodze aktywacji receptora naskórkowego czynnika wzrostu EGFR (*epidermal growth factor receptor*). Wyniki doświadczeń na zwierzętach oraz badania ludzi ze schorzeniami wątroby (zwłóknienie, rak wątrobowo- komórkowy) wskazują, że ekspresja mRNA TGF $\alpha$  jest ściśle związana z proliferacją oraz transformacją nowotworową komórek wątroby [226].

U szczurów narażonych na NDEA/PB wystąpiła ekspresja TGF $\alpha$  i nie uległa zmianie pod wpływem DMU-212 (ryc. 4.26 - 4.27). Można wnioskować, że związek badany w zastosowanych dawkach nie zmniejsza proliferacji zainicjowanych komórek w wątrobie.

### **5.3. Markery funkcji wątroby i nerek**

Produkty biotransformacji NDEA o charakterze wolnych rodników powodują stres oksydacyjny prowadzący do uszkodzenia komórek wątroby i innych narządów. Z tego powodu do programu opisanych w pracy badań włączono wybrane markery funkcji wątroby i nerek pozwalające ocenić potencjalne działanie ochronne badanego związku.

Oznaczenie aktywności aminotransferaz, alaninowej (ALT) i asparaginowej (AST) dostarcza danych na temat zmian przepuszczalności błony hepatocytów pod wpływem procesu chorobowego lub uszkodzenia przez czynnik chemiczny. W komórce ALT występuje w cytoplazmie, natomiast AST zlokalizowana jest w mitochondriach i w cytoplazmie. Obydwa enzymy występują powszechnie w wielu narządach jednak

poziom ALT w tkankach pozawątrobowych jest niski. Ze względu na powszechność występowania, wzrost aktywności AST w surowicy obserwuje się na skutek uszkodzenia każdego narządu np. mięśni albo w zawale mięśnia sercowego. Wprawdzie obie transferazy nie wykazują specyficzności narządowej jednak są szeroko stosowane jako czuły wskaźnik stanów patologicznych wątroby [227–229].

ALT uważana jest za bardziej miarodajny marker w badaniach eksperymentalnych ponieważ jej okres półtrwania u szczura jest dłuższy (40 – 60 godz.) niż okres półtrwania AST (około 12 godz.) Czynniki uszkadzające wątrobę powoduje wzrost aktywności obu enzymów ale aktywność AST wraca do normy szybciej (godziny, dni) niż aktywność ALT (dni). Stąd, oznaczanie aktywności ALT pozwala ocenić zarówno ostre jak też podostre uszkodzenia komórek wątroby. Ponieważ u szczura i innych zwierząt laboratoryjnych 80% ALT występuje w mitochondriach a 20% w cytoplazmie, wzrost aktywności tego enzymu w surowicy następuje tylko w wyniku silnego uszkodzenia wątroby. Oba markery są wykorzystywane głównie do wykrywania ostrych uszkodzeń narządu jednak obserwowano również długotrwały wzrost aktywności tych enzymów w stanach przewlekłego procesu zapalnego [230]. Potwierdzają to wyniki niniejszego eksperymentu, w którym wykazano umiarkowane, 35%, podwyższenie aktywności AST po 16 tygodniach od podania pojedynczej dawki NDEA oraz niewielki niezamienny statystycznie wzrost aktywności ALT. Podawanie DMU-212 nie wpłynęło na podwyższoną aktywność AST jednak spowodowało lekkie, również niezamiennie statystycznie obniżenie aktywności ALT o około 20%.

Gamma glutamylotransferaza (GGT) występuje w błonach siateczki śródplazmatycznej komórek nabłonka dróg żółciowych i wątroby a także trzustki, jelita i nerki. W ostrych i przewlekłych chorobach wątroby obserwuje się wzrost aktywności GGT w surowicy. Enzym ten jest uważany za czuły ale mało swoisty wskaźnik stanu dróg żółciowych. Wzrost aktywności GGT w surowicy może być spowodowany nie tylko reabsorpcją enzymu z żółci do krwi ale także zwiększoną syntezą w mikrosomach hepatocytów ponieważ GGT ulega indukcji przez różne związki chemiczne np. estrogeny, fenytoinę, barbiturany [227]. U szczura aktywność enzymu w surowicy jest wskaźnikiem zarówno hiperplazji dróg żółciowych jak też martwicy [231].

Zaobserwowany w niniejszym eksperymencie 31% wzrost aktywności GGT u szczurów, które otrzymywały sam DMU-212 może oznaczać indukcję enzymu przez badany związek. Aktywność GGT wzrosła pod wpływem NDEA/PB na skutek

uszkodzenia wątroby i nie powróciła do normy u szczurów otrzymujących łącznie hepatotoksynę i DMU-212 co mogło być częściowo spowodowane wspomnianą wyżej indukcją GGT.

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) występuje powszechnie w wielu tkankach w ustroju, szczególnie w tych, które charakteryzują się wysokim metabolizmem energetycznym jak np. mózg, erytrocyty, mięsień sercowy, wątroba, mięśnie. Występuje w pięciu formach izoenzymatycznych o różnej lokalizacji tkankowej, LDH<sub>4</sub> i LDH<sub>5</sub> występują w wątrobie i mięśniach szkieletowych. Jest enzymem cytoplazmatycznym uwalnianym do przestrzeni pozakomórkowej w wyniku zwiększonej przepuszczalności błony komórkowej bądź martwicy tkanki. Wzrost aktywności LDH w surowicy występuje w wielu schorzeniach w tym w uszkodzeniu wątroby i dróg żółciowych a także w nowotworach różnych narządów [228,229,232].

Wprawdzie LDH nie jest enzymem specyficznym dla wątroby jednak w kontrolowanych warunkach eksperymentu, w którym stosuje się specyficzną hepatotoksynę zmiany aktywności tego enzymu odzwierciedlają stopień uszkodzenia narządu oraz dostarczają danych na temat potencjalnego działania ochronnego badanego związku. W niniejszym eksperymencie podwyższona pod wpływem NDEA/PB aktywność LDH utrzymywała się przez 16 tygodni i uległa niewielkiemu, ale znamiennej statystycznie zmniejszeniu u szczurów, którym podawano jednocześnie DMU-212.

Dehydrogenaza sorbitolowa (SDH) jest enzymem specyficznym ponieważ występuje przede wszystkim w cytoplazmie i mitochondriach wątroby. Jej aktywność w surowicy krwi wzrasta w ostrych uszkodzeniach wątroby (okres półtrwania SDH wynosi około 12 godz.) i powraca do normy po 48–72 godz. Ze względu na dużą specyficzność oznaczanie tego enzymu jest często stosowane w eksperymentach na gryzoniach [230,231]. Marker ten jest zalecany w eksperymentach obejmujących ostre uszkodzenie wątroby jednak przedstawione wyniki wskazują, że może on być również użyteczny w stanach przewlekłych. Po 16 tygodniach po podaniu szczurom NDEA/PB aktywność SDH w surowicy była podwyższona o 42% natomiast w grupach, które otrzymywały dodatkowo DMU-212 aktywność enzymu obniżyła się do poziomu kontrolnego.

Kreatynina jest bezwodnikiem kreatyny, związku syntezowanego w trzustce i wątrobie a następnie wychwytywanego przez mięśnie i mózg, gdzie powstaje związek

wysokoenergetyczny fosfokreatyna. Kreatynina wydalana z ustroju na drodze filtracji kłębuszkowej, nie ulega wydzielaniu kanalikowemu ani resorpcji w kanalikach nerkowych. Stąd poziom kreatyniny w osoczu jest dobrym markerem funkcji filtracyjnej nerek; jeżeli przesączanie kłębuszkowe zmniejsza się poziom kreatyniny rośnie. Wprawdzie poziom kreatyniny może wzrastać na skutek kwasicy ketonowej, spożycia dużej ilości białka oraz pod wpływem niektórych leków jednak marker ten jest powszechnie stosowany do oceny funkcji nerek [228,229]. Specyficzność narządowa tego markera nie budzi zastrzeżeń w eksperymentach na zwierzętach ponieważ odbywają się one w ściśle określonych warunkach z zastosowaniem standardowej paszy oraz kontrolowanym stanem zdrowia zwierząt.

W niniejszym eksperymencie obserwowano około 50% wzrost stężenia kreatyniny w osoczu szczurów narażonych na NDEA/PB. Stężenie to obniżyło się nieco pod wpływem DMU-212 jednak tylko efekt niższej dawki (25% obniżenie) był znamienne statystycznie. Uzyskany wynik może świadczyć o działaniu nefroprotekcijnym badanego związku.

#### **5.4. Markery stresu oksydacyjnego w nerkach**

NDEA jest modelowym kancerogenem wątroby jednak nie jest to działanie ściśle selektywne. Inne organy i tkanki mogą być również narażone na stres oksydacyjny wywołany przez wolne rodniki powstające w procesie aktywacji metabolicznej związku. W dostępnym piśmiennictwie znaleziono dwa artykuły, w których opisano skutki stresu oksydacyjnego w nerkach szczurów narażonych na NDEA. Bansal i wsp. obserwowali zmiany w aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz wzrost stężenia azotu mocznikowego oraz kreatyniny w surowicy po 6 godz. od podania NDEA [233]. Rana i Soni zanotowali wzrost poziomu peroksydacji lipidów w nerkach szczurów po 48 godz. od podania NDEA [234].

Na podstawie tych przesłanek do głównego kierunku badań dodano oznaczenia parametrów stresu oksydacyjnego w nerkach. W obu cytowanych wyżej eksperymentach zastosowano identyczną pojedynczą dawkę NDEA, 200mg/kg m.c., jak w niniejszej pracy, jednak droga podania (dootrzewnowo) oraz model eksperymentu były odmienne co może tłumaczyć różnice w odpowiedzi niektórych parametrów na NDEA.

W niniejszym eksperymencie obserwowano nieznamiennie statystycznie obniżenie poziomu peroksydacji lipidów (LPO) w nerkach szczurów otrzymujących

NDEA/PB. Podobnie Bansal i wsp. nie odnotowali wzrostu LPO w nerkach szczurów po podaniu tego związku [233], natomiast Rana i Soni wykazali 26% wzrost LPO w tym narządzie [234]. Brak wzrostu poziomu LPO w nerkach może wyjaśnić fakt, że procesy biotransformacji NDEA, w których powstają wolne rodniki przebiegają głównie w wątrobie, stąd ten narząd jest bardziej narażony na uszkodzenia co potwierdzają wyniki oznaczania stężenia TBARS (tabele 4.22 - 4.23). Ponadto zjawisko to może mieć związek z podwyższonym stężeniem GSH oraz zwiększoną aktywnością GPx u szczurów narażonych na NDEA. Ponieważ oznaczony w niniejszym eksperymencie fizjologiczny poziom peroksydacji lipidów w nerce był około 23 razy niższy niż w wątrobie (tabele 4.3 i 4.23), nawet niewielki wzrost wspomnianych parametrów obrony antyoksydacyjnej mógł spowodować obniżenie stresu oksydacyjnego w tym narządzie.

Łączne podanie NDEA/PB i DMU-212 spowodowało prawie 30% wzrost poziomu nieindukowanej oraz 40% wzrost indukowanej nieenzymatycznie peroksydacji lipidów. Jest to efekt przeciwny niż obserwowany w wątrobie i trudny do wyjaśnienia biorąc pod uwagę właściwości antyoksydacyjne DMU-212. Można sugerować, że jest on skutkiem interakcji obu związków, np. w zakresie indukcji aktywacji metabolicznej NDEA, jednak trudno byłoby wskazać przyczynę, dla której interakcja taka występuje tylko w nerkach.

Odpowiedź glutationu na NDEA/PB w obu narządach różniła się zasadniczo; obserwowano 33% obniżenie w wątrobie i 31% wzrost w nerkach. Można przypuszczać, że spadek stężenia glutationu w wątrobie został spowodowany zużyciem tego antyoksydanta w procesie przeciwdziałania skutkom stresu oksydacyjnego wywołanego przez kancerogen. Jednak wzrost stężenia GSH w nerkach po kilkunastu tygodniach od podania NDEA/PB jest trudny do wyjaśnienia i w dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono podobnych przykładów zmian stężenia GSH w nerkach pod wpływem prooksydanta.

Wiadomo, że w warunkach fizjologicznych zawartość glutationu w wątrobie jest wyższa niż w pozostałych narządach, ponieważ w wątrobie powstaje 90% GSH produkowanego w ustroju [235]. Potwierdzają to badania wielu autorów chociaż nie ma zgodności co do wielkości tych różnic: od 40% do 4,5x [192,236,237,238]. Jednak dane te nie dostarczają argumentu pozwalającego bezpośrednio wyjaśnić obserwowane w pracy różnice zawartości GSH w obu narządach szczurów narażonych na NDEA.

Można spekulować, że niższe stężenie GSH w nerkach powoduje słabszą ochronę przed stresem oksydacyjnym, co z kolei uruchamia mechanizm adaptacyjny komórki na drodze stymulacji enzymów odpowiedzialnych za syntezę GSH. Dodatkowe badania obejmujące proces syntezy GSH mogłyby wyjaśnić to pozornie paradoksalne zjawisko. Natomiast łączne podanie NDEA/PB i DMU-212 spowodowało obniżenie stężenia GSH do poziomu grupy kontrolnej, co można interpretować jako skutek normalizacji stanu redoks komórek. Porównanie poziomu peroksydacji lipidów i stężenia glutationu w tych grupach szczurów ujawnia pewną prawidłowość – obniżeniu poziomu GSH towarzyszy wzrost peroksydacji lipidów, co jest zjawiskiem logicznym chociaż jego przyczyna pozostaje nieznana. U szczurów otrzymujących sam DMU-212, nastąpił około 30% nieznamienny statystycznie spadek stężenia GSH. Można wnioskować, że w przeciwieństwie do wątroby DMU-212 nie działa korzystnie na oba omawiane parametry w nerkach.

System obrony antyoksydacyjnej w nerkach jest słabszy niż w wątrobie, również ze względu na niższą aktywność enzymów antyoksydacyjnych. Większość autorów obserwowała, że aktywność SOD w nerkach jest 18% - 5,3 x niższa niż w wątrobie [237–240]. Są również doniesienia, w których nie stwierdzono istotnej różnicy aktywności SOD w obu narządach, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszym eksperymencie [236,241]. Aktywność CAT w nerkach obserwowana przez wielu autorów była niższa niż w wątrobie o 25% [237] lub 50% [238,241]. Podobną do ostatniej różnicę zanotowano w niniejszej pracy. Większość autorów donosi o niższej aktywności GPx w nerkach, 20% - 5,6x, [237,240,241,242], co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy (3,6-krotna różnica).

Według powszechnie przyjętego poglądu reduktaza glutationowa jest jedynym enzymem antyoksydacyjnym, którego aktywność jest wyższa w nerkach niż w wątrobie, o 27% - 200% [192,235,240,241,242]. Jednak w niektórych doniesieniach opisano niższą aktywność GR w nerkach niż w wątrobie [237,243,244]. Podobną zależność zanotowano w niniejszej pracy – aktywność GR w nerkach była 8,8-krotnie niższa w porównaniu z aktywnością w wątrobie.

Aktywność GST, analogicznie do pozostałych enzymów, była niższa w nerkach w porównaniu z wątrobą (7,3x). Znalazło to potwierdzenie w doniesieniach innych autorów, którzy również wykazali niższą (o 30% - 8,9x) aktywność tego enzymu w nerkach [192,237,239,240,242].

W nerkach szczurów narażonych na NDEA/PB nie zaobserwowano zmian aktywności czterech enzymów: SOD, CAT, GR i GST. Powodem może być niski poziom stresu oksydacyjnego w nerce w porównaniu z wątrobą, w której zachodzi biotransformacja NDEA i produkcja wolnych rodników. Jednak obniżenie aktywności NQO1 i G-6-PD, odpowiednio o 71% i 31% skłania do przypuszczenia, że w narządzie tym doszło do zachwiania równowagi redoks. Na tle tych zmian pewną trudną do wyjaśnienia niekonsekwencją jest 43% wzrost aktywności GPx.

Uzyskanych w opisanym eksperymencie wyników dotyczących odpowiedzi enzymów antyoksydacyjnych w nerkach na NDEA/PB nie można porównać z nielicznymi danymi innych autorów z powodu zasadniczych różnic w modelu eksperymentalnym [233,234]. W cytowanych doniesieniach oznaczenia enzymów wykonywano po 48 godz. po podaniu NDEA, w niniejszym eksperymencie czas ten był znacznie dłuższy – 16 tygodni.

Podanie DMU-212 szczurom narażonym wcześniej na NDEA/PB wywołało zróżnicowaną co do kierunku i nasilenia odpowiedź enzymów antyoksydacyjnych. Obserwowano niezależne od dawki, nieznamienne statystycznie obniżenie aktywności SOD i GPx oraz niewielki wzrost aktywności CAT. Aktywność innych trzech enzymów, GR, GST i NQO1 uległa obniżeniu, o 18–69%; zmiana ta była znamienna statystycznie i wykazywała zależność od dawki DMU-212. Na podstawie tych wyników można wnioskować, że badany związek nie wywiera korzystnego wpływu na aktywność większości oznaczanych enzymów antyoksydacyjnych w nerkach. Podobnie w wątrobie zwierząt z tych grup stwierdzono brak zmian aktywności CAT, GR i GST, oraz obniżenie SOD.

Jedynym enzymem, którego aktywność w nerce wzrosła znacząco w omawianych grupach szczurów, odpowiednio o 447% i 320%, była dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa. Ponieważ jest to efekt przeciwny do wywołanego przez NDEA/PB (~70% obniżenie aktywności) można sugerować, że stanowi korzystną reakcję na zakłócenie statusu antyoksydacyjnego narządu. Podobną zmianę aktywności enzymu, jednak o znacznie mniejszym nasileniu, obserwowano w wątrobie tych samych szczurów. Należy podkreślić, że sam DMU-212 nie wpłynął na aktywność G-6-PD w nerce, wzrost aktywności enzymu był reakcją na zaburzenia wywołane NDEA/PB.

Jak wspomniano wyżej, enzym ten katalizuje produkcję NADPH, co stanowi o jego ważnej roli w utrzymywaniu równowagi redoks w komórce. Aktywność wielu

enzymów antyoksydacyjnych, m.in. tioredoksyn, glutaredoksyn i peroksyredoksyn zależy od redukcyjnej siły NADPH. Do enzymów tych zalicza się także katalaza, która wprawdzie nie zużywa NADPH do redukcji nadtlenu wodoru, jednak połączenie CAT z NADPH jest niezbędne dla utrzymania enzymu w aktywnej formie [245].



## 6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. DMU-212 podawany szczurom narażonym na N-nitrozodietylloaminę (NDEA) wykazał umiarkowane działanie antyoksydacyjne o czym świadczy obniżenie poziomu uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek oraz wzrost stężenia zredukowanego glutationu w wątrobie. Nie obserwowano natomiast wzrostu aktywności większości enzymów antyoksydacyjnych.
2. Zanotowano brak zgodności pomiędzy niezmienną aktywnością enzymów antyoksydacyjnych a zmianami ekspresji ich mRNA, co można przypisać modyfikacjom post-translacyjnym białka oraz/lub jego proteosomalnej degradacji.
3. W wątrobie szczurów otrzymujących łącznie kancerogen i DMU-212 wykazano dwufazowy charakter zależności ekspresji mRNA enzymów antyoksydacyjnych od dawki objawiający się obniżeniem ekspresji pod wpływem niższej dawki (20 mg/kg m.c.) i wzrostem pod wpływem wyższej dawki (50 mg/kg m.c.) DMU-212.
4. Znaczny wzrost aktywności oksydoreduktazy NADPH:chinon w wątrobie szczurów otrzymujących zarówno sam DMU-212 jak też łącznie z NDEA sugeruje, że związek badany jest induktorem tego enzymu co może stanowić istotny element jego potencjału chemoprewencyjnego.
5. Obniżenie poziomu ekspresji białek, markerów procesu nowotworzenia (GGT, RB, p53) w wątrobie pod wpływem DMU-212 świadczy o ograniczeniu wczesnych zmian neoplastycznych wywołanych przez kancerogen.
6. W surowicy krwi zwierząt narażonych na NDEA, którym podawano DMU-212 nastąpiło obniżenie aktywności dwóch enzymów wskaźnikowych funkcji wątroby (dehydrogenaz mleczanowej i sorbitolowej), co pozwala wnioskować o hepatoprotekcyjnym działaniu badanego związku.
7. W zastosowanym modelu doświadczalnym nie wykazano ani uszkodzenia nerek przez NDEA ani ochronnego działania DMU-212 a jedyną obserwowaną korzystną zmianą był kilkakrotny wzrost aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej.

Podsumowując można stwierdzić, że działanie ochronne DMU-212 wobec uszkodzeń oksydacyjnych ważnych makrocząsteczek jest umiarkowane. Związek nie stymuluje też istotnego elementu obrony antyoksydacyjnej komórki, który stanowią enzymy antyoksydacyjne. Jednak DMU-212 wykazuje działanie hepatoprotekcyjne i zmniejsza nasilenie wczesnych zmian neoplastycznych w wątrobie. Można przypuszczać, że zastosowane dawki związku były zbyt niskie aby ujawnić w pełni jego potencjał chemoprewencyjny.

Uzyskane wyniki sugerują kierunki dalszych badań z zastosowaniem wyższej dawki DMU-212 w innym modelu doświadczalnym w celu m.in. wyjaśnienia rozbieżności pomiędzy poziomem mRNA enzymów antyoksydacyjnych a ich aktywnością.

## STRESZCZENIE

Pomimo znacznego postępu w diagnostyce i terapii chorób onkologicznych, medycyna nie dysponuje skutecznymi środkami do leczenia nowotworów wątroby. Jednym z najbardziej obiecujących działań na tym polu jest chemoprewencja polegająca na stosowaniu substancji zmniejszających ryzyko rozwoju lub nawrotu choroby nowotworowej. Właściwości takie wykazuje resweratrol, fitoaleksyna występująca między innymi w skórkach winogron. Niska biodostępność resweratrolu skłoniła badaczy do poszukiwania aktywnych biologicznie pochodnych tego stilbenu, charakteryzujących się lepszymi parametrami farmakokinetycznymi. Chemiczna modyfikacja cząsteczki resweratrolu doprowadziła do otrzymania trans-3,4,5,4'-tetrametoksystilbenu (DMU-212). W badaniach na wielu liniach komórkowych DMU-212 wykazał większą od resweratrolu cytotoksyczność oraz działanie przeciwnowotworowe. Mechanizm aktywności DMU-212 opiera się m.in. na obniżaniu ekspresji enzymów katalizujących aktywację prokancerogenów, hamowaniu cyklu komórkowego i stymulacji apoptozy.

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny czy istnieje związek pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną DMU-212 a potencjalnymi właściwościami chemoprewencyjnymi i przeciwnowotworowymi w modelu zwierzęcym.

Zastosowano model kancerogenezy chemicznej polegający na jednorazowym podaniu szczurom specyficznego kancerogenu wątroby N-nitrozodietylaminy (NDEA) inicjującej proces nowotworowy, który następnie ulega promocji na skutek wielokrotnego podania fenobarbitalu (PB). Na skutek aktywacji metabolicznej NDEA w wątrobie powstają elektrofilowe metabolity reagujące z DNA oraz reaktywne formy tlenu, które inicjują proces nowotworzenia.

Trzem grupom szczurów samców szczepu Wistar podano dootrzewnowo N-nitrozodietylaminę (NDEA) w pojedynczej dawce 200 mg/kg masy ciała. Od drugiego tygodnia doświadczenia w/w grupy otrzymywały wodę do picia zawierającą 0,05% fenobarbitalu (PB). Szczurom z dwóch grup podawano dwa razy w tygodniu DMU-212 *per os*, w dawkach 20 i 50 mg/kg masy ciała przez 16 tygodni. Sam związek badany podawano *per os* jednej grupie szczurów dwa razy w tygodniu w dawce 50 mg/kg m.c. Grupa kontrolna otrzymywała dwa razy w tygodniu 40% roztwór 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstryny (vehiculum). Po zakończeniu doświadczenia szczury uśpiono i pobrano krew z serca oraz wątrobę i nerki.

W wątrobie oznaczono markery uszkodzeń oksydacyjnych oraz wybrane parametry obrony antyoksydacyjnej. Obie dawki DMU-212 spowodowały ograniczenie skutków stresu oksydacyjnego wywołanego przez NDEA o czym świadczy obniżenie poziomu peroksydacji lipidów o 29% i 19% oraz zmniejszenie uszkodzeń oksydacyjnych białek o 17% i 31%. Nie zanotowano natomiast zmniejszenia stopnia uszkodzeń DNA. Korzystnym efektem wywołanym przez badany związek był wzrost stężenia najważniejszego przeciwutleniacza komórkowego, zredukowanego glutationu. Poziom glutationu obniżony pod wpływem NDEA/PB uległ podwyższeniu w sposób zależny od dawki, odpowiednio o 30% i 55%.

U szczurów narażonych na NDEA/PB nastąpiło obniżenie aktywności wszystkich oznaczanych enzymów antyoksydacyjnych w wątrobie o 32% - 77% (oprócz G-6-PD) w porównaniu z grupą kontrolną. Zmiany te nie znalazły odzwierciedlenia w wynikach pomiaru ekspresji mRNA ponieważ stwierdzono wzrost ekspresji czterech enzymów o 44%-53%, ekspresja dwóch enzymów nie zmieniła się, a jednego – obniżyła się o 40%. Podanie DMU-212 szczurom narażonym na NDEA/PB nie zmieniło aktywności katalazy (CAT), reduktazy glutationowej (GR) oraz S-transferazy glutationowej (GST). Obserwowano natomiast dalsze obniżenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) o 49% oraz wzrost aktywności 3 pozostałych enzymów: peroksydazy glutationowej (GPx), oksydoreduktazy NADPH:chinon (NQO1) oraz dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (G-6-PD), odpowiednio o 38%, 102% i 31%. U tych zwierząt również obserwowano brak zgodności pomiędzy aktywnością większości enzymów a ekspresją ich mRNA, którego poziom w przypadku CAT, GR, GST i NQO1 obniżył się, odpowiednio o 68%, 86%, 82% i 55% pod wpływem mniejszej dawki związku. Natomiast kierunki zmian obu parametrów były zgodne dla GPx oraz G-6-PD, ponieważ poziom ich transkryptów wzrósł odpowiednio o 41% i 31%. Dostępne dane z piśmiennictwa sugerują, że przyczyną braku korelacji pomiędzy ekspresją mRNA enzymów a ich aktywnością mogą być modyfikacje post-transkrypcyjne i post-translacyjne oraz proteosomalna degradacja białka.

Pomiar ekspresji mRNA enzymów antyoksydacyjnych ujawnił dwufazowy charakter zależności dawka-odpowiedź: niższa dawka DMU-212 spowodowała obniżenie ekspresji prawie wszystkich enzymów o 55–92%, pod wpływem wyższej dawki nastąpił wzrost ekspresji o 24–69%, w porównaniu do zwierząt narażonych na kancerogen.

Podanie DMU-212 szczurom nienarażonym na kancerogen spowodowało niewielki nieznamienisty statystycznie wzrost zawartości glutationu oraz lekkie obniżenie peroksydacji lipidów. Odpowiedź enzymów antyoksydacyjnych była zróżnicowana. Nastąpiło obniżenie aktywności GPx oraz GR, odpowiednio o 26% i 44% oraz znaczny,

87%, wzrost aktywności NQO1. Obniżenie aktywności w/w enzymów antyoksydacyjnych mogło być spowodowane poprawą stanu redoks komórek wątroby na skutek podawania egzogenego przeciwutleniacza. Można też przypuszczać, że DMU-212 jest induktorem NQO1, która to właściwość zwiększa chemoprewencyjny potencjał związku.

Badania immunohistochemiczne wykazały obniżenie poziomu ekspresji białek, markerów procesu nowotworzenia: GGT, RB, p53 w wątrobie pod wpływem DMU-212, co świadczy o ograniczeniu wczesnych zmian neoplastycznych wywołanych przez kancerogen.

W surowicy krwi zwierząt, którym podawano DMU-212 nastąpiło obniżenie podwyższonej przez NDEA/PB aktywności dwóch enzymów wskaźnikowych funkcji wątroby, dehydrogenaz mleczanowej i sorbitolowej, co pozwala wnioskować o hepatoprotekcyjnym działaniu badanego związku.

W zastosowanym modelu doświadczalnym nie wykazano ani uszkodzenia nerek przez NDEA/PB, ani ochronnego działania DMU-212. Prawdopodobną przyczyną jest specyficzność narządowa NDEA. Procesy biotransformacji tego kancerogenu zachodzą głównie w wątrobie, stąd inne narządy są w mniejszym stopniu narażone na uszkodzenia. Jedyną obserwowaną korzystną zmianą w nerkach był kilkakrotny wzrost aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej pod wpływem DMU-212.

Podsumowując można stwierdzić, że działanie ochronne DMU-212 wobec uszkodzeń oksydacyjnych ważnych makrocząsteczek komórkowych jest umiarkowane. Związek nie stymuluje też istotnego elementu obrony antyoksydacyjnej komórki, który stanowią enzymy antyoksydacyjne. Wyjaśnienie wykazanej w pracy rozbieżności pomiędzy poziomem ekspresji mRNA a aktywnością tych enzymów wymaga dalszych badań. Jednak DMU-212 wykazuje działanie hepatoprotekcyjne i zmniejsza nasilenie wczesnych zmian neoplastycznych w wątrobie. Można przypuszczać, że zastosowanie wyższych dawek związku pozwoliłoby ujawnić w pełni jego potencjał chemoprewencyjny.

## SUMMARY

***Title: "Evaluation of antioxidant properties of 3,4,5,4' - tetramethoxystilbene in rat model of chemical carcinogenesis"***

Despite the significant progress in the diagnosis and therapy of oncological diseases, medicine has no effective means to treat liver neoplasms. One of the most promising actions in this field is chemoprevention involving the use of substances that reduce the risk of development and recurrence of neoplasm. Resveratrol, which is phytoalexin and occurs in the grape skins, among others, has such properties. Low bioavailability of resveratrol has prompted researchers to search for biologically active derivatives of this stilbene which would have improved pharmacokinetic parameters. Chemical modification of the resveratrol molecule led to the development of trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (DMU-212). Studies conducted in several cell lines showed that DMU-212 had higher cytotoxicity and antitumor activity than resveratrol. The mechanism of DMU-212 activity is based, among others, on reducing the expression of enzymes that catalyze procarcinogen activation, inhibiting cell cycle and stimulating apoptosis.

Rat model of chemical carcinogenesis was used to evaluate whether there is a link between the antioxidant activity of DMU-212 and the potential chemopreventive and anti-tumour properties.

The applied model involved a single administration of liver-specific carcinogen N-nitrosodiethylamine (NDEA) to rats. It initiates neoplastic process, which is then promoted by the repeated administration of phenobarbital (PB). The metabolic activation of NDEA induces in the liver the formation of electrophilic metabolites which react with DNA and reactive oxygen species that initiate the process of carcinogenesis.

Three groups of male Wistar rats were administered N-nitrosodiethylamine intraperitoneally in a single dose of 200 mg/kg body weight. From the second week of the experiment, the above mentioned groups received drinking water containing 0.05% of phenobarbital (PB). The rats from the two groups were administered DMU-212 orally twice a week at doses of 20 and 50 mg/kg body weight for 16 weeks. The tested

compound alone was given orally to one group of rats twice a week at a dose of 50 mg/kg body weight. The control group received 40% solution of 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (vehicle) twice a week. After the end of the experiment the rats were anesthetized, blood was drawn from their heart, the liver and kidneys were collected.

Markers of oxidative damage and selected antioxidant defence parameters were determined in the liver. Both doses of DMU-212 reduced the effects of oxidative stress induced by NDEA as evidenced by the lowering of lipid peroxidation by 29% and 19% and oxidative damage to proteins by 17% and 31%. However, the degree of DNA damage did not change. An increase in the concentration of the most important cellular antioxidant, that is reduced glutathione, was a beneficial effect caused by the tested compound. The level of glutathione, which had been diminished by NDEA/PB, increased in a dose dependent manner, by 30% and 55%, respectively.

In the rats exposed to NDEA/PB, the activity of all antioxidant enzymes assayed in the liver (except for G-6-PD) decreased by 32%-77% compared with the control group. These changes were not reflected in the results of mRNA expression because they showed an increase in the expression of the four enzymes by 44%-53%; the expression of the two enzymes has not changed, and one has decreased by 40%. The administration of DMU-212 to the rats exposed to NDEA/PB did not alter the activity of catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST). However, there was a further reduction in the activity of superoxide dismutase (SOD) by 49% and an increase in the activity of the other 3 enzymes: glutathione peroxidase (GPx), NADPH:quinone oxidoreductase (NQO1) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD), by 38%, 102% and 31%, respectively. In these animals, there was no correlation between the activity of most enzymes and their mRNA expression, whose level in the case of CAT, GR, GST and NQO1 decreased, by 68%, 86%, 82% and 55% due to the lower dose of the compound. The trends of the two parameters were consistent for GPx and G-6-PD, because the level of their transcripts increased by 41% and 31%, respectively. Available literature data suggest that post-transcriptional and post-translational modifications along with proteasome protein degradation may be responsible for the lack of correlation between mRNA expression of the enzymes and their activity.

The measurement of mRNA expression in antioxidant enzymes revealed the biphasic character of dose-response relationship: a lower dose of DMU-212 reduced the

expression of almost all the enzymes by 55% - 92%, while a higher dose increased the expression by 24% - 69%, compared to animals exposed to carcinogen.

The administration of DMU-212 to rats not exposed to carcinogen resulted in a slight statistically insignificant increase of the glutathione content and a small decrease in lipid peroxidation. The response of antioxidant enzymes varied. The activity of GPx and GR decreased, by 26% and 44%, respectively, while the activity of NQO1 significantly increased by 87%. The diminished activity of the above mentioned antioxidant enzymes could be due to the improvement of the redox state of liver cells by the administration of exogenous antioxidant. It can be also assumed that DMU-212 is an NQO1 inducer and this property increases the chemopreventive potential of the compound. Immunohistochemistry tests showed the reduced levels of protein expression for markers of carcinogenesis: GGT, RB, p53 in the liver under the influence of DMU-212. This indicates the restriction of early neoplastic lesions caused by carcinogen. In serum of animals treated with DMU-212, the activity of the two enzymes indicative of the liver function, that is lactate dehydrogenase and sorbitol dehydrogenase, which had been elevated by NDEA/PB, decreased. This suggests hepatoprotective properties of the tested compound. The applied experimental model showed neither kidney damage due to NDEA/PB nor the protective action of DMU-212. This probably results from the organ specificity of NDEA. Biotransformation of this carcinogen takes place mainly in the liver, therefore other organs are less vulnerable to damage. A marked increase in the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase under the influence of DMU-212 was the only beneficial change in the kidney.

To sum up, it can be concluded that the protective effect of DMU-212 in important cellular macromolecules against oxidative damage is moderate. This compound also does not stimulate antioxidant enzymes, which are an important element of antioxidant cell defence. Further studies are required to explain the discrepancy, which appeared in the study, between the level of mRNA expression and the activity of the enzymes. On the other hand, DMU-212 demonstrates the hepatoprotective activity and reduces the severity of early neoplastic lesions in the liver. It can be assumed that the use of higher doses of the compound would reveal its full chemopreventive potential.



## LITERATURA

1. Gullett, N.P.; Ruhul Amin, A.R.; Bayraktar, S.; Pezzuto, J.M. *et al.* Cancer prevention with natural compounds. *Semin Oncol* 2010; 37(3): 258–281.
2. Ma, Z.; Molavi, O.; Haddadi, A.; Lai, R. *et al.* Resveratrol analog trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (DMU-212) mediates anti-tumor effects via mechanism different from that of resveratrol. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 63(1): 27–35.
3. Sale, S.; Tunstall, R.G.; Ruparelia, K.C.; Potter, G.A. *et al.* Comparison of the effects of the chemopreventive agent resveratrol and its synthetic analog trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (DMU-212) on adenoma development in the Apc(Min+) mouse and cyclooxygenase-2 in human-derived colon cancer cells. *Int J Cancer* 2005; 115(2): 194–201.
4. Gossiau, A.; Chen, M.; Ho, C.T.; Chen, K.Y. A methoxy derivative of resveratrol analogue selectively induced activation of the mitochondrial apoptotic pathway in transformed fibroblasts. *Br J Cancer* 2005; 92(3): 513–521.
5. Piotrowska, H.; Myszkowski, K.; Ziółkowska, A.; Kulcenty, K. *et al.* Resveratrol analogue 3,4,4',5-tetramethoxystilbene inhibits growth, arrests cell cycle and induces apoptosis in ovarian SKOV-3 and A-2780 cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 263(1): 53–60.
6. Piotrowska, H.; Myszkowski, K.; Abraszek, J.; Kwiatkowska-Borowczyk *et al.* DMU-212 inhibits tumor growth in xenograft model of human ovarian cancer. *Biomed Pharmacother* 2014; 68(4): 397–400.
7. Cichocki, M.; Baer-Dubowska, W.; Wierzchowski, M.; Murias, M.; Jodynis-Liebert, J. 3,4,5,4'-trans-tetramethoxystilbene (DM-212) modulates the activation of NF- $\kappa$ B, AP-1, and STAT3 transcription factors in rat liver carcinogenesis induced by initiation-promotion regimen. *Mol Cell Biochem* 2014; 391(1–2): 27–35.
8. Klaunig, J.E.; Kamendulis, L.M.; Hocevar, B.A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2010; 38(1): 96–109.

9. Talalay, P.; Dinkova-Kostova, T.; Holtzclaw, D.W. Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis. *Adv Enzyme Regul* 2003; 43(1): 121–134.
10. Köhle, C.; Bock, K.W. Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 2006; 72(7): 795–805.
11. Jaiswal, A.K. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 2004; 36(10): 1199–1207.
12. Giudice, A.; Montella, M. Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention. *BioEssays* 2006; 28(2): 169–181.
13. Niture, S.K.; Khatri, R.; Jaiswal, A.K. Regulation of Nrf2 – an update. *Free Radic Biol Med* 2014; 66: 36–44.
14. Kryzstofiak, A.; Krajka-Kuźniak, V. Kiedy obrona staje się niebezpieczna – czynnik transkrypcyjny Nrf2 a nowotwory. *Post Hig Med Dosw (online)* 2015; 69: 140–152.
15. Osburn, W.O.; Kensler, T.W. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat Res* 2008; 659(1–2): 31–39.
16. Verna, L., Whysner, J., Williams, G.M. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther* 1996; 71(1–2): 57–81.
17. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine* (4<sup>th</sup> ed.). Oxford University Press, Oxford 2007.
18. Matyska-Piekarska, E.; Łuszczewski, A.; Łącki, J.; Wawer, I. Rola stresu oksydacyjnego w etiopatogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2006; 60: 617–623.
19. Rao, S.; Kalva, S.; Yerramilli, A.; Mamidi S. Free radicals and tissue damage: role of antioxidants. *Free Radic Antioxid* 2011; 1(4): 2–7.
20. Bailey, S.M.; Landar, A.; Darley-Usmar, V. Mitochondrial proteomics in free radical research. *Free Radic Biol Med* 2005; 38(2): 175–188.
21. Rosen, G.M.; Tsai, P.; Pou, S. Mechanism of free-radical generation by nitric oxide synthase. *Chem Rev* 2002; 102(4): 1191–1200.
22. Tripathi, P.; Hildeman, D. Sensitization of T cells to apoptosis – a role for ROS? *Apoptosis* 2004; 9(5): 515–523.

23. Bartosz, G. *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie.* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.
24. Murphy, M.; Holmgren, A.; Larsson, N.; Halliwell, B. *et al.* Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab* 2011; 13(4): 361–366.
25. Poljsak, B.; Šuput, D.; Milisav, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 956792 (doi: 10.1155/2013/956792).
26. Bartosz, G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol* 2009; 77(8): 1303–1315.
27. Burton, G.J.; Jauniaux, E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011; 25(3): 287–299.
28. Salvemini, D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cell Moll Life Sci* 1997; 53(7): 576–582.
29. De Rojas-Walker, T.; Tamir, S.; Ji, H.; Wishnok, J.S. Tannenbaum S.R.: Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chem Res Toxicol* 1995; 8(3): 473–477.
30. Gal, A.; Wogan, G.N. Mutagenesis associated with nitric oxide production in transgenic SJL mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(26): 15102–15107.
31. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J of Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44–84.
32. Fialkov, L.; Wang, Y.; Downey, G.P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 2007; 42(2): 153–164.
33. Gdula-Argasińska, J.; Tyszka-Czochara, M.; Paško, P.; Opoka, W. Rola wolnych rodników w regulacji procesów fizjologicznych. *Med Inter Rev* 2012; 25(99): 41–46.
34. Gorbunov, N.V.; Yalowich, J.C.; Gaddam, A.; Thampatty, P. *et al.* Nitric oxide prevents oxidative damage produced by tert-butyl hydroperoxide in erythroleukemia cells via nitrosylation of heme and non-heme iron. *J Biol Chem* 1997; 272(19): 12328–12341.
35. Kvietys, P.R.; Granger, D.N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med* 2012; 52(3): 556–592.

36. Gutowicz, M. Wpływ reaktywnych form tlenu na ośrodkowy układ nerwowy. *Postepy Hig Med Dosw* 2011; 65: 104–113.
37. Potargowicz, E.; Szerszenowicz, E.; Staniszevska, M.; Nowak, D. Mitochondria jako źródło reaktywnych form tlenu. *Postepy Hig Med Dosw* (online) 2005; 59: 259–266.
38. Ploszaj, T.; Robaszkiewicz, A.; Witas, H. Oksydacyjne uszkodzenia mitochondrialnego DNA – przyczyna czy skutek zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu. *Post Bioch* 2010; 56(2): 139-146.
39. Ježek, P; Hlavata, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(12): 2478–2503.
40. Cichocki, M. Biochemiczne i molekularne podstawy biotransformacji ksenobiotyków. Wydawnictwo UM, Poznań 2015: 27, 31.
41. Stryer, L.B.: *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997: 751. ISBN 83-01-12044-4.
42. Paszkowski, T.; Clarke, R.N.; Hornstein, M.D. Smoking induces oxidative stress inside the Graafian follicle. *Human Reprod* 2002; 17(4): 921–925.
43. Edwards, S.W. The respiratory burst: The generation of reactive oxygen metabolites and their role in bacterial killing. In: Edwards, S.W. (ed.): *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*. Cambridge University Press 1994: 149–158.
44. Hussain, S.P.; Hofseth, L.J.; Harris, C.C. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(4): 276–285.
45. Valko, M.; Jomova, K.; Rhodes, C.J.; Kuča, K.; Musílek, K. Redox-and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol* 2016, 90(1): 1–37.
46. Choi, W.S.; Shin, P.G.; Lee, J.H.; Kim, G.D. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS – stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cell Immunol* 2012; 208(2): 164–170.
47. Kaszowska, M. Budowa chemiczna i biosynteza lipopolisacharydu – ważnego składnika osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych. *Post Hig Med Dosw* 2004; 58: 333–334.
48. Grajek, W. *Przeciwutleniacze w żywności*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2007.

49. Mark, G.; Schuchmann, H.P.; Sonntag, C. Formation of peroxynitrite by sonication of aerated water. *J Am Chem Soc* 2000; 122(15): 3781–3782.
50. Brieger, K.; Schiavone, S.; Miller Jr, F.J.; Krause, K.H. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* 2012; 142: w13659.
51. Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006; 97(6): 1634–1658.
52. Gutteridge, J.M.; Halliwell, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 1990; 15(4): 129–135.
53. Kumar, S.; Bandyopadhyay, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* 2005; 157(3): 175–188.
54. Mari, M.; Colell, A.; Morales, A.; von Montfort, C. *et al.* Redox control of liver function in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2010; 12(11): 1295–1331.
55. Niki, E. Antioxidants: basic principles, emerging concepts, and problems. *Biomed J* 2014; 37(3): 106–111.
56. Karpińska, A.; Gromadzka, G. Stres oksydacyjny i naturalne mechanizmy antyoksydacyjne – znaczenie w procesie neurodegeneracji. Od mechanizmów molekularnych do strategii terapeutycznych. *Postepy Hig Med Dosw* 2013; 67: 43–53.
57. Yamamoto, S. „Enzymatic” lipid peroxidation: reactions of mammalian lipoxygenases. *Free Radic Biol Med* 1991; 10(2): 149–159.
58. Dasuri, K.; Zhang, L.; Kelner, J.N. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic Biol Med* 2013; 62: 170–185.
59. Aulak, K.S.; Miyagi, M.; Yan, L.; West, K.A. *et al.* Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12056–12061.
60. Dalle-Donne, I.; Scaloni, A.; Giustarini, D.; Cavarra, E. *et al.* Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev* 2005; 24(1): 55–99.
61. Dalle-Donne, I.; Aldini, G.; Carini, M.; Colombo, R. *et al.* Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006; 10(2): 389–406.

62. Butterfield, D.A., Dalle-Donne, I. Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and disease. *Mass Spectrom Rev* 2014; 33(1): 1–6.
63. Castro, J.P.; Jung, T.; Grune, T.; Almeida, H. Actin carbonylation: from cell dysfunction to organism disorder. *J Proteomics* 2013; 92: 171–180.
64. Martínez, A.; Portero-Otin, M.; Pamplona, R.; Ferrer, I. Protein targets of oxidative damage in human neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates. *Brain Pathol* 2010; 20(2): 281–297.
65. Bachi, A.; Dalle-Donne, I.; Scaloni, A. Redox proteomics: chemical principles, methodological approaches and biological/biomedical promises. *Chem Rev* 2013; 113(1): 596–698.
66. Fritz, K.S.; Petersen, D.R. An overview of the chemistry and biology of reactive aldehydes. *Free Radic Biol Med* 2013; 59: 85–91.
67. Colzani, M.; Aldini, G.; Carini, M. Mass spectrometric approaches for the identification and quantification of reactive carbonyl species protein adducts. *J Proteomics* 2013; 92: 28–50.
68. Higuchi, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(8): 1527–1535.
69. Helleday, T.; Lo, J.; van Gent, D.C.; Engelward, B.P. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* 2007; 6(7): 923–935.
70. Bergamini, C.M.; Gambetti, S.; Dondi, A.; Cervellati, C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Des* 2004; 10(14): 1611–1626.
71. Dizdaroglu, M. Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS Lett* 1993; 315(1): 1–6.
72. Dizdaroglu, M. Free-radical-induced formation of an 8,5'-cyclo-2'-deoxyguanosine moiety in deoxyribonucleic acid. *Biochem J* 1986; 238(1): 247–254.
73. Evans, M.D.; Dizdaroglu, M.; Cooke, M.S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 2004; 567(1): 1–61.
74. Jaruga, P.; Theruvathu, J.; Dizdaroglu, M.; Brooks, P.J. Complete release of (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine from dinucleotides, oligodeoxynucleotides and DNA, and direct comparison of its levels in cellular DNA with other oxidatively induced DNA lesions. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(11): e87.

75. Oliński, R.; Gackowski, D.; Różalski, R.; Foksiński, M.; Białkowski, K. Oxidative DNA damage in cancer patients: a cause or a consequence of the disease development? *Mutat Res* 2003; 531(1–2): 177–190.
76. Ścibior, D.; Czeczot, H. Katalaza – budowa, właściwości, funkcje. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2006; 60: 170–180.
77. Jankowska-Lech, I.; Grabska-Liberek, I.; Krzyżewska-Niedziałek, A.; Pietruszyńska, M. Zwyródnienie plamki związane z wiekiem (AMD) – choroba starzejących się społeczeństw. *Post Nauk Med* 2013; 12: 868–873.
78. Rügheimer, L. Hyaluronan. A matrix component. *Proc AIP Conf* 2008; 1049(1): 126–132.
79. Kablik, J.; Monheit, G.D.; Yu, L.; Chang, G.; Gershkovich, J. Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatol Surg* 2009; 35 (Suppl 1): 302–312.
80. Kogan, G.; Soltés, L.; Stern, R.; Schiller, J.; Mendichi, R. Hyaluronic acid: its function and degradation in in vivo systems. *Stud Nat Prod Chem* 2008; 34: 789–882.
81. Kogan, G.; Soltés, L.; Stern, R.; Gemeiner, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett* 2007; 29(1): 17–25.
82. Laurent, T.C; Laurent, U.B.; Fraser J.R. Serum hyaluronan as a disease marker. *Ann Med* 1996; 28(3): 241–253.
83. Avila, R.E.; Carmo, R.A.; Farah Kde, P.; Teixeira, A.L. *et al.* Hyaluronic acid in the evaluation of liver fibrosis in patients with hepatitis C on haemodialysis. *Braz J Infect Dis* 2010; 14(4): 335–341.
84. Duruöz, M.T.; Turan, Y; Cerrahoglu, L; Isbilen, B. *et al.* Serum hyaluronic acid levels in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 2008; 27(5): 621–626.
85. Meyer, L.J.; Stern, R. Age-dependent changes of hyaluronan in human skin. *J Invest Dermatol* 1994; 102(3): 385–389.
86. Yan, M.H.; Wang, X.; Zhu, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med* 2013; 62: 90–101.
87. Skólmowska, M.; Kmiec, M. Enzymosomy antyoksydacyjne – właściwości i zastosowanie. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2011; 65: 640–644.

88. Harris, E.D. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992; 6(9): 2675–2683.
89. Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160(1): 1–40.
90. Faraci, F.M.; Didion, S.P. Vascular protection superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(8): 1367–1373.
91. Woźniak, M.; Czyż, M. Mimetyki dysmutazy ponadtlenkowej – potencjalne zastosowania kliniczne. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2008; 62: 613–624.
92. St Clair, D.K.; Holland, J.C. Complementary DNA encoding human colon cancer manganese superoxide dismutase and the expression of its gene in human cells. *Cancer Res* 1991; 51(3): 939–943.
93. Van Remmen, H.; Ikeno, Y.; Hamilton, M.; Pahlavani, M. *et al.* Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics* 2003; 16(1): 29–37.
94. Visner, G.A.; Dougall, W.C.; Wilson, J.M.; Burr, I.A.; Nick, H.S. Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J Biol Chem* 1990; 265(5): 2856–2864.
95. Frank, S.; Kämpfer, H.; Podda, M.; Kaufmann, R.; Pfeilschifter, J. Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: implications for keratinocyte proliferation. *Biochem J* 2000; 346 (Pt 3): 719–728.
96. Kim, H.P.; Roe, J.H.; Chock, P.B.; Yim, M.B. Transcriptional activation of the human manganese superoxide dismutase gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate. *J Biol Chem* 1999; 274(52): 37455–37460.
97. Bernard, D.; Quatannens, B.; Begue, A.; Vandebunder, B.; Abbadie, C. Antiproliferative and antiapoptotic effects of crel may occur within the same cells via the up – regulation of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* 2001; 61(15): 2656–2664.
98. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2V0A>, dostęp: 2.08.2015.



99. Sokołowska, M.; Włodek, L. Dobre i złe strony tlenu azotu. *Folia Cardiol* 2001; 8(5): 467–477.
100. Fiedurek, J.; Szczodrak, J. Katalaza – właściwości, rola fizjologiczna i zastosowanie. *Post Mikrobiol* 1997; 36: 71–80.
101. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1F4J>, dostęp: 2.08.2015.
102. Lloyd, B.; Robson, E.; Smith, I.; Clayton, B.E. Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activity. *Arch Dis Childh* 1989; 64(3): 352–356.
103. Herbette, S.; Roeckel-Drevet, P.; Drevet, J.R. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J* 2007; 274(9): 2163–2180.
104. Almar, M.; Otero, L.; Santos, C.; González Gallego, J. Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. *J Environ Sci Health* 1998; 33(6): 769–783.
105. Armstrong, D. (ed.). *Free Radicals in Diagnostic Medicine: A Systems Approach to Laboratory Technology, Clinical Correlations, and Antioxidant Therapy*. Springer Science & Business Media 2012: 271.
106. Pardini, R.S. Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active prooxidants. *Arch Insects Biochem Physiol* 1995; 29: 101–118.
107. Marí, M.; Morales, A.; Colell, A.; García-Ruiz, C.; Fernández-Checa, J.C. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(11): 2685–2700.
108. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2F8A>, dostęp: 2.08.2015.
109. Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830(5): 3217–3266.
110. Karplus, P.A.; Schulz, G.E. Refined structure of glutathione reductase at 1.54 Å resolution. *J Mol Biol* 1987; 195(3): 701–729.
111. Savvides, S.N.; Karplus, P.A. Kinetics and crystallographic analysis of human glutathione reductase in complex with a xanthene inhibitor. *J Biol Chem* 1996; 271(14): 8101–8107.

112. Czarna, M.; Jarmuszkiewicz, M. Rola mitochondriów w wytwarzaniu i usuwaniu reaktywnych form tlenu; związek z przesyłaniem sygnałów i programowaną śmiercią komórki. *Post Biochem* 2006; 52: 145–156.
113. Rogers, L.K.; Tamura, T.; Rogers, B.J.; Welty, S.E. *et al.* Analyses of glutathione reductase hypomorphic mice indicate a genetic knockout. *Toxicol Sci* 2004; 82(2): 367–373.
114. Augustyniak, A.; Michalak, K.; Skrzydlewska, E.L. Wpływ stresu oksydacyjnego indukowanego etanolem na ośrodkowy układ nerwowy (OUN). *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2005; 59: 464–471.
115. [https://commons.wikimedia.org/wiki/Molecular\\_and\\_Cellular\\_Biology#/media/File:Glutathione\\_reductase.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/Molecular_and_Cellular_Biology#/media/File:Glutathione_reductase.png).
116. Krajka-Kuźniak, V. Indukcja enzymów II fazy jako strategia chemioprewencji nowotworów i innych schorzeń degeneracyjnych. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2007; 61: 627–638.
117. Oakley, A.J. Glutathione transferases: new functions. *Curr Opin Struct Biol* 2005; 15(6): 716–723.
118. Gallagher, E.P.; Gardner, J.L.; Barber, D.S. Several glutathione S-transferase isozymes that protect against injury are expressed in human liver mitochondria. *Biochem Pharmacol* 2006; 71(11): 1619–1628.
119. Raza, H.; Robin, M.; Fang, J.K.; Avadhani, N. Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J* 2002; 366 (Pt 1): 45–55.
120. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1PKW>, dostęp: 5.06.2016.
121. Siegel, D.; Gustafson, D.L.; Dehn, D.L.; Han, J.Y. *et al.* NAD(P) H: quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol Pharmacol* 2004; 65(5): 1238–1247.
122. Zhu, H.; Jia, Z.; Mahaney, J.E.; Ross, D. *et al.* The highly expressed and inducible endogenous NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 in cardiovascular cells acts as a potential superoxide scavenger. *Cardiovasc Toxicol* 2007; 7(3): 202–211.

123. Xu, Y.; Zhang, Z.; Hu, J.; Stillman, I.E. *et al.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient mice have increased renal oxidative stress and increased albuminuria. *FASEB J* 2010; 24(2): 609–616.
124. Labudda, M. Biochemiczne mechanizmy neurotoksyczności kadmu. *Roczniki PZH* 2011; 62: 357–363.
125. Łukaszewicz-Hussain, A. Role of oxidative stress in organophosphates insecticide toxicity – short review. *Pest Biochem Physiol* 2010; 98(2): 145–150.
126. Łukaszewicz-Hussain, A. Stężenie glukozy w surowicy krwi w podostrym zatruciu chlorpyrifosem – insektycydem fosforoorganicznym. *Med Pr* 2013; 64(4): 527–531.
127. Luzzatto, L.; Nannelli, C.; Notaro, R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am* 2016; 30(2): 373–393.
128. Zhang, C.; Zhang, Z.; Zhu, Y.; Qin, S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a biomarker and potential therapeutic target for cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 2014; 14(2): 280–289.
129. Hu, H.; Ding, X.; Yang, Y.; Zhang, H. *et al.* Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase expression results in altered behavior of HBV-associated liver cancer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014; 307(6): G611–G622.
130. Lu, S.C. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830(5): 3143–3153.
131. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/124886#section=Top>, dostęp: 5.06.2016.
132. Konopacka, M. Rola witaminy C w uszkodzeniach oksydacyjnych DNA. *Postepy Hig Med Dosw* 2004 (online); 58: 343–348.
133. Łukaszewicz-Hussain A. Rola glutationu i enzymów z nim związanych w procesach antyoksydacyjnych organizmu. *Med Pr* 2003; 54(5): 473–479.
134. Siemieniuk, E.; Skrzydlewska, E. Koenzym Q<sub>10</sub> – biosynteza i znaczenie biologiczne w organizmach zwierząt i człowieka. *Postepy Hig Med Dosw* (online) 2005; 59: 150–159.
135. Dela Seña, C.; Riedl, K.M.; Narayanasamy, S.; Curley, R.W. *et al.* The human enzyme that converts dietary provitamin A carotenoids to vitamin A is a dioxygenase. *Journal of Biological Chemistry* 2014; 289(19): 13661–13666.

136. Guz, J.; Dziaman, T.; Szpila, A. Czy witaminy antyoksydacyjne mają wpływ na proces karcynogenezy? *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2007; 61: 185–198.
137. Baer-Dubowska, W.; Ignatowicz, E. Chemoprevention of cancer: basic mechanisms and molecular targets. In: Baer-Dubowska, W.; Bartoszek, A.; Malejka-Giganti, D. (eds.): *Carcinogenic and Anticarcinogenic Food Components*. CRC Taylor & Francis, Boca Raton 2005: 175–194.
138. Cyranka, M.; Kapka, L.; Rzeski, W. Chemoprewencja nowotworów – perspektywy zastosowania w profilaktyce i terapii. *Zdr Publ* 2009; 119(2): 223–227.
139. Surh, Y.J.; Kundu, J.K.; Na, H.K. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med* 2008; 74(13): 1526–1539.
140. Beal, M.F.: Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32(9): 797–803.
141. Przybyszewski, W.M.; Kasperczyk, J.; Stokłosa, K.; Bkhiyan, A. Uszkodzenia DNA powodowane przez produkty peroksydacji lipidów. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2005; 59: 75–81.
142. Suh, D.H.; Kim, M.K.; Kim, H.S.; Chung, H.H.; Song, Y.S. Cancer-specific therapeutic potential of resveratrol: metabolic approach against hallmarks of cancer. *Funct Food Health Dis* 2013; 3(8): 332–343.
143. Sale, S; Verschoyle, R.D.; Boocock, D.; Jones, D.J.L. *et al.* Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene. *Br J Cancer* 2004; 90(3): 736–744.
144. Fulda, S. Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer. *Drug Discov Today* 2010; 15(17–18): 757–765.
145. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438: 932–936.
146. Chen, L.; Qiang, P.; Zhao, Y.; Dai, F.; Zhang, L. Trans-3,4,5,4'-tetramethoxystilbene, a resveratrol analog, potently inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34(9): 1174–1182.
147. Androutsopoulos, V.P.; Fragiadaki, I.; Tosca, A. Activation of ERK1/2 is required for the antimitotic activity of the resveratrol analogue

- 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (DMU-212) in human melanoma cells. *Exp Dermatol* 2015; 24(8): 632–634.
148. Mikstacka, R.; Stefański, T.; Róžański, J. Tubulin-interactive stilbene derivatives as anticancer agents. *Cell Mol Biol Lett* 2013; 18(3): 368–397.
149. Penthala, N.R.; Thakkar, S.; Crooks, P.A. Heteroaromatic analogs of the resveratrol analog DMU-212 as potent anti-cancer agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2015; 25(14): 2763–2767.
150. Borys, S.; Kucińska, M.; Trzybulska, D.; Kaczmarek, M. *et al.* Methylated resveratrol analogue DMU-212 undergoes metabolic activation to DMU-214 in ovarian A-2780 and SKOV-3 cancer cells. *Clin Cancer Res* 2016; 22 (1 Suppl): abstr. 40.
151. Nowak, A.; Libudzisz, Z. Karcynogeny w przewodzie pokarmowym człowieka, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 2008; 4: 9–25.
152. Lijinsky W. N-nitroso compounds in the diet. *Mutat Res* 1999; 443(1): 129–138.
153. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France; IARC, 2000; 77: 403–438.
154. Aiub C.A.; Pinto L.F.; Felzenszwalb I. Standardization of conditions for the metabolic activation of N-nitrosodiethylamine in mutagenicity tests. *Genet Mol Res.* 2004; 3(2): 264-272.
155. Yamada, K.I.; Yamamiya, I.; Utsumi, H. In vivo detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue. *Free Radic Biol Med* 2006; 40(11): 2040–2046.
156. Mittal, G.; Brar, A.P.S.; Soni, G. Impact of hypercholesterolemia on toxicity of N-nitrosodiethylamine: biochemical and histopathological effects. *Pharmacol Rep* 2006; 58(3): 413.
157. Anis, K.; Rajesh, N.; Kuttan, R. Inhibition of chemical carcinogenesis by berberine in rats and mice. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53(5): 763–768.
158. Jirtle, R.L.; Meyer, S.A. Liver tumor promotion: effect of phenobarbital on EGF and protein kinase C signal transduction and transforming growth factor- $\beta$ 1 expression. *Dig Dis Sci* 1991; 36(5): 659–668.
159. Banakar, M.C.; Paramasivan, S.K.; Chattopadhyay, M.B.; Datta, S. *et al.* 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 prevents DNA damage and restores antioxidant

- enzymes in rat hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine and promoted by phenobarbital. *World J Gastroenterol* 2004; 10(9): 1268–1275.
160. Sreepriya, M.; Bali, G. Effects of administration of Embelin and Curcumin on lipid peroxidation, hepatic glutathione antioxidant defense and hematopoietic system during N-nitrosodiethylamine/Phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats. *Mol Cell Biochem* 2006; 284(1–2): 49–55.
161. Yadav, A.S.; Bhatnagar, D. Chemo-preventive effect of Star anise in N-nitrosodiethylamine initiated and phenobarbital promoted hepato-carcinogenesis. *Chem Biol Interact* 2007; 169(3): 207–214.
162. Saraswati, S.; Alhaider, A.A.; Agrawal, S.S. Anticarcinogenic effect of brucine in diethylnitrosamine initiated and phenobarbital-promoted hepatocarcinogenesis in rats. *Chem Biol Interact* 2013; 206(2): 214–221.
163. Bishayee, A.; Barnes, K.F.; Bhatia, D.; Darvesh, A.S.; Carroll, R.T. Resveratrol suppresses oxidative stress and inflammatory response in diethylnitrosamine-initiated rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3(6): 753–763.
164. Jemal, A.; Bray, F.; Center, M.M.; Ferlay, J. *et al.* Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69–90.
165. Chan, S.L.; Yeo, W. Targeted therapy of hepatocellular carcinoma: present and future. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27(5): 862–872.
166. Siegel, R.; Naishadham, D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; 63(1): 11–30.
167. Jeena, K.J.; Joy, K.L.; Kuttan, R. Effect of *Embllica officinalis*, *Phyllanthus amarus* and *Picrorrhiza kurroa* on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 1999; 136(1): 11–16.
168. Llovet, J.M.; Ricci S.; Mazzaferro, V.; Hilgard, P. *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359(4): 378–390.
169. Guilford, J.M.; Pezutto, J.M.: Natural products as inhibitors of carcinogenesis. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17(9): 1341–1352.
170. Hung, L.M.; Su, M.J.; Chu, W.K.; Chiao, C.W. *et al.* The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *Br J Pharmacol* 2002; 135(7): 1627–1633.

171. Nabeshima, A.; Yamada, S.; Guo, X.; Tanimoto, A. *et al.* Peroxiredoxin 4 protects against nonalcoholic steatohepatitis and type 2 diabetes in a nongenetic mouse model. *Antioxid Redox Signal* 2013; 19(17): 1983–1998.
172. Lanzetti, M.; da Costa, C.A.; Nesi, R.T.; Barroso, M.V. *et al.* Oxidative stress and nitrosative stress are involved in different stages of proteolytic pulmonary emphysema. *Free Radic Biol Med* 2012; 53(11): 1993–2001.
173. Meagher, E.A.; Fitz Gerald, G.A. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(12): 1745–1750.
174. Collins, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; 26(3): 249–261.
175. Bishayee, A.; Bhatia, D.; Thoppil, R.J.; Darvesh, A.S. *et al.* Pomegranate-mediated chemoprevention of experimental hepatocarcinogenesis involves Nrf2-regulated antioxidant mechanisms. *Carcinogenesis* 2011; 32(6): 888–896.
176. Raj Kapoor, B.; Jayakar, B.; Muruges, N.; Sakthisekaran, D. Chemoprevention and cytotoxic effect of *Bauhinia variegata* against N-nitrosodiethylamine induced liver tumors and human cancer cell lines. *J Ethnopharmacol* 2006; 104(3): 407–409.
177. Shahjahan, M.; Vani, G.; Shyamaladevi, C.S. Effect of *Solanum trilobatum* on the antioxidant status during diethyl nitrosamine induced and phenobarbital promoted hepatocarcinogenesis in rat. *Chem Biol Interact* 2005; 156(2–3): 113–123.
178. Jahan, M.S.; Vani, G.; Shyamaladevi, C.S. Effect of *Solanum trilobatum* on hepatic drug metabolizing enzymes during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis promoted by Phenobarbital in rat. *Hepatol Res* 2007; 37(1): 35–49.
179. Raj Kapoor, B.; Muruges, N.; Chodon, D.; Sakthisekaran, D. Chemoprevention of N-nitrosodiethylamine induced phenobarbital promoted liver tumors in rat by extract of *Indigofera aspalathoides*. *Biol Pharm Bull* 2005; 28(2): 364–366.
180. Rajeshkumar, N.V.; Kuttan, R. *Phyllanthus amarus* extract administration increases the life span of rats with hepatocellular carcinoma. *J Ethnopharmacol* 2000; 73(1–2): 215–219.

181. Kumar, A.; Sunita, P.; Pattanayak, S.P. Silibinin inhibits the hepatocellular carcinoma in NDEA-induced rodent carcinogenesis model: an evaluation through biochemical and bio-structural parameters. *J Cancer Sci Ther* 2015; 7: 206–215.
182. Dickinson, D.A.; Forman, H.J. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 973(1): 488–504.
183. Spolarics, Z.; Wu, J.X. Role of glutathione and catalase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in LPS-activated hepatic endothelial and Kupffer cells. *Am J Physiol* 1997; 273(6 Pt 1): G1304–G1311.
184. Merad-Saïdoune, M.; Boitier, E.; Nicole, A.; Marsac, C. *et al.* Overproduction of Cu/Zn-superoxide dismutase or Bcl-2 prevents the brain mitochondrial respiratory dysfunction induced glutathione depletion. *Exp Neurol* 1999; 158(2): 428–436.
185. Lu, S.C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* 1999; 13(10): 1169–1183.
186. Cadet, J.; Douki, T.; Gasparutto, D.; Ravanat, J.L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* 2003; 531(1–2): 5–23.
187. Williams, G.M.; Jeffrey, A.M. Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000; 32(3): 283–292.
188. Klaunig, J.E.; Kamendulis, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 239–267.
189. Trzeciak, A. Uszkodzenia DNA w komórkach ssaków. *Post Biol Kom* 2001; 3(28): 407–429.
190. Gupta, P.; Bansal, M.P.; Koul, A. Evaluating the effect of lycopene from *Lycopersicon esculentum* on apoptosis during NDEA induced hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 434(3): 479–485.
191. Krajka-Kuźniak, V.; Szaefer, H.; Ignatowicz, E.; Adamska, T.; Baer-Dubowska, W. Beetroot juice protects against N-nitrosodiethylamine-induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(6): 2027–2033.
192. Kujawska, M.; Ignatowicz, E.; Ewertowska, M.; Adamska, T. *et al.* Attenuation of KBrO<sub>3</sub>-induced renal and hepatic toxicity by cloudy apple juice in rat. *Phytother Res* 2013; 27(8): 1214–1219.



193. Wild, A.C.; Mulcahy, R.T. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression: insights into transcriptional control of antioxidant defenses. *Free Radic Res* 2000; 32(4): 281–301.
194. Myhrstad, M.C.; Carlsen, H.; Nordström, O.; Blomhoff, R.; Moskaug, J.Ø. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med* 2002; 32(5): 386–393.
195. Teoh-Fitzgerald, M.L; Domann, F.E.: Superoxide dismutase and cancer therapy. In: Spitz, D.R.; Dornfeld, K.J.; Krishnan, K.; Gius, D. (ed.). *Oxidative stress in cancer biology and therapy*. New York: Humana Press 2012: 59–84.
196. Pradeep, K.; Mohan, C.V.; Gobianand, K.; Karthikeyan, S. Silymarin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during diethylnitrosamine induced oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 560(2–3): 110–116.
197. Rodriguez, C.; Mayo, J.C.; Sainz, R.M.; Antolín, I. *et al.* Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36(1): 1–9.
198. Frederiks, W.M.; Bosch, K.S.; De Jong, J.S.; Van Noorden, C.J. Post-translational regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in (pre) neoplastic lesions in rat liver. *J Histochem Cytochem* 2003; 51(1): 105–112.
199. Sissung, T.M.; Price, D.K.; Sparreboom, A.; Figg, W.D. Pharmacogenetics and regulation of human cytochrome P450 1B1: implications in hormone-mediated tumor metabolism and a novel target for therapeutic intervention. *Mol Cancer Res* 2006; 4(3): 135–150.
200. Zhong, W.; Yan, T.; Lim, R.; Oberley, L.W. Expression of superoxide dismutases, catalase, and glutathione peroxidase in glioma cells. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(11–12): 1334–1345.
201. Bubko, I.; Gruber, B.M.; Anuszewska, E.L. Rola proteasomu w terapii chorób nieuleczalnych. *Post Hig Med Dosw* 2010; 64: 314–325.
202. Lubos, E.; Loscalzo, J.; Handy, D.E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(7): 1957–1997.

203. Calabrese, V.; Cornelius, C.; Dinkova-Kostova, A.T.; Iavicoli, I. *et al.* Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822(5): 753–783.
204. Mukherjee, S.; Dudley, J.I.; Das, D.K. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose Response* 2010; 8(4): 478–500.
205. Dey, A.; Guha, P.; Chattopadhyay, S.; Bandyopadhyay, S.K. Biphasic activity of resveratrol on indomethacin-induced gastric ulcers. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381(1): 90–95.
206. Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005; 45(4): 287–306.
207. Bouayed, J.; Bohn, T. Exogenous antioxidants-Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev* 2010; 3(4): 228–237.
208. Halliwell, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Arch. Biochem Biophys* 2008; 476(2): 107–112.
209. Masella, R.; Di Benedetto, R.; Vari, R.; Filesi, C.; Giovannini, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005; 16(10): 577–586.
210. Breinholt, V.; Lauridsen, S.T.; Dragsted, L.O. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica* 1999; 29(12): 1227–1240.
211. Galvez, J.; de la Cruz, J.P.; Zarzuelo, A.; Sanchez de la Cuesta, F. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. *Pharmacology* 1995; 51(2): 127–133.
212. González-Correa, J.A.; de la Cruz, J.P.; Gordillo, J.; Ureña, I. *et al.* Effects of silymarin MZ-80 on hepatic oxidative stress in rats with biliary obstruction. *Pharmacology* 2002; 64(1): 18–27.

213. Parkinson, A. Biotransformation of xenobiotics. In: Klaassen, C.D. (ed.): Casarett and Doull's Toxicology. 6<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, New York 2001: 147–148.
214. Hebbar, V.; Shen, G.; Hu, R.; Kim, B.R. *et al.* Toxicogenomics of resveratrol in rat liver. *Life Sci* 2005; 76(20): 2299–2314.
215. Sato, K.; Satoh, K.; Tsuchida, S.; Hatayama, I. *et al.* Specific expression of glutathione S-transferase Pi forms in (pre)neoplastic tissues: their properties and functions. *Tohoku J Exp Med* 1992; 168(2): 97–103.
216. Fukushima, S.; Gi, M.; Kakehashi, A.; Wanibuchi, H.; Matsumoto, M. Qualitative and quantitative approaches in the dose-response assessment of genotoxic carcinogens. *Mutagenesis* 2015; doi:10.1093/mutage/gev049.
217. Tsuda, H.; Fukushima, S.; Wanibuchi, H.; Morimura, K. Value of GST-P positive preneoplastic hepatic foci in dose-response studies of hepatocarcinogenesis: evidence for practical thresholds with both genotoxic and nongenotoxic carcinogens. A review of recent work. *Toxicol Pathol* 2003; 31(1): 80–86.
218. Corti, A.; Franzini, M.; Paolicchi, A.; Pompella, A. Gamma-glutamyltransferase of cancer cells at the crossroads of tumor progression, drug resistance and drug targeting. *Anticancer Res* 2010; 30(4): 1169–1181.
219. Stoimenov, I.; Helleday, T. PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem Soc Trans* 2009; 37 (Pt 3): 605–613.
220. Shiba, M.; Kohno, H.; Kakizawa, K.; Iizasa, T. *et al.* Ki-67 immunostaining and other prognostic factors including tobacco smoking in patients with resected nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2000; 89(7): 1457–1465.
221. Indovina, P.; Marcelli, E.; Casini, N.; Rizzo, V. Giordano, A. Emerging roles of RB family: new defense mechanisms against tumor progression. *J Cell Physiol* 2013; 228(3): 525–535.
222. Korenjak, M.; Brehm, A. E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15(5): 520–527.
223. Ryan, K.M.; Phillips, A.C.; Vousden, K.H. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13(3): 332–337.

224. Harris, S.L.; Levine, A.J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005; 24(17): 2899–2908.
225. Asher, G.; Lotem, J.; Kama, R.; Sachs, L.; Shaul, Y. NQO1 stabilizes p53 through a distinct pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(5): 3099–3104.
226. Chung, Y.H.; Kim, J.A.; Song, B.C.; Lee, G.C. *et al.* Expression of transforming growth factor- $\alpha$  mRNA in livers of patients with chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000; 89(5): 977–982.
227. Szutowicz, A.; Raszeja-Specht, A. (red.). *Diagnostyka laboratoryjna*. Tom I. Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk 2009.
228. Dembińska-Kieć, A.; Naskalski, J.W. (red.). *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej*; Urban & Partner, Wrocław 2002: 173–193.
229. Hyla-Klekot, L.; Kokot, F.; Kokot, S. *Badania laboratoryjne: zakres norm i interpretacja*. PZWL, Warszawa 2011: 69–74, 164–165, 196–197, 207–208, 278–279.
230. Ramaiah, S.K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food Chem Toxicol* 2007; 45(9): 1551–1557.
231. Ozer, J.; Ratner, M.; Shaw, M.; Bailey W.; Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 2008; 245(3): 194–205.
232. Angielski, S.; Dominiczak, M.H.; Jakubowski, Z. (red.). *Biochemia kliniczna*; Perseusz, Sopot 2000: 182–185.
233. Bansal, A.K.; Trivedi, R.; Soni, G.L.; Bhatnagar, D. Hepatic and renal oxidative stress in acute toxicity of N-nitrosodiethylamine in rats. *Indian J Exp Biol* 2000; 38(9): 916–920.
234. Rana, P.; Soni, G. Antioxidant potential of thyme extract: alleviation of N-nitrosodiethylamine-induced oxidative stress. *Hum Exp Toxicol* 2008; 27(3): 215–221.
235. Limón-Pacheco, J.; Gonsebatt, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res* 2009; 674(1–2): 137–147.
236. Taner, G.; Aydın, S.; Bacanlı, M.; Sarıgöl, Z. *et al.* Modulating effects of pycnogenol® on oxidative stress and DNA damage induced by sepsis in rats. *Phytother Res* 2014; 28(11): 1692–1700.

237. Das, A.K.; Bag, S.; Sahu, R.; Dua, T.K.; Sinha, M.K. *et al.* Protective effect of *Corchorus olitorius* leaves on sodium arsenite-induced toxicity in experimental rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(1): 326–335.
238. Dewanjee, S.; Das, A.K.; Sahu, R.; Gangopadhyay, M. Antidiabetic activity of *Diospyros peregrina* fruit: effect on hyperglycemia, hyperlipidemia and augmented oxidative stress in experimental type 2 diabetes. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(10): 2679–2685.
239. Sabuncuoglu, S.; Eken, A.; Aydin, A.; Ozgunes, H.; Orhan, H. Cofactor metals and antioxidant enzymes in cisplatin-treated rats: effect of antioxidant intervention. *Drug Chem Toxicol* 2015; 38(4): 375–382.
240. Leeuwenburgh, C.; Ji, L.L. Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch Biochem Biophys* 1995; 316(2): 941–949.
241. Strother, R.M.; Thomas, T.G.; Otsyula, M.; Sanders, R.A.; Watkins, J.B. Characterization of oxidative stress in various tissues of diabetic and galactose-fed rats. *Int J Exp Diabetes Res* 2001; 2(3): 211–216.
242. Linares, V.; Alonso, V.; Albina, M.L.; Bellés, M. *et al.* Lipid peroxidation and antioxidant status in kidney and liver of rats treated with sulfasalazine. *Toxicology* 2009; 256(3): 152–156.
243. González-Esquivel, A.E.; Charles-Niño, C.L.; Pacheco-Moisés, F.P.; Ortiz, G.G. *et al.* Beneficial effects of quercetin on oxidative stress in liver and kidney induced by titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles in rats. *Toxicol Mech Methods* 2015; 25(3): 166–175.
244. El-Shafey, M.M.; Abd-Allah, G.M.; Mohamadin, A.M.; Harisa, G.I.; Mariee, A.D. Quercetin protects against acetaminophen-induced hepatorenal toxicity by reducing reactive oxygen and nitrogen species. *Pathophysiology* 2015; 22(1): 49–55.
245. Stanton, R.C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival, *IUBMB Life* 2012; 64(5): 362–369.
246. Hartmann, E. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 2003; 18(1): 45–51.
247. Beers Jr, R.F. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1952; 195(1): 133–140.

248. Benson, A. M. Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77(9): 5216–5220.
249. Buss, H. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Rad Biol Med* 1997; 23(3): 361–366.
250. Chomczyński, P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156–159.
251. Higuchi, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 1992; 10(4): 413–417.
252. Mohandas, J. Low activities of glutathione-related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. *Cancer Res* 1984; 44(11): 5086–5091.
253. Murias, M.H. Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure-activity relationship. *Bioorg Med Chem* 2004; 12(21): 5571–5578.
254. Orten, J. M. *Human Biochemistry*. Mosby, St. Luis 1982.
255. Sanz, M.J. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. *Xenobiotica* 1994; 24(7): 689–699.
256. Sedlak, J. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192–205.
257. Sun, M. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem* 1978; 90(1): 81–89.
258. Thellin, O. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 1999, 75(2): 291–295.
259. Tietz, N. *Fundamentals of Clinical Chemistry*. PA: W.B. Saunders Co., Philadelphia 1976.

## SPIS TABEL

Tabela 1.1. Przykłady reaktywnych form tlenu i azotu [20–22] .....	13
Tabela 1.2. Powszechne modyfikacje białek wywołane wolnymi rodnikami [59,60] ...	26
Tabela 3.1. Schemat doświadczenia .....	53
Tabela 3.2. Startery i sondy wykorzystane w reakcji RT-qPCR .....	69
Tabela 4.1. Stężenie glutationu zredukowanego (GSH) w wątrobie szczurów .....	79
Tabela 4.2. Poziom mikrosomalnej nieindukowanej peroksydacji lipidów (LPO) w wątrobie szczurów.....	80
Tabela 4.3. Poziom mikrosomalnej indukowanej nieenzymatycznie (układem Fe <sup>2+</sup> /askorbinian) peroksydacji lipidów (LPO) w wątrobie szczurów.....	81
Tabela 4.4. Stężenie grup karbonylowych w białkach w wątrobie szczurów .....	82
Tabela 4.5. Poziom uszkodzeń DNA w wątrobie szczurów.....	83
Tabela 4.6. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w wątrobie szczurów.....	84
Tabela 4.7. Aktywność katalazy (CAT) w wątrobie szczurów .....	85
Tabela 4.8. Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) w wątrobie szczurów .....	86
Tabela 4.9. Aktywność reduktazy glutationowej (GR) w wątrobie szczurów .....	87
Tabela 4.10. Aktywność S-transferazy glutationowej (GST) w wątrobie szczurów.....	88
Tabela 4.11. Aktywność oksydoreduktazy NADP(H):chinon (NQO1) w wątrobie szczurów .....	89
Tabela 4.12. Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PD) w wątrobie szczurów .....	90
Tabela 4.13. Zmiany poziomu mRNA Sod-2 w wątrobie szczurów .....	91
Tabela 4.14. Zmiany poziomu mRNA Cat w wątrobie szczurów .....	92
Tabela 4.15. Zmiany poziomu mRNA Gpx-1 w wątrobie szczurów .....	93
Tabela 4.17. Zmiany poziomu mRNA Gst w wątrobie szczurów .....	95
Tabela 4.18. Zmiany poziomu mRNA Nqo1 w wątrobie szczurów.....	96
Tabela 4.19. Zmiany poziomu mRNA G6pd w wątrobie szczurów.....	97
Tabela 4.20. Wpływ 3,4,5,4'-tetrametoksystylbenu na wybrane parametry funkcji wątroby i nerek u szczurów .....	98
Tabela 4.21. Stężenie glutationu zredukowanego (GSH) w nerkach szczurów .....	104

Tabela 4.22. Poziom mikrosomalnej nieindukowanej peroksydacji lipidów (LPO) w nerkach szczurów.....	105
Tabela 4.23. Poziom mikrosomalnej indukowanej nieenzymatycznie (układem Fe <sup>2+</sup> /askorbinian) peroksydacji lipidów (LPO) w nerkach szczurów.....	106
Tabela 4.24. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w nerkach szczurów.....	107
Tabela 4.25. Aktywność katalazy (CAT) w nerkach szczurów.....	108
Tabela 4.26. Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) w nerkach szczurów.....	109
Tabela 4.27. Aktywność reduktazy glutationowej (GR) w nerkach szczurów.....	110
Tabela 4.28. Aktywność S-transferazy glutationowej (GST) w nerkach szczurów.....	111
Tabela 4.29. Aktywność oksydoreduktazy NADP(H):chinon (NQO1) w nerkach szczurów.....	112
Tabela 4.30. Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PD) w nerkach szczurów.....	113
Tabela 4.31. Średni przyrost masy ciała szczurów [g].....	114
Tabela 4.32. Względne masy narządów <sup>x</sup> .....	115



## SPIS RYCIN

Ryc. 1.1. Źródła RFT i naturalne systemy antyoksydacyjne organizmu [18] .....	15
Ryc. 1.2. Schemat obrazujący zależność pomiędzy funkcjonowaniem mitochondriów a uwalnianiem reaktywnych form tlenu [38] .....	16
Ryc. 1.3. Schemat działania cytochromu P450 w reakcji hydroksylacji [40] .....	17
Ryc. 1.4. Cykl redoks związków chinonowych [23] .....	19
Ryc. 1.5. Cykl redoks związków tiolowych [23].....	20
Ryc. 1.6. Schemat działania czynnika transkrypcyjnego Nrf2 [56] .....	24
Ryc. 1.7. Trzy linie obrony układu antyoksydacyjnego [76].....	29
Ryc. 1.8. Lokalizacja subkomórkowa dysmutaz [90].....	30
Ryc. 1.9. Struktura ludzkiej dysmutazy ponadtlenkowej CuZnSOD [98].....	31
Ryc. 1.10. Struktura katalazy z erytrocytów ludzkich [101] .....	32
Ryc. 1.11. Struktura peroksydazy glutationowej GPx1 z selenocysteiną [108] .....	34
Ryc. 1.12. Struktura reduktazy glutationowej GR [115] .....	35
Ryc. 1.14. Struktura glutationu [131] .....	39
Ryc. 1.15. Chemoprewencja wieloetapowego procesu kancerogenezy [137].....	43
Ryc. 1.16. Wzór cząsteczki resweratrolu (A) i DMU-212 (B) .....	45
Ryc. 1.17. Zmiany w rozwoju raka u myszy otrzymujących DMU-212 (50 mg/kg m.c.) – grupie A podawano DMU-212, a B – to grupa kontrolna [6].....	46
Ryc. 1.18. Efekt działania DMU-212 na błonę kosmówkowo-omoczniovą zarodka kury domowej [146].....	47
Ryc. 3.1. Reakcja dialdehydu malonowego (MDA) z kwasem tiobarbiturowym (TBA) [23] .....	61
Ryc. 3.2. Typowe przykłady kometek z danej klasy i odpowiadające im zakresy uszkodzeń DNA [174].....	66
Ryc. 4.1. Stężenie glutationu zredukowanego w wątrobie szczurów .....	79
Ryc. 4.2. Poziom mikrosomalnej nieindukowanej peroksydacji lipidów (LPO) w wątrobie szczurów .....	80
Ryc. 4.3. Poziom mikrosomalnej indukowanej nieenzymatycznie (układem Fe <sup>2+</sup> /askorbinian) peroksydacji lipidów (LPO) w wątrobie szczurów .....	81
Ryc. 4.4. Stężenie grup karbonylowych w białkach w wątrobie szczurów .....	82
Ryc. 4.5. Poziom uszkodzeń DNA w wątrobie szczurów .....	83

Ryc. 4.6. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w wątrobie szczurów .....	84
Ryc. 4.7. Aktywność katalazy (CAT) w wątrobie szczurów .....	85
Ryc. 4.8. Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) w wątrobie szczurów .....	86
Ryc. 4.9. Aktywność reduktazy glutationowej (GR) w wątrobie szczurów .....	87
Ryc. 4.10. Aktywność S-transferazy glutationowej (GST) w wątrobie szczurów .....	88
Ryc. 4.11. Aktywność oksydoreduktazy NADP(H):chinon (NQO1) w wątrobie szczurów .....	89
Ryc. 4.12. Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PD) w wątrobie szczurów .....	90
Ryc. 4.13. Zmiany poziomu mRNA Sod-2 w wątrobie szczurów .....	91
Ryc. 4.14. Zmiany poziomu mRNA Cat w wątrobie szczurów .....	92
Ryc. 4.15. Zmiany poziomu mRNA Gpx-1 w wątrobie szczurów .....	93
Ryc. 4.16. Zmiany poziomu mRNA Gr w wątrobie szczurów .....	94
Ryc. 4.17. Zmiany poziomu mRNA Gst w wątrobie szczurów .....	95
Ryc. 4.18. Zmiany poziomu mRNA Nqo1 w wątrobie szczurów .....	96
Ryc. 4.19. Zmiany poziomu mRNA G6pd w wątrobie szczurów .....	97
Ryc. 4.20. Immunohistochemiczne barwienie białka p53. ....	100
Ryc. 4.21. Immunohistochemiczne barwienie białka p53. ....	100
Ryc. 4.22. Immunohistochemiczne barwienie białka GGT. ....	101
Ryc. 4.23. Immunohistochemiczne barwienie GGT. ....	101
Ryc. 4.24. Immunohistochemiczne barwienie białka Rb1. ....	102
Ryc. 4.25. Immunohistochemiczne barwienie białka Rb1. ....	102
Ryc. 4.26. Immunohistochemiczne barwienie białka TGF $\alpha$ . ....	103
Ryc. 4.27. Immunohistochemiczne barwienie białka TGF $\alpha$ . ....	103
Ryc. 4.28. Stężenie glutationu zredukowanego (GSH) w nerkach szczurów .....	104
Ryc. 4.29. Poziom mikrosomalnej nieindukowanej peroksydacji lipidów (LPO) w nerkach szczurów .....	105
Ryc. 4.30. Poziom mikrosomalnej indukowanej nieenzymatycznie (układem Fe <sup>2+</sup> /askorbinian) peroksydacji lipidów (LPO) w nerkach szczurów .....	106
Ryc. 4.31. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w nerkach szczurów .....	107
Ryc. 4.32. Aktywność katalazy (CAT) w nerkach szczurów .....	108
Ryc. 4.33. Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) w nerkach szczurów .....	109
Ryc. 4.34. Aktywność reduktazy glutationowej (GR) w nerkach szczurów .....	110

Ryc. 4.35. Aktywność S-transferazy glutationowej (GST) w nerkach szczurów.....	111
Ryc. 4.36. Aktywność oksydoreduktazy NADP(H):chinon (NQO1) w nerkach szczurów .....	112
Ryc. 4.37. Aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (G6PD) w nerkach szczurów .....	113

## UCHWAŁA NR 36/2007

z dnia 22.06.2007 r.

Lokalne Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu

### § 1

Na podstawie art. 30 ust. 1 pkt 1 ustawy z dnia 21 stycznia 2005r. o doświadczeniach na zwierzętach (Dz. U. Nr 33, poz. 289) i § 14 ust. 3 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153, poz. 1275), po rozpatrzeniu wniosku, pt.: **Ocena chemoprewencyjnego i przeciwnowotworowego działania wybranych pochodnych resweratrolu** z dnia 31.05.2007r. złożonego przez **dr hab., prof. UM Jadwigę Jodynis-Liebert z Katedry i Zakładu Toksykologii UM w Poznaniu**, lokalna komisja etyczna:

### WYRAŻA ZGODĘ

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

### § 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku, o którym mowa w § 1, lokalna komisja etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy zaliczyć do kategorii:

#### Badania naukowe na zwierzętach

2. Najwyższy stopień inwazyjności proponowanych procedur nie przekracza wartości **4**.

3. Doświadczenia będą przeprowadzone na zwierzętach (gatunek, liczba zwierząt):  
szczury szczepu Wistar ~~80~~ <sup>100</sup> sztuk, myszy 55 sztuk

4. Doświadczenia będą przeprowadzone przez (nazwisko i imię, nazwa jednostki doświadczalnej):  
Dr n. farm Adamską Teresę z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu z zespołem.

5. Doświadczenia będą przeprowadzane na tkankach i narządach uzyskiwanych od zwierząt w ramach:

### § 3

Integralną część niniejszej uchwały stanowi uzasadnienie i kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

[ Pieczęć lokalnej komisji etycznej]

Podpisy członków lokalnej komisji etycznej biorących udział w głosowaniu:

1. Prof. dr hab. Krzysztof W. Nowak, Przewodniczący LKE
2. Dr Czesław Sadowski, Wiceprzewodniczący LKE
3. Dr Paweł Antosik
4. Prof. dr hab. Teresa Bobkiewicz-Kozłowska
5. Dr Elżbieta Czarniewska
6. Prof. dr hab. Szymon Godynicki
7. Dr Paweł Olszewski
8. Mgr inż. Przemysław Wylegała
9. Dr Aleksandra Zątek-Berdychowska

**LOKALNA KOMISJA ETYCZNA**  
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach  
60-637 Poznań, ul. Wołyńska 35  
tel. 061 8487198; fax 061 8487197

#### Otrzyma:

1. Wnioskodawca,
2. a/a

#### Pouczenie

Strona niezadowolona z niniejszej uchwały może wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 30 dni od dnia otrzymania uchwały.  
Odwołanie składa się za pośrednictwem lokalnej komisji etycznej, która wydała uchwałę, zgodnie z § 20 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153 poz. 1275).

**UZASADNIENIE UCHWAŁY NR 36/2007**

z dnia 22.06.2007 r.

**Lokalne Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu**

Celem proponowanych badań jest ocena możliwości przeciwdziałania i hamowania procesu nowotworowego przez wybrane syntetyczne pochodne resweratrolu o strukturze metoksylowej. Doświadczenia prowadzone będą na 100 szczurach i 55 myszach. Komisja jednomyślnie uznała wniosek za dopuszczalny.

**PRZEWODNICZĄCY**  
Lokalne Komisji Etycznej  
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach  
*Prof. dr hab. Krzysztof W. Nosal*

## OŚWIADCZENIE

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

### **„Ocena właściwości antyoksydacyjnych 3,4,5,4’-tetrametoksystylbenu w modelu kancerogenezy chemicznej u szczura”**

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 niniejsza 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 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 ponadto 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 .....