

## 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'-tetrametoksytilbenu (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 nieznamienne 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.

*Avelina Petzke*  
04.04.2017 r.