

Warszawa, 15 maja 2019 r.

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Modyfikacje profilu kwasów tłuszczowych oraz statusu oksydacyjnego u szczurów w warunkach procesu nowotworowego, jako efekt wpływu granatowca właściwego i przepętkli ogórkowatej.

mgr farm. Tomasz Lepionka

promotor: dr hab. Agnieszka Białek

Zakład Bromatologii

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Wśród wielu czynników ryzyka wpływających na powstanie chorób nowotworowych, stanowiących drugą w Polsce i na świecie przyczynę zgonów, istotne miejsce zajmują czynniki żywieniowe. Wiele surowców roślinnych, stosowanych przez człowieka w celach spożywczych, jednocześnie jest wykorzystywanych w medycynie ludowej. Rosnące zainteresowanie zawdzięczają one naturalnemu pochodzeniu, implikującemu przekonanie zarówno o ich skuteczności, jak i większym bezpieczeństwie stosowania względem syntetycznych produktów leczniczych. Olej z nasion granatowca właściwego (*Punica granatum*, Punicaceae) – PSO i ekstrakt z przepętkli ogórkowatej (*Momordica charantia*, Cucurbitaceae) – BME, od lat stosowane w medycynie ludowej, obecnie znajdują zastosowanie w prewencji wielu chorób, w tym nowotworowych, i jako składniki suplementów diety. Jednakże, z uwagi na obowiązujące w Polsce regulacje prawne, jak i trudności w kontroli obrotu suplementami diety (zwłaszcza obrotu on-line), nieuregulowane spożycie takich suplementów diety niesie ze sobą zwiększone ryzyko wystąpienia negatywnych skutków zdrowotnych. Ponadto, pomimo dostępności licznych publikacji dotyczących wpływu tych surowców lub wyizolowanych z nich substancji aktywnych, dotychczas nie poznano zarówno mechanizmu ich działania w różnych stanach patologicznych, jak i nie poddano ocenie bezpieczeństwa ich jednoczesnego stosowania.

Celem pracy była ocena wpływu wprowadzenia do diety szczurów PSO, łącznie i oddzielnie, wraz z BME, na ryzyko wystąpienia nowotworów sutka indukowanych podaniem chemicznego kancerogenu – 7,12-dimetylobenz[*a*]antracenu (DMBA). W toku pracy zweryfikowano również potencjalne synergistyczne lub antagonistyczne działanie oraz bezpieczeństwo jednoczesnego stosowania tych dwóch składników suplementów diety. W ramach badań wstępnych ocenie poddano skład i parametry jakościowe zastosowanych w eksperymencie surowców. Kolejny etap prac stanowiła część doświadczalna, w której 96 samic szczurów szczepu Sprague-Dawley, podzielono na 8 równolicznych grup eksperymentalnych, różniących się zastosowanymi modyfikacjami diety oraz wprowadzeniem DMBA. Pobrany *post mortem* materiał (surowica, wątroba, frakcja mikrosomalna wątroby) poddano dalszym badaniom w celu poznania mechanizmów oddziaływania zastosowanych surowców na metabolizm lipidów. Analiza z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej (GC) sprzężonej ze spektrometrią mas (MS) umożliwiła oznaczenie pełnego profilu kwasów tłuszczowych (KT); natomiast profil sprzężonych kwasów tłuszczowych oznaczono z wykorzystaniem techniki argentometrycznej wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fotodiodową (Ag⁺-HPLC-DAD). Wykonano również oznaczenie zawartości oksysteroli i dialdehydu malonowego (MDA), będących wskaźnikami intensywności procesów peroksydacyjnych. Oznaczenia te wykonano odpowiednio techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas czasu przelotu (GC-TOFMS) i ultraszybkiej wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fotodiodową (UPLC-DAD). Ponadto oznaczono zawartość związków wykazujących aktywność antyoksydacyjną – tokoferoli, z wykorzystaniem techniki UPLC-DAD. Wykorzystując testy immunoenzymatyczne (ELISA) oznaczono aktywność enzymów frakcji mikrosomalnej, kluczowych dla metabolizmu kwasów tłuszczowych i ksenobiotyków (COX-2, CYP1B1).

Otrzymane wyniki wskazują na brak chemoprewencyjnych właściwości badanych suplementów diety w zastosowanym modelu badawczym. Gruczolakoraki sutka wystąpiły u zwierząt z wszystkich grup narażonych na DMBA, a najwyższą zapadalność na nowotwory sutka odnotowano w obu grupach otrzymujących PSO.

Profil KT we wszystkich badanych materiałach biologicznych uległ modyfikacjom, zarówno wskutek zastosowanej suplementacji, jak i wskutek toczącego się procesu nowotworowego, choć oba te czynniki w różny sposób wpływały na profil KT, w zależności od tkanki. Otrzymane wyniki wskazują, że zastosowane modyfikacje diety w mniejszym stopniu wpłynęły na powstanie istotnych różnic w zawartościach poszczególnych KT, niż współistniejący proces nowotworowy. Zaobserwowano ponadto antagonistyczne działanie obu zastosowanych suplementów diety. Analiza profilu KT i sprzężonych KT nie wykazała obecności kwasu punikowego w żadnej z badanych tkanek, pomimo iż zastosowany olej z nasion granatowca stanowił jego bogate źródło. Stwierdzono natomiast obecność innych sprzężonych kwasów tłuszczowych, zarówno sprzężonych dienów jak i sprzężonych trienów, w tym kwasu żwaczowego (*cis*-9, *trans*-11 C18:2), którego najwyższą zawartością charakteryzowały się tkanki pozyskane od zwierząt zdrowych, suplementowanych PSO.

Wykazano, że zarówno suplementacja diety PSO i BME, jak i ekspozycja na DMBA, skutkują istotnym zwiększeniem poziomu cholesterolu całkowitego, względem zwierząt z grupy kontrolnej. Z kolei wprowadzenie PSO i BME do diety wpływało hamująco na powstawanie 7 α -hydroksycholesterolu i 5 β ,6 β -epoksycholesterolu w tkance wątrobowej w warunkach procesu nowotworowego, względem zdrowych zwierząt z grupy kontrolnej. Zaobserwowano u zwierząt zdrowych tendencję do obniżenia poziomów MDA we wszystkich grupach suplementowanych względem grupy kontrolnej, co wskazuje na efektywne działanie antyoksydacyjne, zarówno PSO, jak i BME. U zwierząt poddanych działaniu chemicznego kancerogenu oba suplementy wyraźnie zwiększały zawartość MDA w wątrobie. Poziomy α - i δ -tokoferolu w wątrobach pozyskanych od zwierząt z poszczególnych grup nie różniły się, natomiast istotne różnice w zawartości wykazano dla dwóch pozostałych związków: γ -tokoferolu i octanu α -tokoferylu. Nie zaobserwowano istotnych różnic w zawartościach tokoferoli w zależności od zastosowanej suplementacji, zarówno pomiędzy poszczególnymi grupami zwierząt zdrowych, jak i z rozwijającym się procesem nowotworowym, wykazano zaś wpływ toczącego się procesu nowotworowego.

W testach immunoenzymatycznych zaobserwowano przeciwstawny wpływ PSO i BME na aktywność izoformy CYP1B1 cytochromu P450, w warunkach narażenia na DMBA. Grupy otrzymujące PSO wykazywały istotnie niższą aktywność tej izoformy w odniesieniu do grupy otrzymującej BME i poddanej działaniu DMBA, charakteryzującej się najwyższą ilością CYP1B1 ze wszystkich grup badanych. Podobny wpływ BME obserwowano w przypadku aktywności COX-2, natomiast nie odnotowano istotnego wpływu suplementacji PSO na aktywność tego enzymu.

Otrzymane wyniki stanowią istotny przyczynek do krytycznej weryfikacji przekonania o bezpieczeństwie stosowania surowców roślinnych (PSO i BME) nie tylko w suplementacji diety, ale i w prewencji stanów patologicznych, zwłaszcza w kontekście ich jednoczesnego stosowania. Wskazują bowiem, że surowce, dla których w innych badaniach wykazano potencjalne przeciwdziałanie chorobom nowotworowym, w pewnych warunkach wykazują działanie odwrotne, istotnie zwiększając zapadalność na gruczolaki sutka.

Zastosowanie do badanej problematyki szerokiego podejścia analitycznego pozwoliło na uzyskanie możliwie szerokiego obrazu zmian w metabolizmie i procesach peroksydacyjnych lipidów, zachodzących w organizmie pod wpływem obu zastosowanych czynników eksperymentalnych, w stanie fizjologicznym i w stanie patologicznym. Na szczególne podkreślenie zasługuje połączone użycie wielu technik chromatograficznych, np. Ag⁺-HPLC-DAD oraz GC-MS w analizie zmian profilu KT, które jest niezwykle istotne zarówno w badaniu jakości zdrowotnej zastosowanego w eksperymencie PSO, jak i metabolizmu lipidów oraz mechanizmów działania badanych suplementów diety.

Uzyskane wyniki wyraźnie wykazały szerokie i wielokierunkowe działanie badanych suplementów diety oraz zróżnicowanie efektów w zależności od współistniejących stanów patologicznych. Uzasadniają także konieczność kontynuowania badań nad mechanizmami działania oleju z nasion granatowca i wyciągu z przepękli ogórkowatej z wykorzystaniem różnorodnych modeli badawczych a także stosowania i łączenia kilku zaawansowanych technik analitycznych w celu uzyskania możliwie pełnej weryfikacji postawionej hipotezy badawczej.