

GRZEGORZ MAJEWSKI¹, KATARZYNA LUBECKA-PIETRUSZEWSKA²,
AGNIESZKA KAUFMAN-SZYMCHYK², KRYSZYNA FABIANOWSKA-MAJEWSKA²

Przeciwnowotworowe właściwości wybranych roślinnych polifenoli z grupy flawonoidów i stilbenów

Anticancer properties of selected plant polyphenols from the group of flavonoids and stilbenes

Streszczenie

Liczne badania biologiczne, kliniczne i epidemiologiczne przeprowadzone w ostatnich latach były ukierunkowane na wyjaśnienie prozdrowotnej roli naturalnych, roślinnych polifenoli, w tym flawonoidów i stilbenów, na ludzki organizm. Konsekwencją działania niektórych polifenoli może być zmniejszenie ryzyka zachorowalności i/lub spowolnienie przebiegu chorób o podłożu wolnorodnikowym, takich jak choroby sercowo-naczyniowe, neurodegeneracyjne i nowotworowe. Działanie to jest głównie efektem aktywności przeciwutleniającej tych związków, co prowadzi do obniżenia puli reaktywnych form tlenu i reaktywnych metabolitów związków kancerogennych.

Niektóre związki roślinne z grupy polifenoli (tj. flawonoidów i stilbenów), występujące w powszechnie spożywanych warzywach, owocach i ziołach modulują, w epigenetycznym mechanizmie, ekspresję genów supresorowych, kodujących białka uczestniczące w regulacji wewnątrzkomórkowego przekazu sygnałów, w hamowaniu cyklu komórkowego i/lub w stymulacji genów proapoptotycznych. Te prewencyjne właściwości polifenoli z klasy flawonoidów i stilbenów mogą prowadzić do utrzymania prawidłowego rozwoju i funkcji komórek i/lub mogą spowalniać proces inicjacji i progresji nowotworzenia komórek.

Niniejsza praca zawiera ogólną naukową wiedzę na temat miejsca występowania flawonoidów i stilbenów, ich chemicznej struktury, biodostępności, właściwości przeciwutleniających i przeciwnowotworowych, z mechanizmem epigenetycznego modulowania aktywności genów supresorowych.

Abstract

During recent 10 years, numerous biological, clinical and epidemiological studies have been aimed at explaining the health-related role of natural plant polyphenols (i.e. flavonoids and stilbens) in human health. The consequences of some polyphenols effects are effective protection and reduction of the risk of many disorders (e.g. cardiovascular, neurodegenerative and cancer diseases) which were initiated by reactive free radicals. The polyphenols action results from their antioxidant activity leading to decrease in the level of reactive oxygen species and reactive carcinogenic metabolites.

The studies of several scientific groups and of our team indicate that natural plant flavonoids and stilbens contained in vegetables, fruits and herbs modulate, by epigenetic mechanism, expression of tumour suppressor genes, encoding proteins that participate in regulation of intracellular signal pathways, inhibition of cell cycle and/or in stimulation of proapoptotic genes. Thus, natural bioactive compounds which inhibit cancer cell growth, invasive capacities, and metastases can be efficacious in both cancer therapy, cancer prevention and stimulation of the anticancer drugs effects.

The present article includes scientific knowledge about sources of the plant flavonoids and stilbens, their chemical structure, bioavailability and antioxidant properties. There are also explained the compounds epigenetical mechanism of the anticancer actions.

Słowa kluczowe: bioaktywne roślinne polifenole, flawonoidy, stilbeny, galusan epigallokatechiny, genisteina, resweratrol, ekspresja genów supresorowych.

Keywords: plant bioactive polyphenols, flavonoids, stilbens, epigallocatechin-3-gallate, genistein, resveratrol, expression of suppressor genes.

¹ Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Łodzi,

² Zakład Chemii Biomedycznej, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

WSTĘP

Liczne badania biologiczne, kliniczne i epidemiologiczne przeprowadzone w ostatnich latach były ukierunkowane na wyjaśnienie prozdrowotnej roli naturalnych, roślinnych polifenoli, w tym flawonoidów i stilbenów, na ludzki organizm. Bioaktywne polifenole są powszechnymi składnikami pożywienia, a ich źródłem są warzywa, owoce i zioła. Związki te charakteryzuje szerokie spektrum działania, co głównie potwierdzają badania *in vitro*, badania na modelach zwierzęcych, jak i liczne badania epidemiologiczne. Prozdrowotne właściwości warzyw, owoców i ziół wynikają z faktu, że te spożywcze produkty są bogatym źródłem witamin, soli mineralnych, jak i bioaktywnych polifenoli. Zarówno niektóre witaminy, jak i niektóre polifenole wykazują przeciwutleniające i przeciwzapalne właściwości, stąd przypisywane im właściwości przeciwmiażdżycowe, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe. Konsekwencją działania bioaktywnych flawonoidów i stilbenów może być zmniejszenie ryzyka zachorowalności i/lub spowolnienie przebiegu chorób o podłożu wolnorodnikowym, takich jak choroby naczyniowo-sercowe, neurodegeneracyjne i nowotworowe.

Niniejsza praca zawiera naukową wiedzę na temat miejsc występowania flawonoidów i stilbenów, ich chemicznej struktury, biodostępności i ich właściwości przeciwutleniających. Szczególną uwagę zwrócono na przeciwnowotworowe właściwości, przedstawiając wyniki badań na temat roli wybranych polifenoli: galusanu epigallokatechiny (EGCG), genisteiny (izoflawon) i resweratrolu (stilben), w regulacji epigenetycznych modyfikacji DNA, które to modyfikacje odgrywają dominującą rolę we wczesnych etapach nowotworowej transformacji komórek w organizmie ludzkim. Ponieważ zmiany (modyfikacje) epigenetyczne DNA są reakcjami odwracalnymi to możliwość regulacji aktywności epigenomu na drodze epigenetycznych modyfikacji stała się, z początkiem XXI wieku, atrakcyjnym celem ingerencji nie tylko farmakologicznej, lecz także dietetycznej, przez dobór odpowiedniej diety.

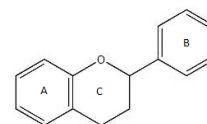
Wiedza na temat chemioprewencyjnych właściwości omawianych grup bioaktywnych roślinnych związków (zwanych nutriceutykami) może być ważna dla lekarzy, farmakologów i edukatorów zdrowia publicznego, których celem jest promowanie zdrowego stylu życia, w tym prawidłowego odżywiania.

CHARAKTERYSTYKA FLAWONOIDÓW I STILBENÓW

Flawonoidy – budowa, struktura chemiczna, występowanie i biodostępność

Flawonoidy stanowią liczną rodzinę chemicznych barwnych i posiadających zapach związków, o wspólnej strukturze chemicznej (ze szkieletem difenylopropanoidowym), występujących w roślinach, tj. jadalnych warzywach, owocach i ziołach (Rycina 1). Flawonoidy, w zależności od stopnia utlenienia pierścienia γ -piranowego (Rycina 1, pierścień C) oraz obecności grup hydroksylowych w pierścieniach fenolowych dzielą się na podklasy, których nazwę, wzór, występowanie i nazwy bioaktywnych związków występujących w wymienionych roślinach przedstawiono w Tabeli 1.

Poszczególne flawonoidy różnią się podstawnikami w obu pierścieniach aromatycznych (Rycina 1, pierścienie A i B). Podstawnikami tymi najczęściej są grupy hydroksylowe (np. galusan epigallokatechiny, EGCG, ma aż 8 grup –OH, Tab.1), grupy metoksy, acylowe lub reszty cukrowe. Wszystkie flawonoidy mają co najmniej dwie grupy hydroksylowe w pierścieniu A i jedną grupę hydroksylową w pierścieniu B. Właściwości chemiczne, fizyczne, metabolizm danego flawonoidu i jego aktywność biologiczna zależą od rodzaju podstawnika i jego położenia w obu pierścieniach [1]. Niektóre flawonoidy, jak flawonole i flawony, występują głównie w formie glikozydów zawierających jedną lub więcej reszt cukrowych, których obecność w cząsteczkach tych polifenoli zwiększa ich polarność. Natomiast flawanole (katechiny) występują w formie aglikonu, która to forma jest pozbawiona glikozydowo związanych cząsteczek cukru.



RYCINA 1. Podstawowa chemiczna struktura flawonoidów.

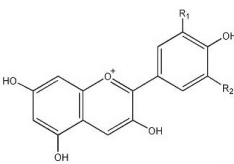
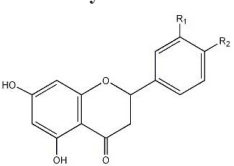
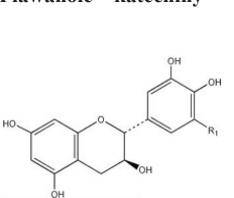
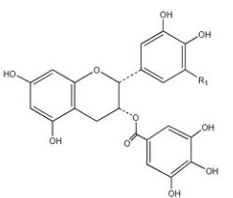
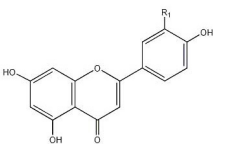
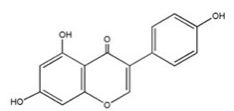
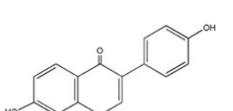
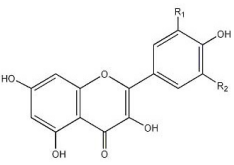
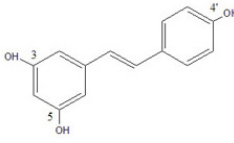
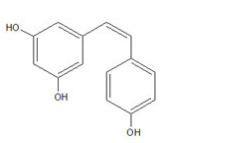
Dziennie spożycie flawonoidów jest zróżnicowane i zależy od regionów świata i nawyków żywieniowych zamieszkującej tam ludności. Ogólnie przyjmuje się, że dzienne spożycie flawonoidów waha się od 50 ng do 200 ng, i ten górny pułap charakteryzuje kraje Dalekiego Wschodu, gdzie soja jest podstawowym produktem spożywczym [2].

Głównym źródłem spożycia flawonoidów i stilbenów są warzywa, owoce, wino, herbata i czekolada (Tabela 1). Spośród spożywanych flawonoidów aż 83,5% stanowią flawanole (katechiny), około 14,5% to flawanony i flawonole (łącznie) i tylko 1,6% to antocyjanidyny [2].

Biologiczna aktywność flawonoidów zależy od ich stężenia, jak i stężenia ich metabolitów w organizmie (np. osoczu), a to zależy od biodostępności poszczególnych podklas omawianych związków. Biodostępność rozumiana jako „stopień, w jaki dany składnik odżywczy może zostać uwolniony i wchłonięty z przewodu pokarmowego oraz wykorzystany przez organizm” [3] jest zróżnicowana, ale ogólnie jest niska, m. in. z powodu ograniczonej absorpcji z przewodu pokarmowego i szybkiego wydalania. Przykładowo, w ludzkim osoczu maksymalne stężenie izoflawonów sojowych i flawonoidów owoców cytrusowych nie przekracza $10 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, natomiast stężenia antocyjanidów, flawanoli (z herbaty) i flawonów są mniejsze niż $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ [2]. Największą biodostępnością spośród powszechnie spożywanych flawonoidów charakteryzują się izoflawony (np. genisteina i daidzeina, Tabela 1), których bogatym źródłem są rośliny strączkowe (np. soja). Niska biodostępność to cecha charakteryzująca antocyjanidyny (owoce jagodowe i winogrona) oraz flawanole (katechiny), które głównie występują w zielonej i białej herbacie, jabłkach, owocach kiwi i czekoladzie [4].

Badania na modelach zwierzęcych z katechinami, izoflawonami i flawonolami wykazały, że w organizmie są one gwałtownie i intensywnie metabolizowane. Biologiczna aktywność wymienionych podklas flawonoidów zależy od podstawników oraz formy chemicznej w jakiej występują: czy w formie glikozydów związanych z cukrami (i którymi cukrami prostymi), czy w formie aglikonu bez reszt cukro-

TABELA 1. Podklasy flawonoidów i stilbeny – chemiczna struktura, występowanie i nazwa związku bioaktywnego.

Podklasy flawonoidów Wzór strukturalny	Występowanie	Związek aktywny biologicznie
Antocyjanidyny  $R_1 = OH; R_2 = H$: cyjanidyna $R_1 = OCH_3; R_2 = OCH_3$: malwidyna $R_1 = H; R_2 = H$: pelargonidyna	wiśnie, truskawki, winogrona, czarna porzeczka, aronia, borówka czernica	cyjanidyna, malwidyna, pelargonidyna
Flawanony  $R_1 = OH; R_2 = OCH_3$: hesperetyna $R_1 = H; R_2 = OH$: naryngenina	owoce cytrusowe: pomarańcze, grejpfruty	hesperetyna, naryngemina
Flawanole – katechiny  $R_1 = H$: katechina $R_1 = OH$: gallokathechina  $R_1 = H$: galusan epikatechiny $R_1 = OH$: galusan epigallokathechiny	herbata zielona i biała, czerwone wino, czekolada, jabłka, kiwi, nasiona winogron	katechina, galusan epigallokathechiny
Flawony  $R_1 = H$: apigenina $R_1 = OH$: luteolina	czerwony pieprz, czerwona papryka, seler, pietruszka, tymianek	luteolina, apigenina, diosmetyna
Izoflawony  genisteina  daidzeina	soja, rośliny strączkowe	genisteina, daidzeina
Flawonole  $R_1 = OH; R_2 = H$: kwercetyna $R_1 = OH; R_2 = OH$: mirecytyna $R_1 = H; R_2 = H$: kemferol	rośliny kapustne: kapusta włoska, brokuły, brukselka; cebula, cebula szalotka, jabłka, herbata, jagody	kwercetyna, mirecytyna, kemferol, morina, fisteina
Stilbeny  trans-resweratrol  cis-resweratrol	winogrona, borówka amerykańska, jagody, jeżyny, żurawiny, orzeszki ziemne, owoce morwy, morele, ananasy	resweratrol

wych. Większość flawonoidowych glikozydów (nawet po gotowaniu) przechodzi do jelita cienkiego nienaruszona. W jelicie cienkim wchłaniane są jedynie flawonoidy niezwiązane z resztą cukrową lub flawonoidy związane glikozydowo tylko z jedną cząsteczką glukozy [2]. Glikozydy po przejściu do jelita grubego są hydrolizowane przez enzymy flory bakteryjnej do aglikonów i cukru, a następnie wchłaniane. Po wchłonięciu aglikony mogą być metabolizowane do pochodnych glukuronowych, metylenowych lub siarczanych [2]. Produkty końcowego enzymatycznego rozpadu

aglikonów (np. kwasy fenolowe) dostają się do krwioobiegu i tu wiążą się głównie z albuminami. Niewchłonięte flawonoidy są wydalane z moczem i kałem [5]. Ogólnie biodostępność flawonoidów jest niska na skutek ograniczonej absorpcji i szybkiego usuwania z organizmu.

Stilbeny – budowa chemiczna, występowanie i biodostępność

Stilbeny to grupa polifenoli zbudowanych z dwóch pierścieni fenolowych połączonych cząsteczką etenu. Przedsta-

wicielem stilbenów jest resweratrol (3,4',5- trihydroksy-stilben), związek rozpuszczalny w tłuszczach, występujący w izomerycznych formach cis i trans. Związek ten posiada trzy grupy hydroksylowe: dwie w pierścieniu A i jedną w pierścieniu B. W roślinach występuje w formie glikozydowo związanej z jedną cząsteczką glukozy (resweratrol-3-O-beta-glukozyd) (Tabela 1). Stilbeny są produkowane przez rośliny w odpowiedzi na stres, uszkodzenie, zagrzybienie i promieniowanie UV. Bogatym źródłem stilbenów (resweratrolu) są owoce o intensywniej czerwono-fioletowej barwie, takie jak czerwone winogrona (czerwone wino), jagody leśne, borówka amerykańska, żurawiny, owoce morwy, jeżyny, a także orzeszki ziemne. W owocach i sokach resweratrol występuje w formie glikozydu, natomiast w winie, na skutek fermentacji, w formie aglikonu. Zainteresowanie resweratrolem datuje się od 1992 roku, kiedy związek ten zidentyfikowano w czerwonym winie i kiedy związkowi temu przypisano znaczące zmniejszenie ryzyka chorób naczyniowo-sercowych we Francji (French Paradox), w którym to kraju spożycie czerwonego wina jest regularne i stosunkowo wysokie w porównaniu do innych krajów.

Biodostępność resweratrolu jest stosunkowo niska ze względu na szybki metabolizm i wydalanie. Stężenie resweratrolu w osoczu człowieka może osiągnąć 2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (491 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$) [6,7].

BIOLOGICZNA AKTYWNOŚĆ FLAWONOIDÓW I STILBENÓW

Właściwości przeciwutleniające

Prozdrowotne i przeciwnowotworowe właściwości roślinnych polifenoli, w tym także flawonoidów, przypisuje się głównie ich aktywności przeciwutleniającej. Flawonoidy występujące w żywności mogą stanowić skuteczną ochronę komórek organizmu przed toksycznym działaniem ksenobiotyków i reaktywnych form tlenu, które są ważnymi chemicznymi czynnikami sprzyjającymi patogenezie transformacji nowotworowej komórek. Właściwości antyoksydacyjne wynikają głównie z obecności w ich strukturze wielu grup hydroksylowych; wraz ze wzrostem liczby grup hydroksylowych oraz ich umiejscowienia w pozycji *orto* lub *para* wzrasta działanie antyoksydacyjne. Flawonoidy związane glikozydowo z resztą cukrową są antyoksydantami o niższej aktywności.

Mechanizm działania antyoksydacyjnego polifenoli, w tym także flawonoidów i stilbenów, jest wielokierunkowy i może obejmować: usuwanie wolnych rodników i reaktywnych form tlenu, kompleksowanie jonów żelaza i miedzi (co może chronić kwas askorbinowy przed utlenieniem), hamowanie aktywności enzymów (np. oksydazy ksantynowej) uczestniczących w powstawaniu reaktywnych form tlenu, blokowaniu enzymatycznej i nieenzymatycznej peroksydacji lipidów [5]. W badaniach *in vitro* wykazano, że np. resweratrol jest silnym przeciwutleniaczem, efektywnie usuwającym wolne rodniki i hamującym utlenienie lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) [8].

Chociaż flawonoidy i stilbeny skutecznie usuwają wolne rodniki to prawdopodobnie udział flawonoidów dostarczonych w pożywieniu w ich *in vivo* antyoksydacyjnej funkcji

w osoczu i tkankach jest mało znaczący, ponieważ stężenie flawonoidów i stilbenów w osoczu i komórkach jest ponad 100-krotnie niższe od innych efektywnych przeciwutleniaczy, takich jak witaminy: C i E, glutation czy kwas moczowy. Dodatkowo to przypuszczenie potwierdza fakt, że flawonoidy są metabolizowane do związków o niższej aktywności antyoksydacyjnej [4].

Antyoksydacyjna aktywność flawonoidów wynika także ze zdolności kompleksowania (chelatowania) jonów żelaza i miedzi, które są katalizatorami w reakcjach powstawania wolnych rodników, co udokumentowano badaniami *in vitro* [5]. Natomiast czy wiązanie jonów tych metali zachodzi także *in vivo* w żywym organizmie jest trudne do udokumentowania, ponieważ antyoksydacyjna funkcja flawonoidów jest ograniczona przez białka obecne w komórkach, które wiążą w/w jony.

Według ostatnich doniesień literatury flawonoidy mogą także wykazywać właściwości pro-utleniające, indukujące ekspresję i aktywność genów kodujących detoksykacyjne enzymy II fazy. Enzymy II fazy chronią komórki przed działaniem zarówno reaktywnych metabolitów związków kancerogennych, leków przeciwnowotworowych, pestycydów, herbicydów, jak i reaktywnych form tlenu (RFT). Przykładami takich enzymów są: S-transferazy glutationowe (GST) oraz reduktaza NAD(P)H: chinon [9,10]. S-transferazy glutationowe odpowiadają za detoksykację reaktywnych produktów oksydacyjnego stresu, takich jak alfa-, beta- nienasycone karbonyle, chinony i wodoronadtlenki [9]. Inną funkcją GST jest obrona przed reaktywnymi formami tlenu, które są odpowiedzialne za patogenezę wielu chorób na skutek uszkodzenia komórkowych makrocząstek takich jak kwasy nukleinowe, białka i lipidy. GST przeciwdziała m.in. peroksydacji lipidów poprzez sprzęganie aldehydowych produktów peroksydacji. Wiele naturalnych związków zawartych w diecie człowieka, których działanie można wiązać z indukcją enzymów II fazy, w badaniach na zwierzętach wykazują właściwości przeciwnowotworowe. Na przykład ekstrakt zielonej herbaty zawierający EGCG i morin (należący do flawonoli) stymulują aktywność GST u szczurów [9,11]. Udokumentowano także, że izoflawony, genisteina i daidzeina, poprzez wzrost aktywności enzymów II fazy hamują wzrost nowotworów indukowanych przez nitrozoaminy [11].

Zarówno izoflawony, jak i resweratrol, ze względu na swoje podobieństwo do struktury syntetycznego agonisty (t.j. dietylostilbestrolu) endogennego estrogeny, zaliczane są do fitoestrogenów. Genisteina i resweratrol w nieobecności endogennego estrogeny mogą działać jako jego agonista i po związaniu się z receptorem estrogeny oddziałują z sekwencją DNA, tzw. elementem odpowiedzi na estrogen (ERE, estrogen response element) już jako czynnik transkrypcyjny, regulujący ekspresję genów posiadających taki element. Natomiast genisteina i resweratrol w obecności estrogeny są wobec tego endogennego hormonu antagonistą.

WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWE

Liczne prace badawcze dostarczają dowodów, że niektóre naturalne roślinne związki z grupy polifenoli mogą w sposób

bezpośredni lub pośredni chronić komórki przed inicjacją transformacji nowotworowej wywołanej działaniem ksenobiotyków i chemicznych czynników kancerogennych lub mogą przyczyniać się do zmniejszenia ryzyka rozwoju chorób nowotworowych. Proces kancerogenezy charakteryzuje się zmianą aktywności transkrypcyjnej wielu genów (m.in. genów supresorowych) i zmianą funkcji biologicznej białek kodowanych przez te geny, na skutek genetycznych i epigenetycznych modyfikacji. Wiele badań wskazuje, że epigenetyczne modyfikacje mogą być regulowane przez związki polifenolowe znajdujące się w warzywach, owocach i ziołach [12]. Składniki herbaty i soi, takie jak epigallocatechina i genisteina, prowadziły do obniżenia metylacji i reaktywacji wyciszonych uprzednio genów supresorowych, takich jak: p16, RARbeta, MGMT, co skutkowało zahamowaniem wzrostu raka [13]. Antocyjanidyny występujące w jeżynach powodowały zmniejszenie aktywności DNMT1 (metylotransferazy DNA) i reaktywowały geny supresorowe, co było związane z demetylacją promotorów w/w genów [14]. Inne światowe doniesienia wskazują, że dieta wegetariańska powodowała hypometylację promotora i zwiększoną ekspresję genu kodującego antyoksydacyjny, mitochondrialny enzym dysmutazę ponadtlenkową [12]. Obniżoną zachorowalność na raka jelita grubego mieszkańców południowych Włoch w porównaniu z mieszkańcami krajów świata zachodniego przypisuje się spożywaniu jabłek z gatunku Annurca, bogatych w antocyjanidyny.

Polifenole-fitoestrogeny, takie jak resweratrol i genisteina, wykazują interakcję z receptorami estrogenu i regulują ekspresję genów estrogenozależnych, np. genu p21 [15,16]. Badania na modelach zwierzęcych z chemicznie wywołanymi zmianami nowotworowymi, dokumentowały, że resweratrol posiada właściwości przeciwmiażdżycowe i przeciwnowotworowe. Natomiast w badaniach z komórkami ludzkich linii nowotworowych wykazano, że resweratrol hamuje proliferację komórek nowotworowych, poprzez blokowanie cyklu komórkowego, lecz prawdopodobnie nie indukuje apoptozy tych komórek [17].

Efektom działania genisteiny, trihydroksyzioflawonu, jest zahamowanie procesu kancerogenezy komórek tkanki piersiowej i procesu przerzutowości w wielu typach raków, co udokumentowano w badaniach na modelach zwierzęcych [12]. To działanie genisteiny jest ukierunkowane na zahamowanie proliferacji w wyniku zatrzymania cyklu komórkowego komórek rakowych, zmniejszenia angiogenezy i indukowania apoptozy komórek. Temu efektowi działania genisteiny towarzyszyło zahamowanie wewnątrzkomórkowych, onkogennych szlaków przekazu sygnałów, z jednoczesnym stymulowaniem apoptozy i różnicowania komórek [18]. Także badania naszego zespołu z nieinwazyjną linią ludzkich komórek raka piersi, MCF-7, wykazały, że resweratrol prowadzi do redukcji metylacji i zwiększenia ekspresji dwóch genów supresorowych RARbeta i PTEN [19,20]. Wymienione geny kodują odpowiednio białka: receptor kwasu retinowego, który wraz z ligandem uczestniczy w transkrypcji wielu genów, w tym genu p21, i fosfatazę, która jest negatywnym regulatorem onkogennych szlaków przekazu sygnału, PI3K-AKT i Ras-MAPK. Ponadto, działanie resweratrolu wywołuje spadek ekspresji DNMT1 i silny wzrost poziomu mRNA genu p21 [19]. Gen

p21 koduje białko p21 (inhibitor CDK2-kinazy zależnej od cyklin), współzawodniczące z metylotransferazą DNMT1 o wiązanie do jądrowego antygenu proliferujących komórek (PCNA – proliferating cell nuclear antigen) i przez to hamujące proces metylacji DNA [21]. Stymulację ekspresji genu p21 jako efekt działania fitoestrogenów dokumentowało wielu badaczy wskazując, że ta stymulacja dokonywała się poprzez element ERE w promotorze tego genu [15] albo przez tłumienie aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1 (onkogenny szlak Ras-MAPK) na skutek reekspresji genu PTEN na poziomie mRNA i białka. Stymulacja genu p21 w wyniku działania resweratrolu była obserwowana w wielu typach nowotworów, m.in. raku prostaty, pęcherza moczowego, raku piersi, jak i komórkach linii raka piersi [12,19,20,22]. Na podstawie innych danych literaturowych wiadomo, że resweratrol przeciwdziała hipermetylacji i „wyciszeniu” genu BRCA1 w komórkach MCF-7 [12,22]. Podobny efekt epigenetycznej regulacji przywracającej transkrypcyjną aktywność genów supresorowych (tj. p16, RARbeta i MGMT) w wyniku demetylacji promotorów tych genów pod wpływem resweratrolu obserwowano w badaniach na komórkach linii raka przełyku i raka prostaty [13].

Badania naszego zespołu z komórkami MCF-7 potwierdziły silne działanie cytostatyczne także genisteiny na komórki tej linii. Obserwowano silne obniżenie metylacji promotora genów PTEN i RARbeta oraz towarzyszący tej redukcji metylacji wzrost poziomu mRNA tych genów, z jednoczesnym spadkiem ekspresji metylotransferazy DNA (dane niepublikowane). Wymienione fitoestrogeny, resweratrol i genisteina, w swoim działaniu prowadziły do stymulacji transkrypcyjnej aktywności genu PTEN w komórkach raka piersi i prostaty [12].

Działanie przeciwnowotworowe poprzez epigenetyczną regulację aktywności genów wykazują także katechiny (flawanole, np. EGCG, galusan epigallocatechiny), występujące w zielonej i białej herbacie. Mechanizm działania flawanoli związany jest przede wszystkim z silnym hamowaniem metylotransferaz DNA. I tak, w komórkach raka przełyku traktowanych EGCG obserwowano obniżenie poziomu metylacji promotorów następujących genów supresorowych: p16, RARbeta, MGMT, hMLH1 i reaktywację transkrypcji wymienionych genów. Ten sam efekt EGCG na geny p16 i RARbeta odnotowano w komórkach linii nowotworowych jelita grubego, prostaty i piersi. Autorzy podkreślają, że w przypadku EGCG redukcja metylacji promotorów genów supresorowych jest wynikiem złożonego działania pośredniego i bezpośredniego. Pośredni efekt działania EGCG to: (i) uszczuplenie puli S-adenozylometioniny (SAM) (dawca grup metylowych w reakcjach metylacji DNA) na skutek wykorzystania SAM w reakcji metylowania grup katechinowych we flawanolach, (ii) hamowanie reakcji metylacji DNA w mechanizmie inhibicji zwrotnej przez S-adenozylhomocysteinę (SAH). Zaś bezpośredni efekt działania to deaktywacja metylotransferazy DNA na skutek wiązania się galusanu epigallocatechiny do centrum katalitycznego enzymu [23]. Katechiny pozbawione reszty galusanowej są znacznie słabszymi inhibitorami aktywności DNMT1.

Dodatkowo należy wspomnieć, że epigenetyczny mechanizm działania polifenoli nie tylko sprowadza się do regulacji aktywności genów poprzez hamowanie procesu metylacji,

lecz także może być związany z modyfikacjami histonów, prowadzącymi do stymulacji reakcji acetylacji histonów genów supresorowych lub genów pro-apoptotycznych [12,24]. Takie działanie udokumentowano dla luteoliny, który to flawon występuje w wielu spożywczych ziołach i warzywach takich jak: tymianek, bazylia, mięta pieprzowa, pietruszka, seler i karczochy [24].

POSUMOWANIE

W ciągu ostatniej dekady bioaktywne roślinne polifenole, szczególnie flawonoidy i stilbeny były przedmiotem intensywnych badań *in vitro* i badań na modelach zwierzęcych. Zakres badań obejmował ocenę wpływu tych naturalnych, roślinnych związków: na proliferację komórek nowotworowych, ich cykl komórkowy i ich apoptozę oraz na aktywność detoksykacyjnych enzymów I i II fazy. Badania miały także na celu poszukiwanie możliwości ingerencji w epigenetyczny mechanizm aktywności genów uczestniczących w blokowaniu procesu kancerogenezy. Wraz z odkrywaniem prozdrowotnych nowych właściwości roślinnych polifenoli w społeczeństwie wzrasta nie tylko zainteresowanie zdrowym odżywianiem, bogatym w warzywa i owoce, ale także wzrasta świadomość o niezbędności bioaktywnych substancji roślinnych w celu zabezpieczenia naszego zdrowia przed chorobami degeneracyjnymi. Regularne, codzienne spożywanie warzyw i owoców, zawierających polifenole, w tym flawonoidy i stilbeny, może być skutecznym działaniem chemioprewencyjnym, tj. zmniejszającym ryzyko chorób nowotworowych,

Właściwym podsumowaniem niniejszej pracy będzie zalecenie amerykańskiego lekarza-dietetyka dr A. Weil: „do swojej codziennej diety należy włączyć produkty z całej gamy kolorystycznej, co zapewni pełny zestaw ochronnych fitosubstancji i ochroni makrocząsteczki występujące w organizmie, w tym także DNA, przed stresem oksydacyjnym, który leży u podstaw patogenezy wielu chorób cywilizacyjnych, w tym także nowotworowych” [25].

*Praca finansowana ze środków na naukę w roku 2012 jako projekt statutowy, Nr: 503/6-099-01/503-01 i badawczy z NCN, Nr: 2011/01/N/NZ2/01697.

PIŚMIENICTWO

1. Rice-Evans CA, Miller NJ, Papania G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20:933-56.
2. Manach C, Scalbert A, Morand C i wsp. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:727-47.
3. Gawęcki J, Hryniewicz L. Żywność człowieka. Podstawy nauki o żywieniu. Warszawa: PWN; 2006.
4. Lotito SB, Frei B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans; cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med*. 2006;41:1727-46.
5. Majewska M, Czeczot H. Flawonoidy w profilaktyce i terapii. *Terapia i Leki*. 2009;65:369-77.
6. Walle T, Hsieh F, DeLegge MK i wsp. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*. 2004;32:1377-82.
7. Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol Nutr Food Res*. 2005;49:472-81.

8. Stojanovic S, Sprinz H, Brede O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Arch Biochem Biophys*. 2001;391:79-89.
9. Krajka-Kuźniak V. Indukcja enzymów II fazy jako strategia chemioprewencji nowotworów i innych schorzeń degeneracyjnych. *Postępy Hig Med Dosw*. 2007;61:627-38.
10. Yang SH, Kim JS, Oh TJ. Genome-scale analysis of resveratrol-induced gene expression profile in human ovarian cancer cells using a cDNA microarray. *Int J Oncol*. 2003;22:741-50.
11. Moon YJ, Wang X, Morris ME. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro*. 2006;20:187-210.
12. Stefńska B, Karlic H, Varga F i wsp. Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components – the implications in cancer prevention. *Br J Pharmacol*. 2012;167:279-97.
13. Fang MZ, Chen D, Sun Y i wsp. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clin Cancer Res*. 2005;11:7033-41.
14. Wang LS, Arnold M, Huang YW i wsp. Modulation of genetic and epigenetic biomarkers of colorectal cancer in humans by black raspberries: a phase I pilot study. *Clin Cancer Res*. 2011;17:598-610.
15. Mandal S, Davie JR. Estrogen regulated expression of the p21Waf1/Cip1 gene in estrogen receptor positive human breast cancer cells. *J Cell Physiol*. 2010;224:28-32.
16. Pozo-Guisado E, Lorenzo-Benayas MJ, Fernandez-Salguero PM. Resveratrol modules the phosphoinositide 3-kinase pathway through an estrogen receptor alpha-dependent mechanism: relevance in cell proliferation. *Int J Cancer*. 2004;109:167-73.
17. Ullah MF, Khan MW. Food as medicine: potential therapeutic tendencies of plant derived polyphenolic compounds. *Asian Pacific J Cancer Prevention*. 2008;9:187-96.
18. Su Y, Simmen FA, Xiao R, Simmen RC. Expression profiling of rat mammary epithelial cells reveals candidate signaling pathways in dietary protection from mammary tumors. *Physiol Genomics*. 2007;30:8-16.
19. Stefńska B, Salami P, Bednarek A, Fabianowska-Majewska K. Comparative effects of retinoic acids, vitamin D and resveratrol alone and in combination with adenosine analogues on methylation and expression of phosphatase and tensin homologue tumour suppressor gene in breast cancer cells. *Eur J Nutr*. 2012;107:781-90.
20. Stefńska B, Rudnicka K, Bednarek A, Fabianowska-Majewska K. Hypomethylation and induction of retinoic acid receptor beta 2 by concurrent action of adenosine analogues and natural compounds in breast cancer cells. *Eur J Pharmacol*. 2010;638:47-53.
21. Chuang LS, Ian HI, Koh TW i wsp. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science*. 1997;277:996-2000.
22. Privat M, Aubel C, Arnould S i wsp. AKT and p21WAF1/CIP1 as potential genistein targets in BRCA1-mutant human breast cancer cell lines. *Anticancer Res*. 2010;30:2049-54.
23. Fang M, Chen D, Yang CS. Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J Nutr*. 2007;137:223S-8S.
24. Attoub S, Hassan AH, Vanhoecke B i wsp. Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. *Eur J Pharmacol*. 2011;65:18-25.
25. Weil A. Jak się zdrowo zestarzeć. Poradnik na całe życie. Warszawa: PIW; 2008.

Informacje o Autorach

Mgr GRZEGORZ MAJEWSKI – doktorant, Wydział Nauk o Zdrowiu; mgr KATARZYNA LUBECKA-PIETRUSZEWSKA – asystent; dr n. chem. AGNIESZKA KAUFMAN-SZYMZYK – asystent, Zakład Chemii Biomedycznej, Wydział Nauk o Zdrowiu; prof. dr hab. n. med. KRYSZYNA FABIANOWSKA-MAJEWSKA – kierownik, Zakład Chemii Biomedycznej, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Łodzi.

Adres do korespondencji

prof. dr hab. Krystyna Fabianowska-Majewska
Zakład Chemii Biomedycznej,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź
tel: 42 272 56 98
E-mail: krystyna.fabianowska-majewska@umed.lodz.pl