Angelika Kuczmarska

Wpływ syntetycznych pochodnych resweratrolu, 3,3',4,4'-tetrahydroksy-*trans*-stilbenu i 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy-*trans*-stilbenu, na wykładniki inwazyjności komórek raka jajnika w modelu *in vitro*

Rozprawa doktorska

z Katedry i Zakładu Patofizjologii

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Brębborowicz

Promotor: dr hab. n. med. Krzysztof Książek, prof. UM

Poznań, 2013 r.

Pracę tę dedykuję moim Najbliższym

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania

Panu dr hab. n. med. Krzysztofowi Książkowi, prof. UM

za wprowadzenie mnie w ciekawą tematykę badań, opiekę merytoryczną, a także czas który mi poświęcił w trakcie realizacji niniejszej rozprawy.

Dziękuję za ogromną życzliwość, wsparcie oraz motywowanie mnie przez cały czas trwania naszej współpracy.

Dziękuję ponadto

Panu prof. dr hab. med. Andrzejowi Bręborowiczowi
za umożliwienie mi przygotowania rozprawy doktorskiej
w Katedrze i Zakładzie Patofizjologii.

***Panu dr Marcinowi Wierzchowskiemu** z Katedry i Zakładu Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, za wykonanie syntezy pochodnych resweratrolu.*

***Panu dr hab. Markowi Muriasowi** z Katedry i Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu za udostępnienie próbek syntetycznych stilbenów i resweratrolu.*

***Pani dr hab. Katarzynie Piwockiej, prof. PAN** z Pracowni Cytometrii Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego w Warszawie za umożliwienie przeprowadzenia badań cytometrycznych.*

*Na koniec dziękuję **wszystkim współpracownikom** z Katedry i Zakładu Patofizjologii za miłą atmosferę oraz wsparcie.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW 10
STRESZCZENIE 14
SUMMARY 17
1. WSTĘP 20
1.1. Choroba nowotworowa jako wyzwanie naszych czasów 20
1.2. Etiologia raka jajnika 21
1.2.1. Proces starzenia 21
1.2.2. Czynniki związane z rozrodczością 22
1.2.3. Schorzenia ginekologiczne. 23
1.2.4. Dziedziczne postaci raka jajnika 23
1.2.5. Czynniki związane z odżywianiem 24
1.2.6. Inne czynniki 25
1.3. Obraz kliniczny raka jajnika 25
1.4. Charakterystyka histopatologiczna nowotworów jajnika 27
1.5. Molekularne tło rozwoju raka jajnika 27
1.6. Mechanizmy powstawania przerzutów raka jajnika 30
1.7. Leczenie raka jajnika 33
1.8. Resweratrol jako przedstawiciel stilbenów 35
1.8.1. Właściwości biologiczne resweratrolu 36
1.8.1.1. Działanie kardioprotekcyjne 37
1.8.1.2. Działanie przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe 38
1.8.1.3. Działanie neuroprotekcyjne 38
1.8.1.4. Działanie przeciwnowotworowe 39
1.8.1.5. Działanie przeciwstarzeniowe 41
1.8.2. Aktywność biologiczna analogów resweratrolu 42
1.8.2.1. Pochodne metoksylowe 42
1.8.2.2. Pochodne hydroksylowe 43
2. CEL PRACY 45
3. METODYKA 46
3.1. Materiały 46

3.2. Związki badane 46
3.2.1. Synteza związków badanych 47
3.2.2. Metodologia syntezy 48
3.2.2.1. Synteza (3,4-dimetoksybenzylo)fosfonianu dietylu (2a) 48
3.2.2.2. Synteza (3,4,5-trimetoksybenzylo)fosfonianu dietylu (2b) 49
3.2.2.3. Synteza 3,3',4,4'- tetrametoksystilbenu (4a) 49
3.2.2.4. Synteza 3,3'4,4',5,5'- heksametoksystilbenu (4b) 49
3.2.2.5. Synteza 3,3'4,4'- THS (5a) 50
3.2.2.6. Synteza 3,3',4,4',5,5'-HHS (5b) 50
3.2.3. Ocena stabilności związków badanych 51
3.2.4. Stężenia robocze substancji badanych oraz czasy ekspozycji 51
3.3. Hodowle komórkowe 51
3.3.1. Komórki raka jajnika 51
3.3.2. Komórki mezotelium otrzewnowego 53
3.3.2.1. Wywoływanie replikacyjnego starzenia się LKMO in vitro 54
3.3.3. Komórki śródbłonka naczyniowego 55
3.4. Ocena żywotności komórek nowotworowych 55
3.5. Ocena apoptozy komórek metodą cytometrii przepływowej 56
3.6. Badania proliferacji komórek 56
3.6.1. Ocena proliferacji komórek nowotworowych metodą fluorescencyjną 56
3.6.2. Ocena dystrybucji w cyklu komórkowym metodą cytometrii przepływowej 57
3.6.3. Ocena proliferacji komórek śródbłonka naczyniowego metodą MTT .. 57
3.7. Ocena aktywności β – galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA-β-Gal) 58
3.8. Ocena produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) 59
3.9. Ocena adhezji komórek nowotworowych 59
3.10. Ocena migracji komórek 60
3.10.1. Migracja komórek nowotworowych 60
3.10.2. Migracja komórek śródbłonka naczyniowego 61
3.11. Zbiórka medium kondycjonowanego z komórek nowotworowych i LKMO 61

3.12. Ocena produkcji mediatorów inwazyjności komórek nowotworowych 61
3.13. Identyfikacja mediatorów angiogenezy 63
3.14. Prezentacja wyników doświadczeń 63
3.15. Analiza statystyczna 63
4. WYNIKI 65
4.1. Stabilność chemiczna związków badanych 65
4.2. Wpływ stilbenów na żywotność komórek raka jajnika 66
4.2.1. Komórki A2780 66
4.2.2. Komórki OVCAR-3 68
4.2.3. Komórki SKOV-3 70
4.3. Określenie wartości IC_{50} związków badanych 72
4.3.1. Komórki A2780 72
4.3.2. Komórki OVCAR-3 72
4.3.3. Komórki SKOV-3 73
4.4. Wpływ stilbenów na apoptozę komórek raka jajnika 74
4.4.1. Komórki A2780 74
4.4.2. Komórki OVCAR-3 75
4.4.3. Komórki SKOV-3 79
4.5. Wpływ stilbenów na proliferację komórek raka jajnika 82
4.5.1. Komórki A2780 82
4.5.2. Komórki OVCAR-3 84
4.5.3. Komórki SKOV-3 86
4.6. Wpływ stilbenów na dystrybucję komórek raka jajnika w cyklu podziałowym 88
4.6.1. Komórki A2780 88
4.6.2. Komórki OVCAR-3 91
4.6.3. Komórki SKOV-3 94
4.7. Wpływ stilbenów na aktywność β-galaktozydazy związanej ze starzeniem w hodowlach komórek raka jajnika 97
4.7.1. Komórki A2780 97
4.7.2. Komórki OVCAR-3 99
4.7.3. Komórki SKOV-3 101

4.8. Wpływ resweratrolu i jego pochodnych na produkcję reaktywnych form tlenu przez komórki raka jajnika 103
4.8.1. Komórki A2780 103
4.8.2. Komórki OVCAR-3 105
4.8.3. Komórki SKOV-3 107
4.9. Wpływ resweratrolu i jego pochodnych na adhezję komórek raka jajnika 109
4.9.1. Komórki A2780 109
4.9.2. Komórki OVCAR-3 111
4.9.3. Komórki SKOV-3 113
4.10. Wpływ resweratrolu i jego pochodnych na ekspresję integryn α5β1 115
4.10.1. Komórki A2780 115
4.10.2. Komórki OVCAR-3 117
4.10.3. Komórki SKOV-3 119
4.11. Wpływ resweratrolu i jego pochodnych na migrację komórek raka jajnika 121
4.11.1. Komórki A2780 121
4.11.2. Komórki OVCAR-3 123
4.11.3. Komórki SKOV-3 125
4.12. Wpływ resweratrolu i jego pochodnych na wydzielanie kwasu hialuronowego 127
4.12.1. Komórki A2780 127
4.12.2. Komórki OVCAR-3 129
4.12.3. Komórki SKOV-3 131
4.13. Wpływ resweratrolu i jego pochodnych na angiogenezę zależną od LKMO 133
4.13.1. Proliferacja komórek śródbłonka naczyniowego 133
4.13.2. Migracja komórek śródbłonka naczyniowego 135
4.13.3. Identyfikacja mediatorów działania resweratrolu 136
4.13.4. Identyfikacja mediatorów działania analogów resweratrolu 136
4.14. Wpływ resweratrolu i jego pochodnych na produkcję reaktywnych form tlenu przez LKMO 139
5. DYSKUSJA 141

5.1. Koncepcja i realizacja badań 141
5.2. Cytotoksyczność 144
5.3. Apoptoza 146
5.4. Proliferacja i starzenie 147
5.5. Adhezja 150
5.6. Migracja 152
5.7. Angiogeneza 154
5.8. Podsumowanie 156
6. WNIOSKI 159
7. PIŚMIENNICTWO 161

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

3,3',4,4'-THS	3,3',4,4'-tetrahydroksy-*trans*-stilben
3,3',4,4',5,5'-HHS	3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy-*trans*-stilben
AP-1	(ang. activator protein 1) - czynnik transkrypcyjny AP-1
BAX	(ang. BCL2-associated X protein) - białko X związane z BCL2
BMI	(ang. body mass index) - wskaźnik masy ciała
BSA	(ang. bovine serum albumin) - albumina surowicy bydlęcej
CDK	(ang. cyclin-dependent kinase) - kinaza zależna od cyklin
CFDA SE	(ang. carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester) - ester sukcynimidylowy dwuoctanu [5-(i -6)-karboksyfluorescyjny]
CHAPS	(ang. 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1- propanesulfonate) - 3-[(3-cholamidopropylo)- dimetyloamnio]-propano-sulfonian
COX	(ang. cyclooxygenase) - cyklooksygenaza
CPD	(ang. cumulative population doublings) - skumulowana liczba podwojeń populacji
CYP	rodzina cytochromu P450
DMSO	(ang. dimethyl sulfoxide) - dimetylosulfotlenek
DAPI	(ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole) - 4',6'-diamidyno-2-fenyloindol
ECM	(ang. extracellular matrix) - macierz pozakomórkowa
EDTA	(ang. ethylenediaminetetraacetic acid**)** - kwas etylenodiaminotetraoctowy
EGF	(ang. epidermal growth factor) - epidermalny czynnik wzrostu
ELISA	(ang. enzyme-linked immunosorbent assay) - płytkowy test immunoenzymatyczny fazy stałej
FACS	(ang. fluorescence activated cell sorting) - sortowanie komórek aktywowane fluorescencyjnie
FBS	(ang. fetal bovine serum) - płodowa surowica bydlęca
FIGO	(ang. International Federation of Gynecology and Obstetrics) - Międzynarodowe Stowarzyszenie Ginekologii i Położnictwa
FSH	(ang. follicle-stimulating hormone) - hormon folikulotropowy

GM-CSF	(ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) - czynnik stymulujący kolonie granulocytów i makrofagów
GRO-1/CXCL1	(ang. growth related oncogene 1/Chemokine (C-X-C motif) ligand 1) - onkogen zależny od wzrostu 1/ ligand 1 chemokiny o motywie C-X-C
GSK3β	(ang. glycogen synthase kinase 3 β) - kinaza 3β syntazy glikogenu
HA	(ang. hyaluronic acid) - kwas hialuronowy
γ-H2A.X	ufosforylowany wariant histonu H2A.X
H_2DCFDA	dwuoctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny
HBOC	(ang. hereditary breast-ovarian cancer syndrome) - zespół rodzinnego raka piersi i raka jajnika
HBSS	(ang. Hanks` balanced salt solution) - roztwór soli buforowany solami Hanksa
HEPES	(ang. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) - kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynyloetanosulfonowy
HGF	(ang. hepatocyte growth factor) - czynnik wzrostu hepatocytów
HRP	(ang. horseradish peroxidase) - peroksydaza chrzanowa
HSV	(ang. herpes simplex virus) - wirus opryszczki pospolitej
HMEC-1	(ang. human microvascular endothelial cells) - komórki śródbłonka mikronaczyń skóry
HNPCC	(ang. hereditary nonpolyposis colorectal cancer) - dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością
HOC	(ang. hereditary ovarian syndrome) - zespół rodzinnego raka jajnika
HPLC	(ang. high performance liquid chromatography) - wysokosprawna chromatografia cieczowa
HTZ	hormonalna terapia zastępcza
HUVECs	(ang. human umbilical vein endothelial cells) - komórki śródbłonka naczyniowego krwi pępowinowej
ICAM-1	(ang. intercellular adhesion molecule 1) - cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1
IL	(ang. interleukin) - interleukina
iNOS	(ang. inducible nitric oxide synthase) - indukowalna forma syntazy tlenku azotu

LDL	(ang. low density lipoproteins) - lipoproteiny o niskiej gęstości
LH	(ang. luteinizing hormone) - hormon luteinizujący
LKMO	ludzkie komórki mezotelium otrzewnowego
LPA	(ang. lysophosphatidic acid) - kwas lizofosfatydowy
MCP-1/CCL2	(ang. monocyte chemoattractant protein-1/ Chemokine (C-C motif) ligand 2) - białko chemotaktyczne monocytów 1/ligand 2 chemokiny o motywie C-C
MMP	(ang. matrix metalloproteinase) - metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej
MUG	4-metyloumbelliferylo-β-D-galaktopiranozyd
mTOR	(ang. mammalian target of rapamycin) – kinaza mTOR, tzw. ssaczy cel rapamycyny
MTT	test redukcji soli tetrazolowej (bromek 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-ilo]-2,5-difenylotetrazoliowy)
NF-κB	(ang. nuclear factor kappa B) – jądrowy czynnik transkrypcyjny κB
NO	(ang. nitrix oxide) - tlenek azotu
NRP-1	(ang. neuropilin 1) - neurofilina 1
PAI	(ang. plasminogen activator inhibitor) - inhibitor aktywatora plazminogenu
PARP	(ang. PARP - poly(ADP-ribose)polymerase) - polimeraza poli (ADP-rybozy)
PBS	(ang. phosphate buffered saline) - sól fizjologiczna buforowana fosforanami
PDGF	(ang. platelet-derived growth factor) - płytkopochodny czynnik wzrostu
PGE, PGI	(ang. prostaglandin E, I) - prostaglandyny E, I
PI	(ang. iodium propide) - jodek propidyny
PI3K	(ang. phosphoinositide 3-kinase) - 3-kinaza fosfatydyloinozytolu
PKC	(ang. protein kinase C) - kinaza białkowa C
PKD	(ang. protein kinase D) - kinaza białkowa D
PMSF	(ang. phenylmethylsulfonyl fluoride) - fluorek fenylometylosulfonowy
QR-2	(ang. quinone reductase 2) - reduktaza chinonowa 2
RFT	reaktywne formy tlenu

SA-β-Gal	(ang. senescence-associated β-galactosidase) - β-galaktozydaza związana ze starzeniem
Sir1	(ang. silent information regulator 1) – sirtuina 1
SFM	(ang. serum free medium) - medium bez surowicy
SDS	(ang. sodium dodecyl sulfate) - sól sodowa siarczanu dodecylu
SOD	(ang. superoxide dismutase) - dysmutaza ponadtlenkowa
TGF-β1	(ang. transforming growth factor β1) - transformujący czynnik wzrostu β1
TLC	(ang. thin layer chromatography) - chromatografia cienkowarstwowa
TMB	stabilizowany roztwór 3,3',5,5'- tetrametylobenzydyny
TNFα	(ang. tumor necrosis factor α) - czynnik martwicy nowotworów α
TP53	(ang. tumor protein 53) - białko supresorowe nowotworu p53
VEGF	(ang. vascular endothelial growth factor) - czynnik wzrostu śródbłonka naczyń
VCAM-1	(ang. vascular cell adhesion molekule 1) - naczyniowa cząstka adhezyjna 1

STRESZCZENIE

Resweratrol (3,5,4'-trihydroksy-*trans*-stilben) jest naturalną fitoaleksyną, znaną ze swych właściwości przeciwnowotworowych. Niska biodostępność oraz szybki rozkład do mniej aktywnych metabolitów ograniczają jednak wykorzystanie tego związku w medycynie praktycznej. W związku z tym trwają prace nad różnego typu syntetycznymi pochodnymi resweratrolu, których właściwości biologiczne okazały się być niejednokrotnie silniejsze w porównaniu z ich naturalnym prekursorem.

Celem niniejszych badań było określenie właściwości przeciwnowotworowych dwóch nowych, syntetycznych, dodatkowo hydroksylowanych analogów resweratrolu, tj. 3,3',4,4'-tetrahydroksy-*trans*-stilbenu (3,3',4,4'-THS) oraz 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy-*trans*-stilbenu (3,3',4,4',5,5'-HHS). W ujęciu szczegółowym, podjęto się oceny wpływu powyższych związków na szereg wykładników progresji komórek raka jajnika (linii A2780, OVCAR-3 i SKOV-3) *in vitro*, w tym ich: żywotność, śmierć apoptotyczną, proliferację, starzenie, adhezję i migrację. Zbadano także wpływ tych związków na proliferację i migrację komórek śródbłonka naczyniowego HUVEC, zależne od fenotypu wydzielniczego młodych i starych komórek mezotelium otrzewnowego (LKMO). Ważnym elementem badań było porównanie efektów wywieranych przez syntetyczne stilbeny z działaniem ich naturalnego prekursora, resweratrolu. W badaniach wykorzystano trzy stężenia ocenianych związków, tj. 10, 50 i 100 μM oraz trzy czasy ekspozycji: 24, 48 i 72 godziny.

Badania wykazały, że oceniane związki cechują się wysokim stopniem cytotoksyczności w stosunku do komórek raka jajnika linii A2780 i SKOV-3 oraz mniejszym w stosunku do komórek OVCAR-3. Ocena krzywych przeżywalności komórek nowotworowych oraz wyliczonych wartości IC_{50} dowiodła najwyższej efektywności działania stilbenu 3,3',4,4'-THS, który indukował śmierć komórek w najniższym zakresie stężeń. Drugim co do efektywności działania związkiem był resweratrol, natomiast najsłabsze efekty odnotowano dla 3,3',4,4',5,5'-HHS. Ocena cytotoksyczności związków wskazała na istnienie zasadniczych różnic między poszczególnymi liniami komórkowymi w ich reakcji na badane stilbeny. Różnice te były następnie obserwowane praktycznie przy okazji oceny każdego z kolejnych parametrów badanych.

Badania skoncentrowane na ocenie intensywności apoptozy wykazały, że we wszystkich typach komórek rakowych syntetyczne stilbeny nasilają to zjawisko, przy czym siła efektów

wywieranych przez obie pochodne resweratrolu była porównywalna. Sam resweratrol, z kolei, nie wpływał na częstość apoptozy w komórkach A2780, natomiast nasilał ją w komórkach OVCAR-3 (choć tylko w pierwszej dobie ekspozycji) oraz w komórkach SKOV-3 (w trzeciej dobie, przy najwyższym z użytych stężeń).

Ocena proliferacji komórek nowotworowych wykazała, że wszystkie trzy badane związki działają antyproliferacyjnie, zmniejszając odsetek komórek replikujących DNA, tj. będących w fazie S cyklu komórkowego. W przypadku komórek A2780 najskuteczniej działał resweratrol, a efekty wywierane przez 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS były bardzo zbliżone. W przypadku komórek OVCAR-3 wszystkie trzy badane związki hamowały aktywność podziałową w porównywalnym stopniu, natomiast w przypadku linii SKOV-3, najefektywniej działał 3,3',4,4'-THS. Poszukiwania przyczyn ograniczenia aktywności proliferacyjnej komórek pod wpływem stilbenów, ukierunkowane na rolę starzenia komórkowego wykazały, że wszystkie trzy związki badane znacząco zwiększają aktywność enzymu β-galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA-β-Gal), będącego uznawanym markerem komórek starych. Prawdopodobną przyczyną indukcji programu starzenia w komórkach eksponowanych na stilbeny mogło być nasilenie generowania reaktywnych form tlenu (RFT) przez komórki. Jak wykazały badania, w komórkach OVCAR-3 i SKOV-3, badane związki zwiększają produkcję RFT, przy czym w tych pierwszych najsilniej czyni to 3,3',4,4',5,5'-HHS, natomiast w drugich, 3,3',4,4'-THS. Z kolei w komórkach A2780 oba syntetyczne analogi w zbliżonym stopniu zwiększają generowanie RFT, natomiast resweratrol wykazuje działanie hamujące.

Badania adhezji komórek nowotworowych do komórek mezotelium otrzewnowego (LKMO) wykazały, że resweratrol hamuje adhezję trzech linii komórek rakowych, stilben 3,3',4,4'-THS nasila to zjawisko, natomiast 3,3',4,4',5,5'-HHS wywiera efekt pobudzający w odniesieniu do komórek OVCAR-3 i SKOV-3 oraz hamujący w stosunku do A2780. Dalsze badania komórkowej ekspresji integryn $\alpha 5\beta 1$ pokazały zasadniczo analogiczny kierunek zmian pod wpływem stilbenów, co może sugerować przynajmniej częściowe zaangażowanie tych molekuł w modulowaniu adhezji komórek raka jajnika do LKMO.

Ocena migracji komórek rakowych przez błony poliwęglanowe w kierunku chemotaktycznego działania medium kondycjonowanego, wygenerowanego przez komórki nowotworowe poddawane działaniu stilbenów wykazała, że resweratrol hamuje migrację komórek OVCAR-3 i SKOV-3 i nie zmienia jej w przypadku komórek A2780. Stilben

3,3',4,4'-THS okazał się pobudzać migrację komórek A2780 i OVCAR-3 oraz hamować to zjawisko w komórkach SKOV-3. Trzeci z badanych związków, 3,3',4,4',5,5'-HHS ograniczał migrację komórek A2780 i SKOV-3, natomiast pobudzał ją w przypadku komórek OVCAR-3. Przeprowadzone badania sekrecji kwasu hialuronowego (HA) przez komórki poddawane działaniu stilbenów wykazały, że w przypadku komórek OVCAR-3 i SKOV-3 zmiany sekrecji podążają w kierunku zgodnym ze zmianami migracji. W przypadku komórek A2780 zmiany wydzielania HA nie były zbieżne ze zmianami migracji komórek, czego odzwierciedleniem był efekt odnotowany dla trzeciej doby ekspozycji, polegający na pobudzeniu wydzielania HA przez wszystkie trzy związki badane.

Na koniec ocenie poddano proliferację i migrację komórek śródbłonka naczyniowego HUVEC w odpowiedzi na działanie medium kondycjonowanego z hodowli młodych i starych LKMO eksponowanych na stilbeny. Badania pokazały, że resweratrol hamuje proliferację i migrację komórek HUVEC, zależne od medium generowanego przez LKMO, a efekt ten jest związany z zahamowaniem produkcji czynnika wzrostu śródbłonka naczyń VEGF oraz chemokiny IL-8/CXCL8 przez te komórki. Z drugiej strony, syntetyczne stilbeny okazały się wpływać pobudzająco na zależną od młodych i starych LKMO proliferację komórek śródbłonkowych oraz zależną tylko od komórek starych migrację. Efektom tym towarzyszył wzrost produkcji do medium VEGF i IL-8/CXCL8. Nasilenie wydzielania mediatorów angiogenezy przez LKMO eksponowane na stilbeny mogło być związane ze wzrostem stresu oksydacyjnego w tych komórkach, co potwierdziły wyniki oceny produkcji RFT.

Podsumowując, można stwierdzić, że badane syntetyczne analogi resweratrolu działają w sposób komórkowo-specyficzny, hamując tylko niektóre elementy progresji komórek raka jajnika. Jednocześnie, szereg zjawisk związanych z postępem choroby jest pod ich wpływem nasilony, co stawia pod dużym znakiem zapytania możliwość ich wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej. Spośród badanych związków tylko resweratrol posiada wszelkie predyspozycje do stosowania go w celach terapeutycznych. Pewne oczekiwania można pokładać w dalszych badaniach nad zależnościami między strukturą chemiczną i właściwościami biologicznymi syntetycznych, dodatkowo hydroksylowanych pochodnych resweratrolu, które na bazie opisanych w niniejszej rozprawie doświadczeń pozwolą na zidentyfikowanie związków o budowie gwarantującej zachowanie wykazanych efektów przeciwnowotworowych, przy jednoczesnej eliminacji efektów niepożądanych z punktu widzenia skuteczności terapii.

SUMMARY

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene) is a natural phytoalexin known for its anti-cancer properties. Unfortunately, the low bioavailability and rapid degradation to less active metabolites limit the use of this compound in practical medicine. Therefore, lots of attention is paid to synthetic derivatives of resveratrol whose biological properties have repeatedly been recognized to be more pronounced compared with their natural precursor.

The aim of this study was to determine the anti-cancer activity of two new, synthetic, additionally hydroxylated resveratrol analogues, that is 3,3',4,4'-tetrahydroxy-*trans*-stilbene (3,3',4,4'-THS) and 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxy-*trans*-stilbene (3,3',4,4',5,5'-HHS). More specifically, the study was aimed at evaluating the effect of these compounds on several indicators of ovarian cancer cell (A2780, OVCAR-3, and SKOV-3) progression *in vitro*, including their viability, apoptotic cell death, proliferation, senescence, adhesion, and migration. Moreover, the effect of the stilbenes on the proliferation and migration of vascular endothelial cells HUVEC related to the secretory phenotype of young and senescent human peritoneal mesothelial cells (HPMCs) was examined. An important element of the study was a comparison of the effects exerted by the synthetic stilbenes with the activity of their natural precursor, resveratrol. The experiments were performed using three concentrations of the test compounds, namely 10, 50 and 100 mM and three exposure times: 24, 48, and 72 hours.

It has been found that the synthetic stilbenes are characterized by a high degree of cytotoxicity for ovarian carcinoma cell lines A2780 and SKOV-3, and a smaller cytotoxicity with respect to OVCAR-3 cells. The tumor cell survival curves and the calculated IC_{50} values demonstrated the highest cytotoxic activity of 3,3',4,4'-THS which induced cell death at the lowest range of concentrations. The activity of resveratrol was a bit lower while the weakest effects were observed for 3,3',4,4',5,5'-HHS. The cytotoxicity measurements revealed an existence of a significant differences between the studied cancer cell lines in their response to the stilbenes. These differences were observed practically during the assessment of each of the next parameters studied.

The investigations focused on apoptosis showed that the synthetic stilbenes potentiate the incidence of this kind of cell death in all types of cancer cells studied, and the effects exerted by both the synthetic stilbenes are comparable. Resveratrol, in turn, had no effect on the

frequency of apoptosis in A2780 cells as well as augmented it in OVCAR-3 cells (though only at 24-hour exposure) and in SKOV-3 cells (on the third day, at the highest concentration used).

When it comes to the proliferation studies, all three tested compounds have been found to act as antiproliferative agents by reducing the percentage of cells replicating their DNA, that is being in the S phase of the cell cycle. In the case of A2780 cells, resveratrol was the most effective while the effects of its both derivatives were similar. With respect to OVCAR-3 cells, all three tested compounds inhibited the proliferative capacity at a similar degree whereas in the SKOV-3 line, 3,3',4,4'-THS was the most effective.

The search for the causes of the cell proliferation activity restriction upon exposure to stilbenes were concentrated on the role of cellular senescence and revealed that all three tested stilbenes significantly increase the activity of senescence-associated β-galactosidase (SA-β-Gal), an enzyme commonly used as a marker of senescence. The probable reason of an induction of senescence program in cancer cells exposed to the stilbenes appeared to be an increased production of reactive oxygen species (ROS) by the cells. It has been evidenced that in the case of OVCAR-3 and SKOV-3 cultures, all of the tested compounds increase the generation of ROS, but in the former the strongest effect is exerted by 3,3',4,4',5,5'- HHS, and in the latter by 3,3',4,4'-THS. In turn, in A2780 cells both the analogues increase the release of ROS in a similar extent while resveratrol exhibits an inhibitory effect.

Studies of adhesion of cancer cells to human peritoneal mesothelial cells (HPMCs) demonstrated that resveratrol inhibits the adhesion of three tumor cell lines, stilbene 3,3', 4,4'-THS increases this phenomenon, and stilbene 3,3',4,4',5,5'-HHS has the stilumatory effect with respect to OVCAR-3 and SKOV-3 cells, and the inhibitory activity towards A2780 cells. The results of the measurements of the expression of integrins α5β1 appeared to be in line with the direction of adhesion changes in response to the stilbenes, suggesting at least partial involvement of these molecules in the modulation of ovarian cancer cell adhesion to HPMCs upon treatment with the stilbenes.

The rate of migration of ovarian cancer cells through the polycarbonate membrane towards the chemotactic action of the conditioned medium generated by tumor cells treated with the stilbenes revealed that resveratrol inhibits the migration of OVCAR-3 and SKOV-3 cells, and does not affect this process in the case of A2780 cells. Stilbene 3,3',4,4'-THS appeared to stimulate the migration of A2780 and OVCAR-3 cells, and to inhibit this phenomenon in SKOV-3 cells. The third stilbene, 3,3',4,4',5,5'-HHS limits the migration of

A2780 and SKOV-3 cells, and stimulates it in OVCAR-3 cells. The analysis of hyaluronic acid (HA) secretion by the cells treated with the stilbenes showed that the changes in HA release by OVCAR-3 and SKOV-3 cultures are in keeping with the changes in cancer cell migration. In the case of A2780 cells, the secretion of HA did not correspond to changes in cell migration, which was clearly seen at the third day of exposure, at which the release of HA was stilumated by all three stilbenes tested.

The last aspect of the project was the evaluation of proliferation and migration of vascular endothelial cells HUVEC in response to conditioned medium generated by young and senescent HPMCs exposed to the stilbenes. It has been found that resveratrol inhibits both the aspects of angiogenic endothelial cell behaviour and this effect was associated with decreased production of vascular endothelial growth factor (VEGF) and the chemokine IL-8/CXCL8 by HPMCs. On the other hand, both synthetic resveratrol analogues appeared to stimulate the proliferation of HUVECs exposed to medium from young and senescent HPMCs as well as the migration related to secretory profile of senescent cells. Those effects coincided with increased secretion of VEGF and IL-8/CXCL8 by HPMCs. Increased production of those angiogenesis mediators by HPMCs could be associated with increased oxidative stress, which confirmed the measurements of ROS production by these cells upon treatment with the synthetic stilbenes.

Altogheter, it can be concluded that both tested synthetic resveratrol analogues act in a cell-specific manner, inhibiting only some of the elements of ovarian cancer cell progression. At the same time, a number of phenomena related to the progress of the disease is intensified upon treatment with these compounds, which actually excludes the possibility of their use in therapy. Of the compounds tested only resveratrol is predisposed to apply it for therapeutic purposes. Some expectations can be placed in further studies of relationships between a chemical structure and biological properties of synthetic, additionally hydroxylated resveratrol derivatives which on the basis of the results provided in this dissertation will allow to identify some new compounds with the structure guaranteeing the preservation of the reported anti-cancer effects, avoiding at the same time all the effects undesirable from the therapeutical point of view.

1. WSTĘP

1.1. Choroba nowotworowa jako wyzwanie naszych czasów

Wraz z rozwojem medycyny, rozpowszechnieniem testów diagnostycznych, metod obrazowania i strategii terapeutycznych, a także zwiększeniem świadomości społeczeństwa na temat stanu zdrowia, roli diety i aktywności fizycznej, nastąpiła znacząca poprawa jakości oraz wzrost średniej długości życia mieszkańców krajów uprzemysłowionych, w tym także i Polski. Według szacunkowych danych, odsetek osób w wieku 65 lat lub starszych, który w 2010 roku określono na niespełna 17%, może osiągnąć w roku 2035 wartość blisko 27% [1]. Niestety, wraz z pojawieniem się tego demograficznego trendu dał się zaobserwować wzrost częstości występowania szeregu chorób związanych z wiekiem, szczególnie tych o podłożu nowotworowym. Wśród Polaków nowotwory stanowią drugą przyczynę zgonów; według danych z 2010 roku z ich powodu zmarło 26% mężczyzn i 23% kobiet. Do najczęściej występujących nowotworów u mężczyzn należą rak płuca, prostaty i jelita grubego, a u kobiet rak piersi, jelita grubego i płuca. Najwyższa zachorowalność na nowotwory złośliwe dotyczy mężczyzn w wieku 55-74 lata i kobiet w wieku 50-69 lat [2]. Leczenie tych chorób jest zazwyczaj długotrwałe, a współczynnik sukcesu terapeutycznego, mierzony wieloletnią przeżywalnością chorych jest daleki od oczekiwanego [3].

W związku z powyższym trwają intensywne prace, mające na celu identyfikację związków chemicznych (naturalnych lub syntetycznych), które mogą opóźniać tempo starzenia się organizmu, hamować rozwój niekorzystnych zmian narządowych, jak również przeciwdziałać rozwojowi chorób związanych z wiekiem. Szczególną uwagę poświęca się w tym kontekście związkom, które mogą w sposób bezpośredni działać chemoprewencyjnie, ograniczając rozwój nowotworu w jego naturalnej lokalizacji oraz hamując jego inwazyjność do narządów odległych. W ostatnich latach, obiecujących wyników w tej materii dostarczyły badania resweratrolu, przedstawiciela naturalnie występujących stilbenów, który okazał się łączyć w swym działaniu szereg właściwości korzystnych z punktu widzenia ograniczania rozwoju chorób związanych z wiekiem, tj. działanie przeciwstarzeniowe, kardioprotekcyjne i przeciwnowotworowe [4-6]. Na potencjalnych możliwościach wykorzystania tego związku w praktyce cieniem kładzie się jednak jego niska biodostępność oraz szybki rozkład do mniej aktywnych metabolitów [7]. Aby przeciwdziałać tym niedogodnościom, zapoczątkowano badania różnego rodzaju syntetycznych pochodnych resweratrolu, które niejednokrotnie okazały się cechować wyższą aktywnością biologiczną od swego

naturalnego prekursora [2]. Niniejsza rozprawa wpisuje się w nurt tych badań, gdyż jej wątkiem przewodnim jest kompleksowa analiza wpływu dwóch nowych, dotąd bardzo słabo poznanych syntetycznych pochodnych resweratrolu, na najważniejsze zjawiska związane z inwazyjnością komórek nowotworowych w modelu *in vitro*. Jako model badawczy wybrano raka jajnika, która to choroba zajmuje, według danych z 2010 roku, odpowiednio, 5 i 4 miejsce pod kątem zachorowalności i śmiertelności z powodu nowotworów u kobiet w naszym kraju [2]. Co więcej, częstość zachorowania na ten typ nowotworu, jak i stopień jego agresywności są ściśle powiązane z procesem starzenia się organizmu [8;9]. Istotną przesłanką do podjęcia próby określenia wpływu pochodnych resweratrolu na progresję raka jajnika jest także i to, że stosowane obecnie rozwiązania chemioterapeutyczne częstokroć obarczone są dużym ryzykiem wystąpienia poważnych efektów ubocznych [10;11].

1.2. Etiologia raka jajnika

Rak jajnika jest nowotworem złośliwym, cechującym się dużą heterogennością w odniesieniu do pochodzenia, budowy histologicznej, przebiegu choroby i sposobów leczenia. Mimo ciągłego postępu obserwowanego w medycynie, związanego z lepszą dostępnością do zaawansowanych metod diagnostycznych i zwiększonymi możliwościami terapeutycznymi, rak jajnika nadal wykrywany jest w późnych stadiach zaawansowania klinicznego i cechuje się wysoką śmiertelnością. Z powodu braku lub subtelności wczesnych objawów, więcej niż 70% pacjentów zostaje zdiagnozowanych w późnych stadiach choroby [12-14].

Pod kątem zachorowalności i przebiegu choroby, rak jajnika jest chorobą o złożonej etiologii, a na plan pierwszy wysuwają się takie przyczyny, jak: wiek pacjentek, czynniki o charakterze reprodukcyjnym i hormonalnym, współistniejące choroby ginekologiczne, tło genetyczne oraz czynniki związane z odżywianiem i stylem życia [15].

1.2.1. Proces starzenia

Rak jajnika rozwija się głównie u kobiet w okresie około- i pomenopauzalnym, co może być związane ze zmniejszeniem liczby oocytów, redukcją poziomu krążących we krwi estrogenów oraz znaczącym zmniejszeniem produkcji hormonów gonadotropowych, tj. hormonu folikulotropowego (FSH) oraz hormonu luteinizującego (LH) przez przedni płat przysadki mózgowej. Stwierdzono, że 50% wszystkich raków jajnika diagnozuje się u pacjentek 65-letnich i starszych [8;16;17]. Biorąc pod uwagę, że w ciągu najbliższych 20 lat

liczba pacjentów po 65 roku życia może ulec nawet podwojeniu [8;17], niepokojącym spostrzeżeniem jest, że poziom dostępności chemioterapii u osób starszych cierpiących na tę chorobę jest niższy w porównaniu z przedstawicielami młodszych grup wiekowych, co poniekąd wiązane jest z obawami klinicystów przed eskalacją możliwych powikłań [18-20].

Innym, zależnym od wieku aspektem przebiegu raka jajnika jest jego inwazyjność. U kobiet w wieku 75,4 ± 10,9 lat choroba okazała się mieć agresywniejszy przebieg w porównaniu z kobietami w wieku 67,9 ± 10,9 lat. Także średni wiek zachorowania kobiet z guzem o wysokim stopniu inwazyjności był wyższy (59,1 lat) w porównaniu z pacjentkami z guzem ograniczonym (48,4 lata) [9]. Różnice stwierdzono także w przeżywalności chorych. Porównując osoby będące w tej samej fazie choroby wykazano, że przeżywalność kobiet przed 80 rokiem życia była, przeciętnie, o 18 miesięcy dłuższa w porównaniu z pacjentkami w wieku lat 80 i więcej [21].

1.2.2. Czynniki związane z rozrodczością

Ważną grupą czynników zaangażowanych w rozwój raka jajnika są czynniki związane z rozrodczością kobiety oraz aktywnością jej układu hormonalnego. Ponieważ ryzyko rozwoju raka jajnika ma związek z częstością i liczbą owulacji w życiu kobiety, można wśród tych czynników wymienić wczesną pierwszą miesiączkę [22], późną pierwszą ciążę [22], późną menopauzę [23], niepłodność [24], stosowanie leków na bezpłodność (np. Clomidu) [25] oraz hormonalną terapię zastępczą (HTZ) [26]. W odniesieniu do ostatniego z wymienionych czynników dane literaturowe są najbardziej niejednoznaczne. Według części badań, HTZ nie wywiera wpływu na rozwój raka jajnika [27], inne podkreślają natomiast, że ryzyko nowotworzenia jest wprost proporcjonalne do czasu stosowania HTZ [28]. Jeszcze inne badania dowiodły natomiast, że ryzyko zachorowania na raka jajnika wzrasta u kobiet zażywających same estrogeny, w przeciwieństwie do tych, stosujących terapię estrogenowo-progesteronową [29].

Przez analogię można też stwierdzić, że czynnikami zmniejszającymi ryzyko zachorowania na raka jajnika są te, które hamują proces owulacji. Są wśród nich: przebyte ciąże, laktacja i stosowanie doustnych środków antykoncepcyjnych [30]. W tym kontekście wykazano m.in., że kobiety rodzące wielokrotnie mają o 30 do 70% mniejsze ryzyko zachorowania na raka jajnika w porównaniu z nieródkami [31]. Uważa się, że mechanizm ochronnego wpływu braku owulacji polega na zmniejszeniu liczby torbielek inkluzyjnych i ochronie nabłonka powierzchniowego jajnika przed urazem związanym z drażniącym

wpływem bogatego w estrogeny płynu pęcherzykowego [32]. Od wielu lat analizowany jest także związek między zażywaniem doustnych środków antykoncepcyjnych a rozwojem nowotworów żeńskiego układu rozrodczego. W przypadku raka jajnika wykazano, że stosowanie doustnej antykoncepcji zmniejsza ryzyko rozwoju nowotworu o 40-50%, przy czym efekty znaczące obserwowano po 10 latach stosowania antykoncepcji [33]. Istnieją także dowody wskazujące na skuteczność przeciwnowotworową doustnej antykoncepcji stosowanej w małych dawkach [34]. U kobiet z rakiem jajnika w wywiadzie rodzinnym, ryzyko rozwoju choroby zmniejsza się wraz z długością stosowania doustnej antykoncepcji [35]. Badania sugerują także, że przyjmowanie doustnych środków antykoncepcyjnych zmniejsza o połowę ryzyko raka jajnika u kobiet po 70 roku życia z rodzinnym wywiadem raka jajnika, w porównaniu z pacjentkami nie stosującymi środków antykoncepcyjnych [36].

1.2.3. Schorzenia ginekologiczne

Endometrioza to stan chorobowy związany z ektopowym występowaniem błony śluzowej macicy, w którym może dochodzić do procesu złośliwego. Szacuje się, że do transformacji nowotworowej dochodzi w około 5-10% przypadków endometriozy, a dane histopatologiczne wskazują na pokrewieństwo endometrialnego raka jajnika i raka endometrium [37]. Wzrost ryzyka zachorowania na raka jajnika stwierdzono także u kobiet z zespołem policystycznych jajników [38].

1.2.4. Dziedziczne postaci raka jajnika

Wyróżniono następujące typy rodzinnego występowania raka jajnika: zespół rodzinnego raka jajnika (ang. *hereditary ovarian syndrome;* HOC), zespół rodzinnego raka piersi i raka jajnika (ang. *hereditary breast-ovarian cancer syndrome;* HBOC) oraz zespół Lyncha (ang. *hereditary nonpolyposis colorectal cancer;* HNPCC) [39;40]. Zespoły te odpowiedzialne są za wystąpienie około 5-10% wszystkich nowotworów jajnika [41]. W dziedzicznych postaciach raka jajnika najważniejszym czynnikiem ryzyka jest stopień obciążenia rodzinnego, przy czym oszacowano, że obciążenie rzędu 4-7% i 7-15% oznacza ryzyko pojawienia się nowotworu w przypadku posiadania, odpowiednio, jednego lub dwóch/więcej krewnych w pierwszym stopniu pokrewieństwa [41].

W odniesieniu do dziedzicznych nowotworów jajnika zidentyfikowano dwa kluczowe typy mutacji, predysponujących do wystąpienia choroby. Są to mutacje w genach *BRCA1* i

BRCA2 występujące w około 90% przypadków HBOC i w 65-85% wszystkich postaci dziedzicznych. Z kolei mutacje w przynajmniej czterech genach naprawy niedopasowania (ang. *mismatch repair*; MMR), tj. *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2* obecne są w 10-15% przypadków HNPCC [40].

W sytuacji obciążenia dziedzicznym występowaniem nowotworu złośliwego jajnika zaleca się wykonanie profilaktycznego usunięcia jajników. Zabieg ten nie chroni jednak całkowicie przed wystąpieniem nowotworu, gdyż u 1,8-10,7% kobiet poddanych tej operacji istnieje ryzyko rozwoju pierwotnego raka wewnątrzotrzewnowego, odpowiadającego histopatologicznie nowotworom nabłonkowym jajnika [41].

1.2.5. Czynniki związane odżywianiem

Wiele uwagi poświęca się w ostatnich latach otyłości, która poprzez nasilenie wytwarzania endogennych hormonów (w wyniku stymulacji konwersji androgenów do estrogenów) może zwiększać ryzyko bezpłodności i, pośrednio, wpływać na wzrost ryzyka wystąpienia raka jajnika [42]. Wykazano, że podwyższona wartość wskaźnika masy ciała (BMI) u młodych dorosłych kobiet (BMI równe 25 i więcej) jest związana z dwukrotnym wzrostem częstości występowania przedmenopauzalnego raka jajnika [43]. Co ważne, w odniesieniu do kobiet przed menopauzą, czynnikiem ograniczającym ryzyko zachorowania jest aktywność fizyczna, której wpływ jest tym silniejszy, im jest ona częstsza i dłuższa [44].

Sugeruje się, że do czynników ryzyka raka jajnika związanych z dietą może także należeć spożywanie takich składników pokarmowych, jak: galaktoza (u osób z polimorfizmem N314D urydylotransferazy galaktozo-1-fosforanowej) [45] i tłuszcze nasycone [46]. Produkty pochodzenia zwierzęcego, w tym czerwone mięso, mleko, jajka mogą zwiększać wydzielanie FSH i LH, co może prowadzić do wzrostu ryzyka wystąpienia raka jajnika wskutek bezpośredniej stymulacji podziałów komórek i hamowania apoptozy nabłonka powierzchniowego jajnika [47]. Z kolei oliwa z oliwek i tłuszcze roślinne okazały się działać ograniczająco na wystąpienie choroby [48].

Negatywny wpływ na funkcjonowanie jajników, stężenie hormonów płciowych oraz pojawienie się problemów rozrodczych wywiera nikotynizm [49], który może także przyczyniać się do rozwoju śluzowego raka jajnika [50].

1.2.6. Inne czynniki

Wykazano, że rak jajnika, który zaliczany jest do chorób cywilizacyjnych, może być związany z szeregiem czynników o charakterze socjoekonomicznym. Stwierdzono między innymi, że wzrost zachorowalności na ten nowotwór u Japonek po zakończeniu II Wojny Światowej może być związany ze znaczącymi zmianami w ich stylu życia (często na wzór "zachodni") [51]. Częściej chorują także osoby żyjące samotnie, jednak z oczywistych względów, przyczyna tej predyspozycji jest niejasna [52]. Większe ryzyko zachorowania zaobserwowano także u kobiet pracujących w zawodach związanych z suszeniem ubrań, używaniem telefonu, telegrafu, papieru pakownego, graficznego i drukowanego [53]. Kliniczne i epidemiologiczne badania sugerują również związek pomiędzy rakiem jajnika a kosmetycznym używaniem talku [54].

1.3. Obraz kliniczny raka jajnika

Wczesna wykrywalność raka jajnika jest kluczem do skutecznej terapii, niestety jednak choroba ta jest rzadko diagnozowana we wczesnych stadiach, z uwagi na brak charakterystycznych objawów lub ich dyskretność. Podobny problem dotyczy także braku wartościowych, specyficznych markerów wczesnej diagnozy [55]. Z tego powodu rak jajnika często określany jest mianem "cichego zabójcy" [56]. Oszacowano, że tylko 15% raków jajnika ograniczonych jest do samego jajnika, 17% występuje regionalnie, natomiast 62% przypadków jest już chorobą rozległą [57]. Wraz z szerzeniem się raka jajnika w miednicy i jamie brzusznej pacjenci często skarżą się na bóle o nietypowej lokalizacji, wzdęcia, zaparcia, dyspepsję oraz uczucie sytości. Często występuje zwiększony obwód brzucha na skutek gromadzenia się płynu w jamie otrzewnej. Innymi objawami są krwawienia oraz nagłe parcie na mocz. Gdy guz rozprzestrzenia się poza miednicę mniejszą, pojawiają się bóle w trakcie stosunków płciowych [12].

Pod kątem rokowniczym, najważniejszym czynnikiem jest stopień zaawansowania choroby. Według Międzynarodowego Stowarzyszenia Ginekologii i Położnictwa (FIGO), kliniczny podział nowotworów jajnika obejmuje IV stopnie zaawansowana, zebrane w tabeli nr 1.

Tabela 1. Kliniczny podział nowotworów jajnika wg FIGO (na podstawie [58]).

Stopień	Opis
I	Guz ograniczony do jajników.
Ia	Guz ograniczony do jednego jajnika, bez wysięku otrzewnowego, bez nacieku na torebkę guza; torebka nieuszkodzona.
Ib	Guzy ograniczone do obu jajników, bez wysięku otrzewnowego, bez naciekania na torebkę guza; torebka nieuszkodzona.
Ic	Guz jak w stopniu Ia lub Ib, ale z naciekiem jednego lub obu jajników, albo z uszkodzoną torebką lub wodobrzuszem, z komórkami nowotworowymi w rozmazie cytologicznym płynu.
II	Guz jednego lub obu jajników z zajęciem narządów miednicy mniejszej.
IIa	Nacieczenie przez ciągłość i/lub przerzuty do macicy lub jajowodów.
IIb	Nacieczenie innych tkanek miednicy mniejszej.
IIc	Guz jak w stopniu IIa lub IIb, ale z naciekiem na powierzchni jednego lub obu jajników albo z pękniętą torebką lub z wodobrzuszem zawierającym komórki nowotworowe, albo z komórkami nowotworowymi w popłuczynach z otrzewnej.
III	Guz obejmujący jeden lub oba jajniki z przerzutami wewnątrzotrzewnowymi poza miednicą mniejszą i/lub przerzutami do węzłów pozaotrzewnowych lub pachwinowych. Przerzuty na powierzchni wątroby. Guz ograniczony do miednicy mniejszej, ale z histologicznie potwierdzonym zajęciem jelita cienkiego lub sieci.
IIIa	Guz makroskopowo ograniczony do miednicy mniejszej bez zajęcia węzłów, ale z histologicznie potwierdzonym mikroskopowo rozsiewem na powierzchni otrzewnowej jamy brzusznej.
IIIb	Guz obejmujący jeden lub oba jajniki z histologicznie potwierdzonymi naciekami śródotrzewnowymi nieprzekraczającymi średnicy 2 cm. Węzły chłonne niezajęte.
IIIc	Nacieki śródotrzewnowe o średnicy większej niż dwa cm i/lub zajęte węzły pozaotrzewnowe albo węzły pachwinowe
IV	Guz jednego lub obu jajników z odległymi przerzutami. Nowotworowy charakter wysięku w opłucnej powinien być potwierdzony badaniem cytologicznym. Przerzuty do miąższu wątroby.

1.4. Charakterystyka histopatologiczna nowotworów jajnika

Guzy jajnika są heterogenną grupą nowotworów, wykazującą różnorodność morfologiczną i biologiczną [59]. Najczęściej występującą grupą pierwotnych nowotworów jajnika są guzy pochodzące z jego nabłonka powierzchniowego (*carcinomas*), które stanowią blisko 90% wszystkich nowotworów złośliwych tego gruczołu [13]. Największe znaczenie kliniczne mają guzy surowicze, śluzowe i endometrialne. Reszta guzów jajnika występuje sporadycznie (Tabela 2).

W celu określenia stopnia złośliwości histologicznej nowotworu analizuje się zróżnicowanie struktury oraz cech cytologicznych komórek nowotworowych. Dla określenia stopnia atypii komórkowej kluczową rolę odgrywa obraz jądra komórkowego, w tym jego barwliwość i wielkość oraz obecność figur podziałowych [57].

Tabela 2. Podział raków jajnika pod kątem histologicznym (na podstawie [56])**.**

Typ nowotworu	
Surowicze	75%
Endometrialne	10%
Śluzowe	10%
Jasnokomórkowe	< 5%
Niezróżnicowane	< 5%
Niesklasyfikowane	<5%
Mieszane Przejściowe Płaskonabłonkowe	

1.5. Molekularne tło rozwoju raka jajnika

Do dnia dzisiejszego powstało kilka rozbieżnych (choć niekiedy komplementarnych) poglądów na temat pochodzenia komórek raka jajnika oraz molekularnych mechanizmów nowotworzenia [13;60]. Już w 1872 roku Sir Spencer Wells przedstawił teorię, zakładającą, że z warstwy nabłonka powierzchniowego jajnika, pod wpływem różnych czynników stymulujących, dochodzi do zainicjowania kancerogenezy [61]. Powstały w tym procesie rak poddawany jest następnie działaniu innych czynników mikrośrodowiska, co pozwala na jego różnicowanie w raka surowiczego, śluzowego, jasnokomórkowego, endometrialnego i

przejściowego, których budowa histologiczna naśladuje utkanie obecne w jajowodzie, przewodzie pokarmowym, endometrium, kanale szyjki macicy i pęcherzu moczowym [62;63]. Wśród czynników, które mogłyby zapoczątkować nowotworzenie wymieniano starzenie się jajników, stymulację gonadotropinami i owulację prowadzącą do systematycznych uszkodzeń nabłonka pokrywającego jajnik, a przy tym do jego przebudowy na drodze metaplazji [32;64]. Powyższa teoria przetrwała ponad 120 lat, jednakże w badaniach molekularnych, genetycznych i epidemiologicznych nie udało się wyczerpująco udekumentować jej pełnej słuszności.

Według innej, tradycyjnej już koncepcji, rak jajnika powstaje z nabłonka wyścielającego jajnik (*mesothelium*). Nabłonek powierzchni jajnika, stanowiący ciągłość z warstwą mezotelium wyścielającą jamę otrzewnej, pochodzi z nabłonka pokrywającego pierwotną jamę ciała (*coelomic mesothelium*) w trakcie embriogenezy [13;41]. Jego komórki charakteryzuje zdolność do różnicowania się, przez co rak jajnika cechuje się dużą heterogennością histologiczną [13]. Teoria ta ma jednak szereg ograniczeń, wśród których najważniejszym jest to, że z punktu widzenia histologii, pojedyncza warstwa mezotelium pokrywającego jajniki w niczym nie przypomina raków surowiczych, endometrialnych, śluzowych lub jasnokomórkowych. Aby znaleźć uzasadnienie dla tej nieścisłości zasugerowano, że pokrywające jajnik mezotelium zagłębia się w obręb podścieliska tworząc tzw. cysty inkluzyjne. Struktury te podlegają dalszemu wpływowi działających miejscowo czynników, w tym hormonów sterydowych, co prowadzi do zmian metaplastycznych, których wynikiem jest konwersja mezotelium do nabłonka typu Muellerowskiego. Takie cysty, po uzyskaniu cech fenotypowych struktur Muellerowskich ulegają transformacji nowotworowej, w efekcie czego powstają komórki rakowe poszczególnych typów histologicznych [65].

Jako pierwszy na znaczenie struktur pochodzenia Muellerowskiego w etiopatogenezie raka jajnika zwrócił uwagę Louis Dubeau, który zaobserwował, że nabłonek niezłośliwych surowiczych gruczolaków jajnika przypomina nabłonek wyścielający jajowody, nabłonek gruczolaków śluzowych – nabłonek kanału szyjki macicy, a nabłonek endometrialny – endometrium, które histologicznie są odmienne od komórek mezotelialnych wyścielających jajnik i narządy jamy brzusznej. Na podstawie analizy wcześniejszych badań dotyczących obecności struktur pochodzenia Muellerowskiego na powierzchni lub w pobliżu jajnika, które mogą ulegać zezłośliwieniu (tzw. wtórny system Muellerowski), strukturom tym

przypisano kluczową rolę w procesie nowotworzenia, szczególnie w przypadku raków surowiczych, endometrialnych i jasnokomórkowych [66].

Punktem wyjścia do kolejnej, alternatywnej teorii, zdobywającej jednak coraz większe rzesze zwolenników był Steven A. Narod, który zauważył, że podwiązanie jajowodów u kobiet, nosicielek mutacji w genach *BRCA* zmniejsza ich zapadalność na raka jajnika [67;68]. Połączenia hipotezy Dubeau z efektami zamknięciem drogi transferu komórek z jajowodu do jajnika dokonał Jurgen Piek, który w oparciu o wcześniejsze wyniki badań oraz własne obserwacje zasugerował, że dla surowiczego raka jajnika pierwotnym ogniskiem nowotworzenia może być jajowód a nie jajnik [69]. Było to zgodne z wynikami badań, mówiących, że profilaktycznie usunięte jajowody u nosicielek mutacji w genach *BRCA* wykazują obecność wewnątrznabłonkowych raków jajowodu przy braku ognisk nowotworu w nabłonku pokrywającym jajnik [70].

Dzięki powyższym odkryciom, wskazującym na zasadność koncepcji Dubeau zaczęto diagnozować raki we wczesnym etapie rozwoju i wykazano, że najczęstszym miejscem rozwoju surowiczego raka jajnika są strzępki jajowodu [71]. W 2005 roku opublikowano dane dotyczące ekspresji genów z rodziny *HOX*, będących markerami różnicowania nabłonka pochodzenia Muellerowskiego, które są powszechne w rakach jajnika, nie są jednak obecne w jego nabłonku powierzchniowym [65]. Kolejne badania dowiodły ogniskowej nadekspresji genu *TP53* w prawidłowych morfologicznie komórkach strzępków jajnika. U nosicielek mutacji w genie *BRCA* takie same mutacje w genie *TP53* są obecne ogniskowo w prawidłowym nabłonku pokrywającym jajnik (70% zgodności) oraz w raku *in situ* jajowodu i raku jajnika (100% zgodności), co potwierdziło ciągłość kancerogenezy surowiczego raka jajnika zainicjowanego w strzępkach jajowodu [72].

Wczesne postaci kliniczne surowiczego raka jajnika charakteryzują się występowaniem niskiego stopienia zróżnicowania, co sprawia, że histopatologicznie przypominają zaawansowany nowotwór [73]. Nawet niewielkie gruczolakoraki surowicze wraz z przylegającym nabłonkiem molekularnie wykazują mutacje genu *TP53*. Guzy surowicze o histologicznie niskim stopniu zaawansowania posiadają tylko mutacje w genie *KRAS* [73].

Kolejny możliwy mechanizm rozwoju surowiczego raka jajnika zakłada, że na narządach jamy brzusznej, w tym również na nabłonku pokrywającym jajnik mogą osiadać komórki odłączające się od podścieliska strzępków jajowodu. W przypadku osadzenia w miejscu

uszkodzonego nabłonka, np. po przebytej owulacji, komórki te tworzą torbiel inkluzyjną wyścieloną nabłonkiem Muellerowskim [74].

Badania szlaków molekularnych zaangażowanych w rozwój raka jajnika wykazały pewne podobieństwo raków surowiczych i endometrialnych, z uwzględnieniem szczególnej roli mutacji w genach *KRAS* i *BRAF*. Może to sugerować, że prekursorami tych typów nowotworów są niezłośliwe nowotwory jajnika, które poprzez nowotwory graniczne przekształcają się w raki endometrialne lub surowicze [13]. Ogniska endometriozy lub samo endometrium mogą być, z kolei, prekursorami raka endometrialnego [75]. W sporadycznych rakach endometrialnych najczęściej występującą zmianą są mutacje genu *CTNNB1* (kodującego β-kateninę) i genu supresorowego *PTEN* [13;73].

Rak śluzowy wykazuje duże podobieństwo do raków przewodu pokarmowego, natomiast rak jasnokomórkowy może rozwijać się z komórek gruczołowych kanału szyjki macicy lub z ognisk endometriozy [63]. Na podłożu guza łagodnego często rozwijają się śluzowe raki jajnika, w których często obserwowaną zmianą są mutacje genu *KRAS* i, choć rzadziej, genu *TP53* [73].

1.6. Mechanizmy powstawania przerzutów raka jajnika

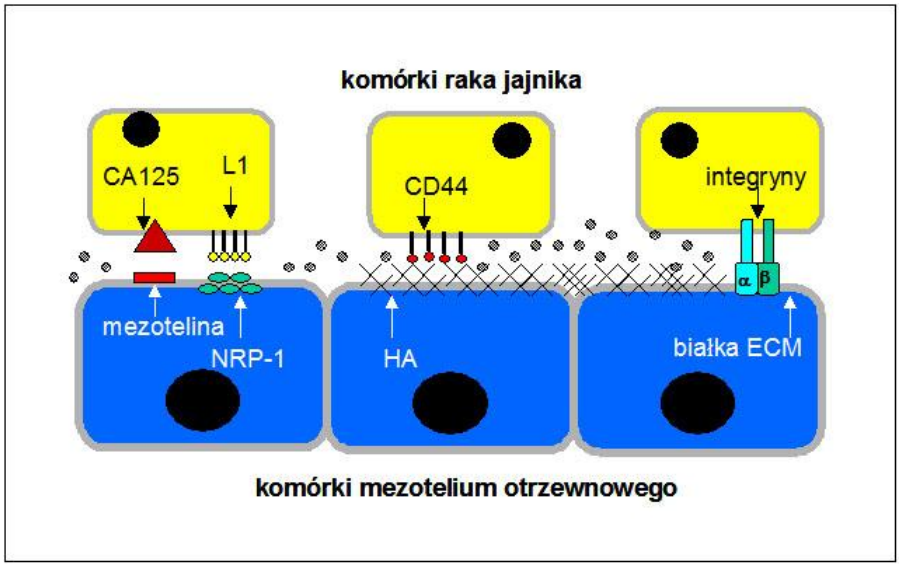
Główną przyczyną zgonów z powodu raka i cechą charakterystyczną nowotworów złośliwych jest zdolność do tworzenia przerzutów. Podobnie do innych typów nowotworów pochodzenia nabłonkowego, rak jajnika szerzy się drogą naczyń limfatycznych i krwionośnych do węzłów chłonnych oraz parenchymy narządów odległych, w tym wątroby, płuc i mózgu. Cechą wyróżniającą ten nowotwór jest zdolność do rozsiewu w obrębie jamy otrzewnej, czego efektem jest formowanie przerzutów na otrzewnej trzewnej i ściennej, a szczególnie w obrębie sieci większej [76].

Jama otrzewnej jest głównym miejscem przerzutów raka jajnika w zaawansowanych stadiach choroby, a problem ten dotyczy około 70% chorych w fazie III i IV. Powierzchniowe przerzuty do wątroby są wykrywane u 54% pacjentów w fazie IV, a przerzuty zlokalizowane w obrębie sieci większej dotyczą 46% chorych w fazie III [77]. W trakcie inwazji jamy otrzewnej, komórki nowotworowe są zrzucane z powierzchni jajnika, a następnie niesione przez płyn otrzewnowy osiadają na powierzchni komórek mezotelialnych. Po ich adhezji, komórki nowotworowe migrują po mezotelium, a następnie, dzięki sekrecji enzymów proteolitycznych, infiltrują i remodelują zrąb otrzewnej, umożliwiając proliferację komórek w nowej dla nich lokalizacji [78;79]. Według powszechnej opinii, to właśnie

wzajemne interakcje, zachodzące między napływającymi komórkami nowotworowymi, a dominującymi w otrzewnej prawidłowymi komórkami mezotelialnymi mają kluczowe znaczenie dla przebiegu wewnątrzotrzewnowej inwazyjności raka jajnika. Zasadnicze różnice dotyczą jednak postrzegania roli komórek mezotelium otrzewnowego. Według części badaczy, bowiem, komórki te stanowią ostatnią linię obrony otrzewnej przed procesem nowotworowym, a jej sforsowanie otwiera komórkom raka jajnika nieograniczone możliwości kolonizacji tej jamy ciała [80]. Koncepcja ta bazuje na obserwacji braku komórek mezotelialnych pod otrzewnową masą guza w zaawansowanym stadium choroby [81], czego przyczyną jest aktywność generowanej przez komórki nowotworowe miozyny, pobudzanej działaniem integryn α5β1 oraz taliny 1 [79]. Alternatywne mechanizmy retrakcji komórek mezotelialnych uwzględniają uszkadzania przez komórki nowotworowe połączeń międzykomórkowych [82] oraz indukcję apoptozy w mechanizmie zależnym od ligandu Fas (FasL) [83]. W kontekście usuwania warstwy mezotelialnej ważne jest i to, że jego następstwem jest ekspozycja elementów macierzy pozakomórkowej (ang. *extracellular matrix*; ECM) oraz leżących głębiej fibroblastów otrzewnowych, którym przypisuje się działanie promujące dalszą ekspansję guza [82;84].

Odrębna koncepcja stanowi natomiast, że to właśnie oddziaływania między komórkami mezotelialnymi a komórkami raka jajnika są odpowiedzialne za rozprzestrzenianie się choroby w obrębie otrzewnej. Przykładem takich interakcji jest szczególnie proces adhezji komórek nowotworowych do mezotelium, w przebiegu którego aktywny udział biorą cząsteczki obecne na powierzchni obu typów komórek (Rycina 1). Dotyczy to m.in. oddziaływań glikoproteiny CD44, obecnej na powierzchni komórek nowotworowych, z kwasem hialuronowym (ang. *hyaluronic acid,* HA), znajdującym się na powierzchni komórek mezotelialnych [85;86]. Dowodem wartości biologicznej tych oddziaływań jest zmniejszenie liczby implantów wewnątrzotrzewnowych w modelu mysim, po zastosowaniu przeciwciał neutralizujących CD44 [87]. Interakcje CD44-HA pośredniczą także w migracji komórek raka jajnika, co odbywa się wskutek uruchomienia szlaku sygnałowego, zależnego od kinazy C-src i związanej z tym fosforylacji białka cytoszkieletu, kortaktyny [88]. Brak pełnego ograniczenia adhezji komórek rakowych wskutek zablokowania interakcji CD44-HA sugeruje jednak czynny udział innych mediatorów adhezji komórek rakowych. Wśród nich, na szczególną uwagę zasługują integryny β_1 na powierzchni komórek raka jajnika [89;90], wiążące się z elementami ECM, w tym fibronektyną, kolagenem i witronektyną na

powierzchni komórek mezotelium otrzewnowego [91-93]. Sugeruje się także, że warunkiem efektywnej adhezji komórek raka jajnika, zależnej od obecności fibronektyny i witronektyny jest rozkład tych białek na mniejsze fragmenty o zwiększonym powinowactwie do specyficznych integryn przez metaloproteinazę 2 (MMP-2) [94]. Adhezja niektórych typów komórek raka jajnika jest także związana z interakcjami między antygenem CA125/MUC16 na powierzchni komórek nowotworowych a mezoteliną, obecną na komórkach mezotelialnych [95]. Pewną rolę przypisuje się także łączeniu się cząstki adhezyjnej L1 pochodzenia nowotworowego z jej receptorem, neurofiliną-1 (NRP-1) na powierzchni mezotelium [96].



Rycina 1. Najważniejsze mediatory wzajemnych interakcji między komórkami raka jajnika a komórkami mezotelium otrzewnowego. Znaczenie dla adhezji, migracji i proliferacji komórek nowotworowych mają także czynniki rozpuszczalne wydzielane do środowiska, oznaczone na schemacie jako kropki między dwoma typami oddziaływujących komórek.

Duże znaczenie dla poszczególnych elementów inwazyjności komórek raka jajnika mają także czynniki wydzielane do środowiska przez komórki mezotelialne. Potwierdzeniem tego było nasilenie migracji i inwazyjności komórek nowotworowych pod wpływem wygenerowanego przez mezotelium medium kondycjonowanego [97-99]. Badania na hodowlach mieszanych komórek raka jajnika z mezotelialnymi wykazały m.in., że rozpuszczalne HA i fibronektyna pochodzenia mezotelialnego są czynnikami zwiększającymi migrację komórek nowotworowych [97;100]. Z kolei oddziaływania między

chemokiną CXCL12, wydzielaną przez komórki mezotelialne a jej receptorem CXCR4, obecnym na komórkach raka jajnika mogą być zaangażowane w proliferację komórek nowotworowych [101;102]. Adhezję, migrację i inwazyjność komórek nowotworowych pobudza także kwas lizofosfatydowy (LPA), wydzielany konstytutywnie przez komórki mezotelialne [99], poprzez interakcję z receptorami LPA_2 i LPA_3 [103;104]. Spośród czynników pochodzenia mezotelialnego, zaangażowanych w adhezję i inwazyjność komórek raka jajnika na uwagę zasługuje także inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1), którego synteza przez komórki mezotelialne jest pobudzana przez transformujący czynnik wzrostu β1 (TGF-β1), wydzielany przez komórki nowotworowe [105]. Komórki mezotelialne aktywnie uczestniczą także w rozwoju unaczynienia guza, produkując mediatory angiogenezy, w tym czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF) [106;107]. Efekt ten jest o tyle ważny, iż jak wykazały badania na modelu zwierzęcym, początkowa adhezja komórek raka jajnika oraz dalszy wzrost guza w otrzewnej jest ograniczony do rejonów o wysokiej gęstości naczyń krwionośnych [108].

1.7. Leczenie raka jajnika

Postępowanie w leczeniu raka jajnika jest wieloetapowe oraz uzależnione od stopnia zaawansowania choroby, złośliwości i budowy histopatologicznej nowotworu, stanu ogólnego i wieku chorych. Postępowanie obejmuje leczenie chirurgiczne, chemioterapię, a niekiedy także radioterapię [109].

Głównym sposobem leczenia u kobiet z podejrzeniem raka jajnika oraz w sytuacji znacznego zaawansowania choroby jest leczenie chirurgiczne, którego celem jest ocena stopnia rozprzestrzeniania się nowotworu w jamie brzusznej, pobranie materiału, postawienie diagnozy oraz cytoredukcja nowotworu [109]. Zalecana jest maksymalna cytoredukcja guza, ponieważ zmniejszenie masy guza o każde 10% zwiększa czas przeżycia chorych o 5,5% [110]. Zabieg operacyjny w rakach niskozaawansowanych (FIGO I i II) polega na wykonaniu cięcia pośrodkowego oraz usunięciu macicy z przydatkami [109]. W rakach zaawansowanych (FIGO III i IV) zabieg z cięcia pośrodkowego ukierunkowany jest na możliwie największą cytoredukcję guza, usunięcie macicy, przydatków oraz wycięcie wszystkich ognisk przerzutów z jelit i otrzewnej [109]. Pacjentki, u których pozostawiono mniej niż 1 cm nowotworu, usuwając wszystkie widoczne ogniska, lepiej odpowiadają na leczenie chemioterapeutyczne, wykazując rzadziej oporność na związki platyny i cechując

się dłuższym całkowitym przeżyciem [111]. W niektórych przypadkach przeprowadza się odroczoną operację cytoredukcyjną, której celem jest zoptymalizowanie efektywności zabiegu po leczeniu cytostatykami. Stosuje się ją zazwyczaj po 3 cyklach chemioterapii [109].

W odniesieniu do stosowanych rozwiązań chemioterapeutycznych, wybór algorytmu leczenia determinowany jest stopniem zaawansowania choroby. Dla kobiet we wczesnych stadiach nie ma ustalonego schematu chemioterapii pod kątem rodzaju cytostatyku, ilości tur i czasu ich trwania. Zwykle stosuje się 6 cykli paklitakselu i pochodnych platyny [76]. W monoterapii stosuje się najczęściej związki platyny [109]. W stadiach IA i IB nie stosuje się adjuwantowej chemioterapii, a przeżycia 5-letnie w tych grupach wynoszą 90% [112]. Stadia III i IV choroby wymagają 6 kursów adjuwantowej chemioterapii. Popularnym schematem jest stosowanie co trzy tygodnie terapii dwulekowej, obejmującej karboplatynę i paklitaksel. W razie nietolerancji karboplatyny lub paklitakselu wdraża się monoterapię lub zamienia karboplatynę na cisplatynę. Przy nadwrażliwości na paklitaksel należy rozważyć podanie docetakselu, topotekanu, gemcytabiny lub pegylowanej liposomalnej doksorubicyny [109].

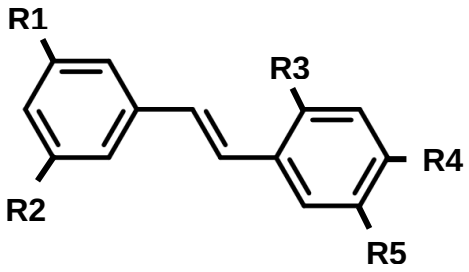
Zwyczajowo chemioterapia podawana jest dożylnie, przy czym na uwagę zasługują trzy randomizowane próby III fazy testów, które wykazały 20-25% zmniejszenie ryzyka śmierci po zastosowaniu terapii dootrzewnowej u pacjentów z optymalną chirurgiczną cytoredukcją guza [113-115]. Niestety, jak dowodzą tego badania wieloletnie, zastosowanie operacji cytoredukcyjnej wspartej następnie chemioterapią bazującą na związkach platyny i taksanach nie wpłynęły znacząco na ogólny wzrost efektywności leczenia [116]. Niemałe znaczenie w tym kontekście mają liczne efekty uboczne stosowanych terapii, występujące niezależnie od drogi podania leków [10;11]. Pozytywną zmianą, którą dało się natomiast odnotować jest wzrost współczynnika 5-letniej przeżywalności pacjentów z 37% w latach 1974-1976 do 46% w latach 1999-2005 [116].

W kontekście chemioterapii raka jajnika nie sposób pominąć szeregu nowoczesnych strategii, celujących w molekularne czynniki i szlaki sygnałowe, leżące u podstaw progresji choroby. Duże nadzieje pokłada się m.in. w wykorzystaniu związków blokujących angiogenezę, w tym neutralizujących mediatory tego zjawiska, takie jak VEGF. Należą do nich przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko VEGF (Bewacizumab) [117] oraz drobnocząsteczkowe inhibitory kinaz tyrozynowych, blokujące receptor dla VEGF (Cediranib) [118]. Trwają m.in. badania mające określić skuteczność bewacizumabu oraz

cediranibu w połączeniu z karboplatyną i paklitakselem [119]. Inne, obiecujące formy terapii wykorzystują inhibitory receptora dla epidermalnego czynnika wzrostu (EGF) i płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF), inhibitory receptora kwasu foliowego, inhibitory polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP), inhibitory kinazy Aurora, inhibitory szlaku sygnałowego Hedgehog oraz inhibitory szlaku mTOR [119].

1.8. Resweratrol jako przedstawiciel stilbenów

Stilbeny, zwane też stilbenoidami, to drobnocząsteczkowe (210-270 g/mol) związki aromatyczne, pochodne 1,2-difenyloetenu, których strukturę można schematycznie przedstawić za pomocą wzoru C_6—C_2—C_6 (Rycina 2) [120]. W zależności od pozycji przyłączenia poszczególnych grup funkcyjnych, ich wzajemnego położenia względem siebie i względem wiązania podwójnego, związki te występują w dwóch formach stereoizomerycznych: *cis*- i *trans*-. Spośród tych dwóch odmian, aktywniejsze biologicznie, m.in. pod kątem działania antyoksydacyjnego i przeciwnowotworowego są izomery *trans*- [121;122]. Pod względem właściwości biologicznych, naturalne stilbeny są fitoaleksynami o działaniu ochronnym, które syntetyzowane są przez rośliny w odpowiedzi na zakażenie, uszkodzenia struktur, stres oksydacyjny oraz nadmierne działanie promieniowania UV [123;124].



Rycina 2. Budowa chemiczna stilbenów. Symbolami R (R1-R5) oznaczono najczęstsze pozycje grup funkcyjnych w wybranych stilbenach. Resweratrol: R1-OH; R2-OH; R3-H; R4-OH; R5-H. Piceatannol: R1-OH; R2-OH; R3-H; R4-OH; R5-OH. Pterostilben: R1-OCH3; R2-OCH3; R3-H; R4-OH; R5-H (na podstawie [120]).

Stilbenem cieszącym się największym zainteresowaniem wśród naukowców jest od wielu już lat resweratrol (3,5,4'-trihydroksy-*trans*-stilben) [125]. Związek ten, z uwagi na podobieństwo struktury chemicznej do syntetycznego dietylostilbestrolu estrogenowego (4,4'-dihydroksy-*trans*-α,β-dietylostilbenu) i zdolność do oddziaływania z receptorem

estrogenowym jest zaliczany do tzw. fitoestrogenów [126]. W naturze, resweratrol jest spotykany w obu formach izomerycznych, przy czym lepiej poznana i aktywniejsza jest odmiana *trans*-resweratrolu [120]. Wskutek działania takich czynników jak: promienie UV, wysokie pH, jak również w wyniku rozpadu polimerów resweratrolu w czasie fermentacji skórek z winogron, forma *trans*- ulega przekształceniu do formy *cis*- [127].

Po raz pierwszy izolacji resweratrolu dokonano w 1940 roku, a źródłem związku był korzeń ciemiężycy wielokwiatowej (*Veratum gradiflorum*) [128]. Na dzień dzisiejszy wiadomo, że resweratrol występuje w naturze, w wielu roślinach, przy czym jego najwyższe stężenie stwierdzono w korzeniu rdestowca ostrokończystego (*Polygonum cuspidatum*). Roślina ta jest uprawiana w Japonii i Chinach dla celów tamtejszej medycyny ludowej, a szczególnie wytwarzania preparatu *Kojo-kon*, skutecznego w leczeniu ropnych zakażeń skóry, grzybic i chorób wenerycznych [129]. Bogate w resweratrol są także różne odmiany winorośli, szczególnie winorośl właściwa (*Vitis vinifera*) [130] oraz — co za tym idzie — różne gatunki win. Z uwagi na występowanie resweratrolu głównie w skórkach winogron (50-100 μg na gram owoców) oraz przez wzgląd na różne technologiczne aspekty produkcji win (w przypadku win czerwonych zmiażdżone owoce pozostawione są razem z sokiem, natomiast, w przypadku win białych, wytłoczona masa wraz ze skórkami jest natychmiast usuwana), odmianę winogron, miejsce ich uprawy, rok zbioru oraz warunki atmosferyczne, poszczególne gatunki win charakteryzują się odmienną zawartością resweratrolu (zakres od 0,1 do 15 mg/l) [124;127;131]. Największe jego stężenia stwierdza się winach czerwonych (średnie stężenie ~1,9 mg/l), następnie są wina różowe, natomiast najmniejsza zawartość resweratrolu jest w winach białych. Szczególne bogate w ten związek są wina z owoców dojrzewających w chłodniejszym klimacie [131]. Wśród tych ostatnich, największą zawartością resweratrolu charakteryzują się Pinot Noir (~7,15 mg/l) i Merlot (~7,74 mg/l) [120;126;127;132]. W niższych stężeniach związek ten występuje także w orzeszkach ziemnych, owocach jagodowych, żurawinie, malinach, truskawkach, niektórych ziołach, kwiatach i liściach ciemiężycy białej, sosny zwyczajnej, rabarbaru, orchidei, skórkach pomidorów i kakao [125;130;133].

1.8.1. Właściwości biologiczne resweratrolu

Wchłanianie resweratrolu w ludzkim organizmie odbywa się w jelicie cienkim, po czym jest on metabolizowany we wątrobie przy udziale cytochromu P450 i przekształcany do piceatannolu (3,3',4',5-tetrahydroksy-stilbenu) i tetrahydroksystilbenu o symbolu M1. Okres

połowicznego rozpadu resweratrolu jest niewielki i waha się od 8-14 minut [7]. Ostatecznymi metabolitami są siarczanowe i glukuronowe formy *trans*-resweratrolu, krążące we krwi do 9 godzin, a następnie wydalane przez nerki oraz z kałem [132;134].

1.8.1.1. Działanie kardioprotekcyjne

Zjawisko tzw. "paradoksu francuskiego", oznaczające niższą śmiertelność mieszkańców krajów basenu Morza Śródziemnego z powodu schorzeń sercowo-naczyniowych, pomimo spożywania diety bogatej w tłuszcze nasycone, skłoniło badaczy do przeanalizowania przyczyn tego zjawiska [5]. Efektem tych badań było skorelowanie dobroczynnych efektów zdrowotnych z regularnym spożywaniem oliwy z oliwek oraz czerwonego wina zawierającego resweratrol [132;135]. Stwierdzono, że związek ten może zapobiegać zdarzeniom niedokrwiennym poprzez wielokierunkowe działanie na mięsień sercowy, w tym hamowanie peroksydacji lipidów, zmniejszenie wychwytywania utlenionych lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) przez makrofagi, blokowanie wnikania zmodyfikowanych lipoprotein do ściany naczyń krwionośnych, nasilanie relaksacji mięśni gładkich naczyń krwionośnych oraz hamowanie agregacji płytek krwi [136;137].

Badania sugerują, że ograniczenie stopnia utleniania lipoprotein LDL przez resweratrol może być związane z jego zdolnością do hamowania aktywności reduktazy chinonowej 2 (QR-2), katalizującej przekształcenia nukleotydów adenozynowych, a przez to zwiększającej aktywność komórkowych mechanizmów antyoksydacyjnych [138]. Związek ten w znaczący sposób obniża generowanie reaktywnych form tlenu (RFT), a efekt ten wywiera prawdopodobnie w sposób synergistyczny wraz z innymi polifenolami obecnymi w winie [139]. Uważa się, że duże znaczenie dla właściwości antyoksydacyjnych resweratrolu ma odpowiednie ułożenie grup funkcyjnych w pierścieniu aromatycznym, a mianowicie obecność grupy hydroksylowej w pierścieniu B oraz jej obecność w pozycji *meta*- w pierścieniu A [140].

W odniesieniu do właściwości wazodilatacyjnych resweratrolu, są one w głównej mierze wynikiem jego stymulującego działania na produkcję tlenku azotu (NO) [141]. Z kolei działanie antyagregacyjne tego związku wiąże się prawdopodobnie z hamowaniem aktywności cyklooksygenazy 1 (COX-1), tj. enzymu kluczowego dla przemian fosfolipidów błonowych, w tym wytwarzania proagregacyjnego tromboksanu B2 [142]. Silne właściwości przeciwmiażdżycowe resweratrolu potwierdziły badania przeprowadzone na modelu mysim,

z wykorzystaniem zwierząt z wyciszonym genem odpowiedzialnym za ekspresję apoE i receptora dla lipoprotein o niskiej gęstości (LDL). Badania te wykazały, że po 8 tygodniach stosowania diety bogatotłuszczowej, zwierzęta, których dietę wzbogacono w resweratrol cechowały się znaczącą redukcją przyrostu blaszek miażdżycowych w aorcie oraz zahamowaniem tempa tworzenia zmian zakrzepowych w tętnicach szyjnych [143].

1.8.1.2. Działanie przeciwzapalne, przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe

Mechanizm przeciwzapalnego działania resweratrolu w głównej mierze wynika z jego zdolności do hamowania syntezy i wydzielania mediatorów reakcji zapalnej, w tym limfotoksyny, czynnika stymulującego kolonie granulocytów i makrofagów (GM-CSF), interleukiny 8 (IL-8) i histaminy [144]. Ponadto, związek ten obniża produkcję interleukiny 1 (IL-1), interleukiny 6 (IL-6) [145], białka chemotaktycznego monocytów 1 (MCP-1) [146] czynnika martwicy nowotworów α (TNF-α) oraz ekspresję cząstek adhezyjnych VCAM-1 i ICAM-1 [147]. Hamowanie reakcji zapalnej pod wpływem resweratrolu jest także związane z jego zdolnością do blokowania aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB [148].

Resweratrol wpływa na ograniczenie rozwoju szeregu drobnoustrojów, w tym bakterii *Staphylococcus aureus* i *Helicobacter pylori* oraz wirusa *Herpes simplex* (HSV) [149]. Stwierdzono, że 12,5% i 25% krem z resweratrolem jest skuteczny w leczeniu wirusa HSV-1 u myszy, nawet w zakażeniu opornym na leczenie acyklowirem [149]. Resweratrol z dużą efektywnością hamuje także replikację wirusa cytomegalii, a mechanizm tego działania jest związany z blokowaniem receptora dla EGF i hamowaniem przekazywania sygnału przez 3-kinazę fosfatydyloinozytolu (PI3K) [150].

1.8.1.3. Działanie neuroprotekcyjne

W ostatnich latach, resweratrol budzi także duże zainteresowanie ze względu na swoje właściwości neuroprotekcyjne, rozpatrywane szczególnie w odniesieniu do choroby Alzheimera i choroby Parkinsona. Przykładem takiej aktywności może być ochrona komórek hipokampa zwierząt doświadczalnych przed toksycznością β-amyloidu, zależna od aktywacji kinazy białkowej C (PKC) [151]. Odrębny mechanizm działania resweratrolu w aspekcie ograniczania neurotoksyczności β-amyloidu obejmuje hamowanie aktywności indukowalnej formy syntazy tlenku azotu (iNOS) i związane z tym obniżenie stopnia wywoływanej przez β-amyloid peroksydacji lipidów [152]. W komórkach mikrogleju,

resweratrol zapobiega negatywnym skutkom działania reaktywnych form tlenu także poprzez pobudzenie aktywności mechanizmów antyoksydacyjnych [153;154].

W kontekście choroby Parkinsona badania wykazały, że resweratrol ma zdolność hamowania produkcji cytokin prozapalnych w obrębie neuronów dopaminergicznych u zwierząt z chorobą indukowaną za pomocą 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny (MPTP) [155]. W odrębnym modelu doświadczalnym wykazano także, że utrata neuronów dopaminergicznych i usprawnienie motoryczne zwierząt traktowanych MPTP w odpowiedzi na resweratrol może być wynikiem jego działania antyoksydacyjnego [156]. Z kolei u zwierząt, u których choroba Parkinsona została wywołana za pomocą 6-hydroksydopaminy, resweratrol wpłynął na zachowanie właściwej ultrastruktury neuronów dopaminergicznych oraz złagodził przebieg choroby, co powiązano przyczynowo z ograniczeniem lokalnej odpowiedzi zapalnej. Efekty te odnotowano już po dwóch tygodniach stosowania związku [157].

1.8.1.4. Działanie przeciwnowotworowe

Przeciwnowotworowe działanie resweratrolu opisano po raz pierwszy w 1997 roku [158]. Dzisiaj wiadomo już, że związek ten może być szeroko wykorzystywany w prewencji i terapii chorób nowotworowych, gdyż posiada on zdolność efektywnego hamowania każdego z etapów nowotworzenia, tj. inicjacji, promocji i progresji choroby [158]. Hamowanie inicjacji procesu nowotworowego przez resweratrol może m.in. wynikać z jego zdolności do usuwania RFT oraz detoksykacji czynników kancerogennych [127;132]. Znaczenie w tym kontekście może odgrywać jego zdolność do przeciwdziałania aktywności przedstawicieli rodziny cytochromu P450 (CYP), w tym CYP1A1, CYP1A2 oraz CYP1B1, powodująca ochronę komórek przed działaniem różnych związków kancerogennych [159]. Ograniczanie postępu choroby pod wpływem resweratrolu może być związane z jego hamującym działaniem na polimerazę DNA i reduktazę rybonukleotydową [160]. Czynnikiem odpowiedzialnym za antyproliferacyjne działanie resweratrolu jest także odpowiednie rozmieszczenie hydroksylowych grup funkcyjnych w szkielecie stilbenu, a szczególnie obecność tej grupy w pozycji 4' [161].

Istotną właściwością resweratrolu w kontekście hamowania progresji nowotworów jest jego zdolność do hamowania angiogenezy. Badania wykazały, że związek ten hamuje proliferację, migrację oraz tworzenie struktur tubularnych przez komórki śródbłonka

naczyniowego *in vitro* [162;163], jak również zmniejsza unaczynienie zmian nowotworowych *in vivo* [164]. Takie działanie resweratrolu jest w głównej mierze determinowane jego wpływem na obniżenie produkcji mediatorów angiogenezy, w tym VEGF oraz interleukiny 8 (IL-8) [165-167].

Tabela 3. Zjawiska biologiczne i czynniki modulowane działaniem resweratrolu w komórkach prawidłowych i nowotworowych (na podstawie [120]).

PROCES	CZYNNIK	KIERUNEK ZMIANY
apoptoza	Bax	wzrost
	Bcl-2	obniżenie
	ceramid	wzrost
	cyklaza adenylowa	wzrost
	FasL	wzrost
	kaspazy	wzrost
	p53	wzrost
	surwiwina	obniżenie
cykl komórkowy	cykliny A, B1, D	obniżenie
	CDK2	wzrost
	pRb	obniżenie
	p21	wzrost
	p27	wzrost
proces zapalny	COX-1 i -2	obniżenie
	iNOS	obniżenie
	ICAM-1	obniżenie
	IL-6	obniżenie
	VCAM-1	obniżenie
transdukcja sygnału	ERK1/2	obniżenie
	PKC	obniżenie
	PKD	obniżenie
	Syk	obniżenie
transkrypcja	↓ AP-1	obniżenie
	↓ NF-κB	obniżenie
	↓ β-katenina	obniżenie

Resweratrol posiada zdolność uwrażliwiania komórek nowotworowych na substancje chemioterapeutyczne, stosowane rutynowo w terapii onkologicznej, powodując hamowanie cyklu komórkowego na etapie przejścia faz G_1/S oraz nasilenie częstości apoptozy [168;169]. Indukcję apoptozy komórek nowotworowych związek ten nasila także poprzez aktywację genu supresorowego *p53*, co stwierdzono m.in. w komórkach raka piersi [170]. Niebagatelne znaczenie dla zwiększania efektywności chemioterapii pod wpływem

resweratrolu ma także jego wpływ na hamowanie aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB, czego efektem jest skoncentrowanie działania chemioterapeutyków w ich miejscu przeznaczenia [171]. Na chwilę obecną wykazano aktywność przeciwnowotworową resweratrolu, zarówno pod kątem działania antyproliferacyjnego i proapoptotycznego, w odniesieniu do wielu typów komórek nowotworowych, w tym: nerwiaka płodowego [172], rdzeniaka zarodkowego [173], białaczki limfatycznej B-komórkowej [174], chłoniaka nieziarniczego [175], raka piersi [170], raka jajnika [176], raka prostaty [177], raka okrężnicy [178] oraz czerniaka złośliwego [179].

1.8.1.5. Działanie przeciwstarzeniowe

Istnieje wiele dowodów wskazujących, iż resweratrol może w pozytywny sposób wpływać na tempo procesu starzenia się. Główną przesłanką na poparcie tej tezy jest fakt, iż związek ten w znaczący sposób wydłuża średni czas życia organizmów modelowych, w tym drożdży piekarniczych [180], nicieni [181], muszek owocówek [182], a nawet niektórych gatunków ryb [183;184]. Istnieje przekonanie, że wzrost długości życia tych organizmów pod wpływem resweratrolu może być związany z aktywacją białek z rodziny sirtuin, będących NAD^+-zależnymi deacetylazami histonowymi, zaangażowanymi w szereg procesów biologicznych, zapewniających ochronę DNA i związaną z tym stabilność genomu [185;186]. W komórkach poddawanych działaniu resweratrolu, aktywność Sir1 (ang. *silent information regulator 1*) okazała się być podwyższona nawet kilkunastokrotnie [180]. W kontekście powyższych obserwacji wiele wskazuje także na to, iż wpływ resweratrolu na długość życia organizmów modelowych związany z aktywacją sirtuin może być analogiczny do opóźniającego starzenie wpływu restrykcji kalorycznej [4;187].

Co ciekawe, z aktywnością sirtuin, szczególnie wspomnianej Sir1, wiąże się także proces starzenia komórkowego, którego tempo wydaje się pozostawać w odwrotnej zależności z poziomem ekspresji tego białka [188]. Być może właśnie wpływem resweratrolu na aktywację Sir1 można tłumaczyć poprawę właściwości proliferacyjnych oraz spowolnienie tempa replikacyjnego starzenia się różnego typu komórek somatycznych, poddawanych działaniu tego związku [189-191]. Według niedawnych doniesień, wpływ resweratrolu na zahamowanie tempa utraty zdolności podziałowych przez komórki może być także wynikiem blokowania ścieżki sygnałowej kinazy mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*), będącej jednym z najważniejszych szlaków efektorowych komórkowego

starzenia [192;193]. Trzeba jednak podkreślić, że w przypadku procesu starzenia zachodzącego na poziomie komórkowym, efekty biologiczne wywierane przez resweratrol są niejednoznaczne, czego dowodem jest m.in. przyspieszone wchodzenie w fazę starzenia keratynocytów i komórek śróbłonka naczyniowego, poddawanych działaniu tego związku [194;195].

1.8.2. Aktywność biologiczna analogów resweratrolu

Pomimo korzystnego, plejotropowego działania resweratrolu w odniesieniu do szeregu zjawisk patologicznych, aktywność i możliwości szerszego wykorzystania tego związku w celach terapeutycznych są silnie limitowane przez jego relatywnie niską biodostępność i szybkie tempo transformacji do siarczanów i glukuronidów [196]. W związku z powyższym trwają intensywne badania, ukierunkowane na charakterystykę właściwości biologicznych różnego typu pochodnych resweratrolu. Obiektem badań jest m.in. ocena siły efektów wywieranych przez analogi, np. ich potencjału antyoksydacyjnego, w zależności od liczby i położenia dodatkowych grup funkcyjnych, szczególnie grup metoksylowych i hydroksylowych [197;198]. Przykładowo, pochodne o katecholowym układzie grup hydroksylowych cechują się trzykrotnie wyższym stopniem cytotoksyczności w stosunku do komórek białaczkowych w porównaniu ze stilbenami o innym układzie podstawników [132]. Analiza związku pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną stilbenów wskazuje, że zastąpienie grup hydroksylowych resweratrolu grupami metoksylowymi zwiększa aktywność cytotoksyczną większości analogów [199].

1.8.2.1. Pochodne metoksylowe

Spośród metoksylowych pochodnych resweratrolu na szczególną uwagę zasługuje jego naturalny eter metylowy, 3,5–dimetoksy-4’-hydroksy-*trans*-stilben (*pterostilben*), który występuje w skórkach winogron i jagodach [200]. Właściwości przeciwnowotworowe tego związku są porównywalne z resweratrolem [201;202]. W skórnym modelu kancerogenezy u myszy, pterostilben okazał się skuteczniejszy od resweratrolu w hamowaniu aktywacji czynników transkrypcyjnych NF-κB i AP-1 [203]. Ta przewaga pterostilbenu nad resweratrolem może po części wynikać z jego większej biodostępności, związanej ze wzrostem lipofilności związku wskutek zastąpienia grup hydroksylowych metoksylowymi [203]. Hamowanie proliferacji komórek pod wpływem pterostilbenu zachodzi w sposób zależny od dawki i czasu, i jest związane z zatrzymaniem cyklu komórkowego na etapie fazy

G_1, z jednoczesną aktywacją białek inhibitorowych p16, p21, p27 i p53 oraz obniżeniem ekspresji cyklin A i E oraz cyklinozależnych kinaz CDK2, CDK4 i CDK6 [204]. Jak dotąd, cytotoksyczne działanie pterostilbenu wykazano w modelu *in vitro* na wielu typach komórek nowotworowych, w tym na komórkach raka wątroby, raka gruczołu krokowego, czerniaka złośliwego, raka jelita grubego oraz raka piersi [202].

Innym przedstawicielem analogów resweratrolu, posiadających w swej strukturze grupy metoksylowe, jest 3,4',5-trimetoksy-*trans*-stilben. Działanie cytostatyczne tego związku w przypadku niektórych typów nowotworów (np. raka jelita grubego) jest silniejsze w porównaniu z resweratrolem [205]. Związek ten jest także silnym induktorem apoptozy komórek nowotworowych, a efekt ten jest związany z zależnym od RFT obniżeniem potencjału błony mitochondrialnej, uwalnianiem cytochromu c oraz aktywacją kaspaz [205]. Potencjał antyoksydacyjny 3,4',5-trimetoksy-*trans*-stilbenu jest niższy niż resweratrolu [161], natomiast pod względem właściwości antyangiogennych, przewyższa on działanie swego naturalnego prekursora [206].

W odniesieniu do wpływu przeciwnowotworowego, wysoką skutecznością cechują się także 3,4,5,4'-tetrametoksy-*trans*-stilben i 3,5,3',4',5'-pentametoksy-*trans*-stilben, które hamują proliferację oraz indukują apoptozę w komórkach raka piersi [207], raka jelita grubego [208], raka prostaty [209] i raka jajnika [210].

1.8.2.2. Pochodne hydroksylowe

Najlepiej scharakteryzowanym przedstawicielem *hydroksy*-pochodnych resweratrolu jest 3,5,3',4'-tetrahydroksy-*trans*-stilben, czyli *piceatannol*. Związek ten występuje naturalnie w dużej ilości roślin i produktów spożywczych, szczególnie w cukrze trzcinowym, orzeszkach ziemnych, winogronach i owocach jagodowych [120;211]. Do jego powstania prowadzi także biotransformacja resweratrolu przy udziale cytochromów P450, przy czym główną rolę w tym zakresie odgrywa izoforma CYP1A1 [7].

Piceatannol został zidentyfikowany jako selektywny inhibitor kinaz tyrozynowych, wykazujący szczególną aktywność w stosunku do kinazy Syk [212]. Zablokowanie tej kinazy za pomocą piceatannolu hamuje reakcję astmatyczną oraz towarzyszący jej odczyn zapalny, w tym skurcz oskrzeli, degranulację komórek tucznych i reakcję anafilaktyczną [213;214]. Ponadto, piceatannol wykazuje silne działanie antyoksydacyjne, które w niektórych sytuacjach, np. w odniesieniu do peroksydacji lipidów zależnej od jonów Cu^{++},

jest silniejsze niż resweratrolu [215]. Silnie wyrażone są także jego właściwości przeciwnowotworowe, czego potwierdzeniem jest m.in. hamowanie proliferacji komórek białaczkowych [216] oraz komórek raka jelita grubego [120]. Piceatannol jest również silnym inhibitorem proliferacji i migracji komórek śródbłonka naczyniowego, przez co ogranicza rozwój guzów na drodze hamowania ich neowaskularyzacji [217].

Według danych literaturowych, najwyższą aktywnością spośród syntetycznych, dodatkowo hydroksylowanych pochodnych resweratrolu charakteryzuje się 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy-*trans*-stilben [145], którego właściwości antyoksydacyjne mogą być nawet kilka tysięcy razy wyższe niż resweratrolu [198]. Związek ten cechuje się także silnym potencjałem przeciwnowotworowym, szczególnie w stosunku do komórek czerniaka [218], białaczki promielocytarnej [219], raka jelita grubego [220] i raka piersi [221]. Antyproliferacyjne działanie tego związku może być związane z faktem, iż jest on silnym inhibitorem reduktazy rybonukleotydowej, tj. enzymu limitującego wydajność syntezy DNA *de novo* i obniżającego pulę trójfosforanów deoksyrybonukleotydów [222]. Pewne znaczenie dla antyproliferacyjnego wpływu 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy-*trans*-stilbenu ma także aktywacja białka supresorowego p53 [221]. Z kolei jego działanie proapoptotyczne wydaje się być związane z obniżeniem potencjału błony mitochondrialnej i aktywacją kaspaz efektorowych [221].

Spośród innych, godnych uwagi hydroksylowych pochodnych resweratrolu można wymienić 4,4'-dihydroxy-*trans*-stilben, który hamuje proliferację i inwazję komórek raka piersi [223], a efekt ten wynika ze wzmocnienia antyproliferacyjnego efektu ugrupowania 4' resweratrolu [224]. Wysoką aktywnością cechuje się także 3,4,5,4'-tetrahydroksy-*trans*-stilben, który hamuje proliferację i indukuje apoptozę w komórkach transformowanych poprzez wpływ na akumulację białka p53, zwiększenie ekspresji proapoptotycznych genów *GADD45* oraz *Bax* oraz supresję antyapoptotycznego genu *Bcl-2* [225].

2. CEL PRACY

W związku z doniesieniami literaturowymi, sugerującymi możliwości terapeutycznego wykorzystania syntetycznych analogów resweratrolu w walce z różnego typu nowotworami, zasadniczym celem podjętych badań była ocena działania dwóch nowych, syntetycznych pochodnych tego związku, tj. 3,3',4,4'-tetrahydroksy-*trans*-stilbenu i 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy-*trans*-stilbenu, w kontekście ograniczania progresji komórek raka jajnika.

W ujęciu szczegółowym, badania przeprowadzone w oparciu o model *in vitro* obejmowały określenie wpływu badanych związków na szereg zjawisk biologicznych, związanych z inwazyjnością komórek nowotworowych, w tym na ich:

a) żywotność,
b) śmierć apoptotyczną,
c) potencjał proliferacyjny,
d) starzenie komórkowe,
e) właściwości adhezyjne,
f) migrację,
g) zdolność modulowania procesu angiogenezy.

Ważnym elementem prowadzonych badań było także porównanie efektów wywieranych przez syntetyczne stilbeny z działaniem ich naturalnego prekursora, resweratrolu, jak również określenie (dzięki wykorzystaniu trzech różnych linii komórek raka jajnika), czy efekty wywierane przez badane związki mają charakter uniwersalny, czy komórkowo-specyficzny.

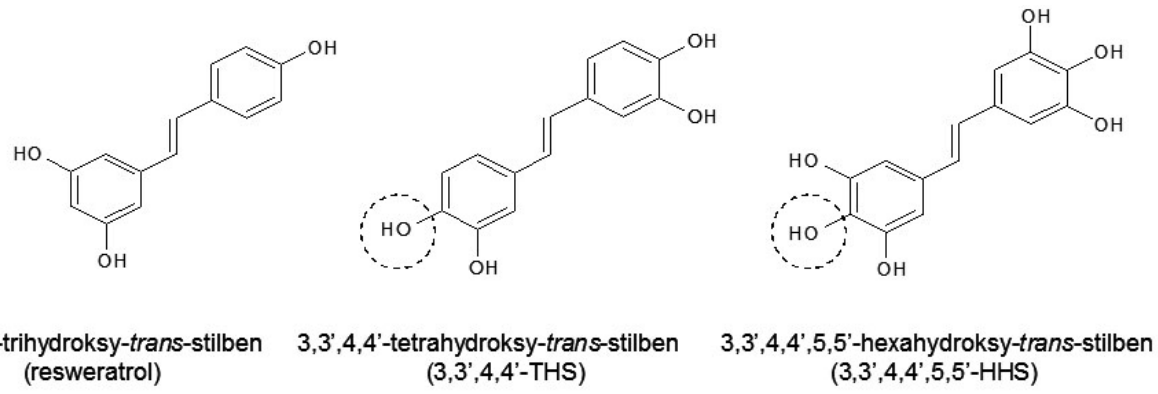
3. METODYKA

3.1. Materiały

Odczynniki chemiczne używane w trakcie doświadczeń i analiz biochemicznych zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA). Materiały zużywalne do prowadzenia hodowli komórkowych pochodziły z firm Nunc (Roskilde, Dania) oraz Becton Dickinson (Oxford, UK).

3.2. Związki badane

W toku doświadczeń wykorzystano trzy związki chemiczne z grupy stilbenów, tj.: 3,4',5-trihydroksy-*trans*-stilben (resweratrol; Res); 3,3',4,4'-tetrahydroksy-*trans*-stilben (3,3',4,4'-THS) i 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy-*trans*-stilben (3,3',4,4',5,5'-HHS). Resweratrol został zakupiony w firmie Sigma-Aldrich Corp., natomiast jego dodatkowo hydroksylowane analogi zostały zsyntetyzowane w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu przez dr. Marcina Wierzchowskiego, z wykorzystaniem metododologii opisanej w punkcie 2.1.



3,4',5-trihydroksy-*trans*-stilben (resweratrol) | 3,3',4,4'-tetrahydroksy-*trans*-stilben (3,3',4,4'-THS) | 3,3',4,4',5,5'-hexahydroksy-*trans*-stilben (3,3',4,4',5,5'-HHS)

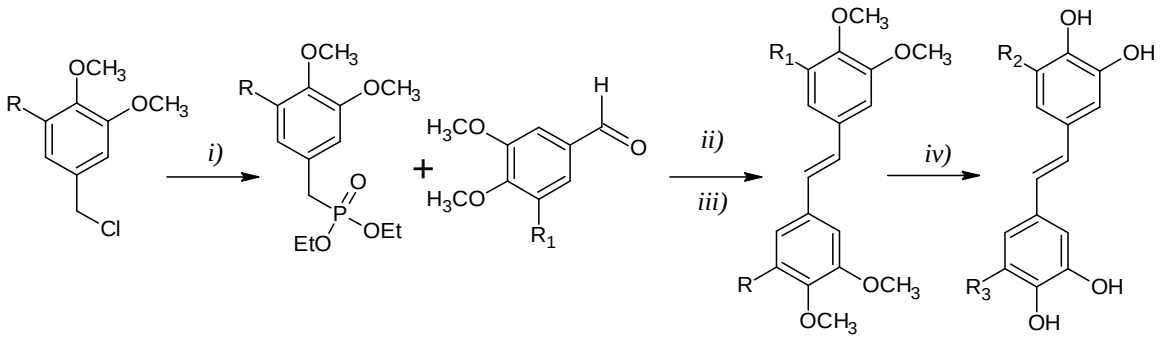
Rycina 3. Budowa chemiczna badanych stilbenów. Okręgiem na wzorach zaznaczono funkcyjne grupy hydroksylowe położone w wysoce reaktywnej pozycji –orto.

Wszystkie stilbeny przechowywano w formie stężonych roztworów, rozpuszczonych w DMSO, zamrożone w temperaturze -20 °C. Stężenia robocze badanych związków osiągnięto poprzez dodanie określonej objętości stężonego roztworu do medium hodowlanego. Doświadczenia pilotażowe przeprowadzone pod kątem oceny wpływu DMSO na żywotność i proliferację komórek nowotworowych wykazały, że przy zastosowanym rozcieńczeniu

DMSO w medium hodowlanym (<0,05%), związek ten nie wpływa w znaczący sposób na te parametry (nie zilustrowano graficznie). Podobny wynik, oznaczający brak wpływu DMSO, odnotowano w serii badań wstępnych każdego z parametrów, które zostały ocenione w niniejszej rozprawie.

3.2.1. Synteza związków badanych

Syntezę polihydroksystilbenów 3,3',4,4'-THS (**5a)** i 3,3',4,4',5,5'-HHS (**5b)** przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Muriasa i współpracowników [197]. Trójetapową syntezę przedstawia **rycina 4**. Pierwszy etap obejmował otrzymanie w reakcji Michaelis–Arbuzova z odpowiedniego chlorku benzylowego (chlorku 3,4-dimetoksybeznylowego (**1a)** i chlorku 3,4,5-trimetoksybeznylowego) i fosforynu trietylu ($P(OEt)_3$) uzyskując odpowiedni fosfonian (**2a)** lub (**2b)**. W następnym etapie fosfoniany w reakcji Horner–Wadsworth–Emmons (rolę zasady spełniał metanolan sodowy NaOMe, reakcja prowadzona była w środowisku N,N-dimetyloforamidu) z aldehydami (**3a)** (aldehyd 3,4-dimetoksybenzoesowy) i **3b** (aldehyd 3,4,5-trimetoksybenzoesowy) przekształcone zostały w polimetoksypochodne (**4a)** (3,3',4,4'-tetrametoksytilben) i **4b** (3,3',4,4',5,5'-heksametoksytilben). W ostatnim etapie syntezy produkty (**4a)** i **(4b)** poddano działaniu nadmiaru trójbromo boranu BBr_3 (temperatura pokojowa) w celu usunięcia metoksylowych grup zabezpieczających uzyskując planowane polihydoksypochodne stilbenu (**5a)** i (**5b)**.



(1a) R=H **(2a) R=H** **(3a) R_1=H** **(4a) R=R_1=H** **(5a) R=R_1=H**

(1b) R=OCH_3 **(2b) R=OCH_3** **(3b) R_1=OCH_3** **(4b) R=R_1=OCH_3** **(5b) R=R_1=OH**

Rycina 4. **Synteza pochodnych polihydroksystilbenu**. *i)* $P(OEt)_3$, 130°C, 24h; *ii)* NaOMe, DMF, temp. pok., 1 godz.; *iii)* NaOMe, DMF, 100°C, 1,5 godz.; *iv)* BBr_3, CH_2Cl_2, temp. pok., 2 godz.

3.2.2. Metodologia syntezy

Wszystkie reakcje prowadzono w osuszonym w temperaturze 140°C szkle laboratoryjnym i w atmosferze gazu obojętnego - azotu. Podane w opisach temperatury dotyczą temperatury łaźni, w których były zanurzone naczynia reakcyjne. Rozpuszczalniki były odparowywane w wyparce rotacyjnej w temperaturze poniżej 50 °C, pod zmniejszonym ciśnieniem. Komercyjnie dostępne rozpuszczalniki takie jak dichlorometan, octan etylu i etanol były oczyszczane przez destylację. Temperatury topnienia zmierzono w aparacie "Stuart" Bibby bez korekcji. Chromatografię cienkowarstwową (TLC) przeprowadzono z zastosowaniem płytek chromatograficznych z żelem krzemionkowym Merck Kieselgel 60 F_{254} i wizualizowano dzięki lampie UV (λ_{max} 254 lub 365 nm). Eksperymenty dotyczące spektrometrii mas (ESI – electrospray) przeprowadzono w Środowiskowym Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej na Wydziale Chemii, Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Eksperymenty spektroskopii NMR przeprowadzono z zastosowaniem aparatu Bruker 400 (Bruker, Coventry, UK). Przesunięcia chemiczne (δ) zostały wyrażone w ppm w stosunku do resztkowych sygnałów rozpuszczalników. Zastosowany skrót „s", oznacza singletowy sygnał protonu w widmie NMR.

3.2.2.1. Synteza (3,4-dimetoksybenzylo)fosfonianu dietylu (2a)

Chlorek 3,4-dimetoksybenzylu (2,57 g, 13,8 mmol) **(1a)** i fosforyn trietylu (2,64 ml, 15,2 mmol) umieszczono w kolbie okrągłodennej zakończonej rurką z bezwodnym chlorkiem wapnia i ogrzewano w temperaturze 130 °C przez 24 godziny. Następnie otrzymany produkt (3,4-dimetoksybenzylo)fosfonian dietylu (**2a)** wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej przez destylację pod zmniejszonym ciśnieniem jako przezroczysty olej (frakcja 200 - 201 ºC/7 Torr, lit. 189 - 190 °C/3 Torr) (2,12g, 53%). TLC R_f (EtOAc) 0.23. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 6,88-6,87 (m, 2H), 6,80-6,78 (m, 1H), 3,98-3,90 (m, 4H), 3,72 (s, 6H), 3,13 ($J_{H,P}$ = 22,1 Hz), 1,17 (t, J= 7,2 Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 148,8 ($J_{C,P}$ = 3.0 Hz), 148,0 ($J_{C,P}$ = 4,0 Hz), 124,8 ($J_{C,P}$ = 9,0 Hz), 122,3 ($J_{C,P}$ = 7,0 Hz), 114,0 ($J_{C,P}$ = 6,0 Hz), 112,2 ($J_{C,P}$ = 3,0 Hz), 66,7 ($J_{C,P}$ = 8,0 Hz), 55,9, 55,9, 32,1 ($J_{C,P}$ = 135.0 Hz), 16,7 ($J_{C,P}$ = 5,0 Hz). MS(ESI) m/z 288 $[M]^+$.

3.2.2.2. Synteza (3,4,5-trimetoksybenzylo)fosfonianu dietylu (2b)

Chlorek 3,4,5-trimetoksybenzylu (10,83g, 50 mmol) **(1b)** i fosforyn trietylu (9.5 ml, 55 mmoli) umieszczono w kolbie okrągłodennej zakończonej rurką z bezwodnym chlorkiem wapnia i ogrzewano w temperaturze 130°C przez 24h. Następnie otrzymany produkt (3,4,5-trimetoksybenzylo)fosfonian dietylu (**2b)** wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej przez destylację pod zmniejszonym ciśnieniem (frakcja 169-171°C /1 mm Hg, lit. 170°C [226]) uzyskując przezroczysty, lepki olej (12.73 g, 80%). TLC R_f (EtOAc)=0,54. MS(ES) m/z 318 $[M]^+$.

3.2.2.3. Synteza 3,3',4,4',-tetrametoksystilbenu (4a)

Związek (**2a)** (5,77 g, 20 mmol) i 20 ml suchego dimetyloformamidu umieszczono w okrągłodennej kolbce, oziębiono do temperatury 0 °C w atmosferze gazu obojętnego (azotu). Następnie do mieszaniny dodano metanolan sodowy (2,24g, 40 mmol) i 3,4,-dimetoksybenzaldehyd (3,32g, 20 mmol) **(3a).** Zawartość kolby była mieszana w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę, a następnie w 100 °C przez 1,5 godziny. Po oziębieniu do temperatury pokojowej mieszanina reakcyjna została wylana na 800 g, mieszaniny wody z lodem i pozostawiona na noc. Powstały osad odsączono i przekrystalizowano z 95% etanolu uzyskując 3,3',4,4'-tetrametoksystilben **(4b)** w formie białych kryształów (3,30 g, 55%). ^{1}H NMR (DMSO-d6) *δ:* 7,21 (d, *J*= 2,0 Hz, 2H), 7,08-705 (m, 4H), 6,93 (d, *J*=8,0 Hz, 2H), 3,82 (s, 6H), 3,76 (s, 6H). ^{13}C NMR (DMSO-d6) *δ:* 148,9, 148,4, 130,4, 126,3, 119,4, 111,8, 109,0, 55,46, 55,42. MS(ESI) m/z 300 $[M]^+$.

3.2.2.4. Synteza 3,3',4,4',5,5'-heksametoksystilbenu (4b)

Związek (**2b)** (9,55 g, 30 mmol) i 20 ml suchego DMF-u umieszczono w okrągłodennej kolbce, oziębiono do temperatury 0 °C w atmosferze gazu obojętnego (azotu). Następnie do mieszaniny dodano metanolan sodowy (3,36 g, 60 mmol) i 3,4,5-trimetoksybenzaldehyd (5,87 g, 30 mmol) **(3b)**. Zawartość kolby była mieszana w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę, a nastepnie w 100°C przez 1,5 godziny. Po oziębieniu do temperatury pokojowej mieszanina reakcyjna została wylana na 800 g mieszaniny wody z lodem i pozostawiona na noc. Powstały osad odsączono i przekrystalizowano z 95% etanolu uzyskując 3,3',4,4',5,5'-heksametoksystilben **(4b)** w formie białych kryształów (4,87 g, 45%). T.t. = 212-214°C (lit

215°C [197]). TLC R_f (EtOAc)= 0,88. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) *δ:* 6,94 (s, 2H), 6,74 (s, 4H), 3,92 (s, 12H), 3,87 (s, 6H). MS(ESI) m/z 360 $[M]^+$.

3.2.2.5. Synteza 3,3',4,4'-THS (5a)

W okrągłodennej kolbie umieszczono związek (**4a)** (1,50 g, 5 mmol) i rozpuszczono w 50 ml osuszonego CH_2Cl_2 w środowisku gazu obojętnego (azotu) i schłodzono tak uzyskaną mieszaninę do temperatury -30 °C za pomocą łaźni z suchym lodem. Następnie, utrzymując niką temperaturę powoli wkroplono 30 ml 1M roztworu trójbromku boru w dichlorometanie. Mieszaninę reakcyjną mieszano stopniowo podnosząc jej temperaturę do pokojowej i kontynuowano mieszanie jeszcze przez 2 godziny. Następnie reakcję przerwano przez powolne wkroplenie 30 ml wody destylowanej mieszając jeszcze przez 1 godzinę po zakończeniu wkraplania. Warstwę odseparowano w rozdzielaczu, a warstwę wodną ekstrahowano trzykrotnie za pomocą 50 ml octanu etylu. Następnie połączona pierwotną warstwę organiczną z ekstraktami octanowymi i osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezowym. Rozpuszczalniki organiczne usunięto przez destylacje pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując ciemnobrązowy osad który rekrystalizowano z 95% etanolu uzyskując 3,3',4,4',-tetrahydroksystilben (**5a)** ciemnobrązowe ciało stałe (0,50 g, 41%). T. t.= 226-228°C, TLC R_f (EtOAc)=0,73, MS(ESI) m/z 244 $[M]^+$.

3.2.2.6. Synteza 3,3',4,4',5,5'-HHS (5b)

W okrągłodennej kolbie umieszczono związek (**4b)** (1,80 g, 5 mmol) i rozpuszczono w 50 ml osuszonego CH_2Cl_2 w środowisku gazu obojętnego (azotu) i schłodzono tak uzyskaną mieszaninę do temperatury -30 °C za pomocą łaźni z suchym lodem. Następnie, utrzymując niską temperaturę powoli wkroplono 45 ml 1M roztworu trójbromku boru w dichlorometanie. Mieszaninę reakcyjną mieszano stopniowo podnosząc jej temperaturę do pokojowej i kontynuowano mieszanie jeszcze przez 2 godziny. Reakcję przerwano przez w powolne wkroplenie 30 ml wody destylowanej mieszając jeszcze przez 1 godzinę po zakończeniu wkraplania. Warstwę odseparowano w rozdzielaczu, a warstwę wodną ekstrahowano trzykrotnie 50 ml octanu etylu. Następnie połączono pierwotną warstwę organiczną z ekstraktami octanowymi i osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezowym. Następnie rozpuszczalniki organiczne usunięto przez destylacje pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując cimnobrązowy osad który rekrystalizowano z 95% etanolu uzyskując 3,3',4,4',5,5'-HHS (**5b),** brązowo-purpurowe ciało stałe (0,49g, 35%) T.t.=

268-271°C (lit. 270-272°C [227]). TLC R_f (EtOAc)=0,71 ^{1}H NMR (*d*6-DMSO) δ: 8,66 (s, 6H), 6,57 (s, 2H), 6,44 (s, 4H); MS(ESI) m/z 276 $[M]^+$.

3.2.3. Ocena stabilności związków badanych

Stabilność resweratrolu i jego pochodnych oceniana była metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), przy użyciu systemu Beckman (Beckman, High Wycombe, UK) wyposażonego w detektor UV-DAD (zestaw przy długości fali 307 nm dla resweratrolu, 312 nm dla 3,3',4,4'-THS i 327 nm dla 3,3',4,4',5,5'-HHS). Rozdział chromatograficzny resweratrolu i jego pochodnych przeprowadzono na kolumnie Hypersil BDS-C18 (5 μm, 250 "4,6 mm ID Astmoor, UK), poprzedzonej przedkolumną BDS-C18 Hypersil (5 μm, 10 '4.6 mm ID), przy przepływie 1 ml/min. W celu wymycia związków badanych faza ruchoma składała się z 5 mM octanu amonu/buforu kwasu octowego, pH 7,4 (faza ruchoma A) i metanolu (faza ruchoma B). Fazę ruchomą przesączono przez filtr 0,45 μm (HVLP04700, Millipore, Warszawa, Polska) [228].

3.2.4. Stężenia robocze substancji badanych oraz czasy ekspozycji

Badania cytotoksyczności związków badanych na podstawie ich wpływu na żywotność komórek nowotworowych przeprowadzono w szerokim zakresie stężeń, tj. od 0 do 500 μM. Na podstawie uzyskanych w tych testach wyników wyznaczono do dalszych badań trzy stężenia robocze stilbenów, tj. 10, 50 i 100 μM. Wszystkie doświadczenia prowadzono w systemie ostrym, obejmującym trzy punkty czasowe, tj. 24, 48 i 72 godziny.

3.3. Hodowle komórkowe

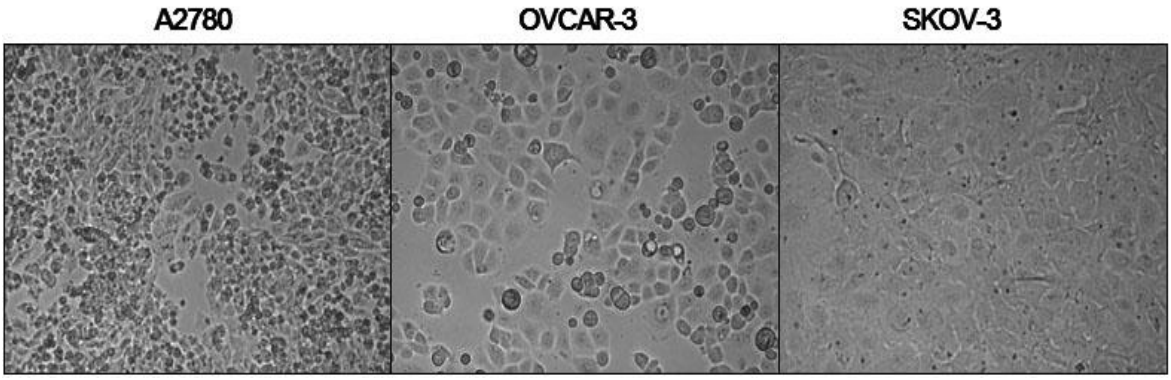
3.3.1. Komórki raka jajnika

Ludzkie komórki raka jajnika linii A2780 i SKOV-3 zostały zakupione w firmie European Collection of Cell Cultures (ECACC, Porton Down, UK) i utrzymywane w medium RPMI 1640 wzbogaconym w 10% płodową surowicę bydlęcą (FBS) (Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein, RFN), penicylinę (100 U/ml) i streptomycynę (100 g/ml). Komórki linii OVCAR-3 zostały zakupione w firmie American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) i hodowane w medium RPMI 1640 wzbogaconym w 10% FBS, L-glutaminę (2 mmol/L), HEPES (10 mmol/L), pirogronian sodu (1 mmol/L) i glukozę (4500 mg/L). Wszystkie typy komórek raka jajnika inkubowane były w butelkach hodowlanych o

powierzchni 75 cm^2, w temperaturze 37 °C, w środowisku nawilżanym o zawartości 5% CO_2. Co 3-4 dni dokonywano wymiany całości medium hodowlanego na świeże. W momencie osiągnięcia przez hodowle komórek nowotworowych 70-80% zlewności, hodowle pasażowano za pomocą roztworu trypsyny (0,05%) i EDTA (0,02%) rozpuszczonych w płynie Hanksa bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} (ang. *Hanks' Balanced Salt Solution*, HBSS), a następnie posiewano do nowych naczyń hodowlanych w gęstości $3x10^5$ komórek/cm^2.

Tabela 4. Specyfikacja komórek raka jajnika wykorzystanych do badań. b.d. – brak danych od depozytora komórek. Symbolem * oznaczono rozbieżne dane literaturowe dotyczące oporności i wrażliwości komórek raka jajnika na dany lek.

cecha	A2780	OVCAR-3	SKOV-3
płeć	K	K	K
wiek pacjentki	b.d.	60	64
typ nowotworu	gruczolakorak	gruczolakorak	gruczolakorak
źródło komórek	płyn puchlinowy	płyn puchlinowy	płyn puchlinowy
morfologia komórek	epitelialna	epitelialna	epitelialna
pacjentka leczona	nie	tak	b.d.
stosowany lek	-	cyklofosfamid, cisplatyna, doksorubicyna	b.d.
lekooporność komórek	doksorubicyna [229]	cisplatyna [230;231], doksorubicyna [231]	cisplatyna [232], doksorubicyna [233]
lekowrażliwość komórek	cisplatyna [234;235], doksorubicyna [236]*	cisplatyna [232]*, doksorubicyna [237]*	doksorubicyna [238]*
depozytor	TH Ward; Cell Culture Unit, Patterson Laboratories, Christie Hospital, Manchester, UK	R Ozols, TC Hamilton; Medicine Branch, Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA	G Trempe, LJ Old; Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA
rok pozyskania	1984	1982	1973
pierwsze doniesienia	[239]	[231]	[240;241]



Rycina 5. Obraz morfologii hodowli komórek raka jajnika. Komórki wykazują znaczące różnice w wielkości, tempie wzrostu oraz sposobie tworzenia kolonii. Najmniejszymi rozmiarami, a zarazem najwyższym tempem wzrostu cechują się komórk linii A2780. Komórki OVCAR-3, w przeciwieństwie do dwóch pozostałych typów komórek, przez najdłuższy okres pozostają w formie groniastych kolonii, które stopniowo łączą się ze sobą tworząc monowarstwę. Tempo ich wzrostu jest najniższe. Komórki SKOV-3, podobnie jak A2780 nie tworzą wyraźnych kolonii, a tempo ich wzrostu jest nieco wyższe niż komórek OVCAR-3 (powiększenie 200x).

3.3.2. Komórki mezotelium otrzewnowego

Ludzkie komórki mezotelium otrzewnowego (LKMO) izolowano z fragmentów sieci większej (*omentum maius*), usuwanych w trakcie zabiegów chirurgicznych ze wskazań lekarskich. Tkanki pobierano od pacjentów w wieku od 20 do 45 lat, którzy operowani byli z powodu obecności zrostów otrzewnej (40%), przepukliny (20%), tętniaka aorty (15%), niedrożności jelit (15%) i kamicy żółciowej (10%). Wśród dawców tkanek, 55% stanowili mężczyźni, a 45% kobiety. Na pozyskiwanie fragmentów sieci większej od operowanych osób, a następnie wykorzystywanie wyizolowanych z nich LKMO do celów naukowych uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (nr 612/12 z dnia 14 czerwca 2012 roku).

Po usunięciu tkanki z organizmu chorego, umieszczano ją bezzwłocznie w schłodzonym naczyniu wypełnionym 100 ml HBSS, które następnie transportowano do laboratorium. Izolacji i dalszej hodowli komórek dokonywano zgodnie z procedurą opisaną przez Van Bronswijka i wsp. [242]. LKMO izolowano poprzez enzymatyczne trawienie tkanki w roztworze trypsyny (0,05%) i EDTA (0,02%) w HBSS, przez 20 minut, w łaźni wodnej z wytrząsaniem, w temperaturze 37 °C. Uzyskane komórki, przepłukiwano medium hodowlanym M199 z dodatkiem 10% FBS, L-glutaminy (2 mM), penicyliny (100 U/ml),

streptomycyny (100 μg/ml) i hydrokortyzonu 50 μl (0,4 μg/ml). Następnie, komórki odwirowywano przez 5 minut przy szybkości 150 x *g*, zawieszano w medium hodowlanym i posiewano w butelkach hodowlanych o powierzchni 25 cm^2.

Komórki inkubowane były w temperaturze 37 °C w środowisku nawilżanym o zawartości 5% CO_2, co 3-4 dni wymieniając całość medium hodowlanego na nowe. Po uzyskaniu przez hodowlę fazy 80-90% zlewności, komórki przesiewano do naczyń o powierzchni 75 cm^2 celem ich namnożenia do dalszych eksperymentów.

LKMO identyfikowano na podstawie ich charakterystycznej morfologii w fazie zlewności (kształt „kostki brukowej" [243]), a także za pomocą reakcji immunocytochemicznej, potwierdzającej obecność antygenu HBME-1, specyficznego dla mikrokosmków błony komórkowej komórek mezotelialnych [244]. Do oceny obecności antygenu HBME-1 wykorzystano komórki utrwalone w roztworze formaldehydu (3%), które, po zablokowaniu aktywności endogennych peroksydaz za pomocą roztworu nadtlenku wodoru (0,3%), inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej wraz z mysim przeciwciałem monoklonalnym, skierowanym przeciwko antygenowi HBME-1 (Dako, Glostrup, Dania). Przeciwciało rozcieńczono 1:25 w roztworze Tris-HCl (0,05 M) pH 7,6 z dodatkiem 3% FBS. Po starannym odpłukaniu przeciwciała za pomocą HBSS, preparat poddano inkubacji z przeciwciałami wyznakowanymi peroksydazą chrzanową i skierowanymi przeciwko mysiej IgG (Dako EnVision™ system), przez 30 minut w temperaturze 37 °C. Po wypłukaniu drugiego przeciwciała, komórki inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej z roztworem 3,3'-diaminobenzydyny (DAB) (0,06 mM) i nadtlenku wodoru (2 mM), po czym zabezpieczono wodnym medium mocującym (Dako). Komórki wykazujące obecność antygenu HBME-1 rozpoznawano na podstawie ich powierzchniowego wybarwienia na kolor brązowy.

3.3.2.1. Wywoływanie replikacyjnego starzenia się LKMO *in vitro*

Po osiągnięciu przez hodowlę pierwotną stadium zlewności, komórki złuszczano za pomocą roztworu trypsyny (0,05%) i EDTA (0,02%), a następnie zawieszano w medium hodowlanym M199 z dodatkiem 10% FBS. Złuszczone komórki posiewano w naczyniach hodowlanych o powierzchni 25 cm^2 w gęstości $3x10^4$ komórek/cm^2. Starzenie LKMO indukowano poprzez poddawanie hodowli procedurze seryjnego pasażowania w odstępach tygodniowych, aż do momentu, gdy uzyskana liczba komórek nie była wystarczająca, by posiać je kolejny raz w wymaganej gęstości. Pomiędzy pasażami dokonywano jednokrotnej

wymiany medium hodowlanego [245]. Każdorazowo, w trakcie pasażowania, komórki liczono w komorze Bűrkera, celem wyznaczenia skumulowanej liczby podwojeń populacji (ang. *cumulative population doublings*; CPD). Wartości CPD określono posługując się wzorem: CPD = $\log_2 (C_t/C_0)$, w którym C_0 - liczba komórek na początku inkubacji, C_t - liczba komórek pod koniec inkubacji [245]. Jako replikacyjnie starą uznawano hodowlę, w której komórki wykazywały niezdolność do dalszych podziałów przez okres 4 tygodni oraz w której co najmniej 80% komórek cechowało się ekspresją β-galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA-β-Gal) [246].

W trakcie badań komórki poddawano równoległemu wpływowi resweratrolu, 3,3',4,4'-THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS, użytych w stężeniach 0,5 i 10 μM [166;247]. Jako „hodowle młode" uznawano te, eksponowane na stilbeny przez 14 dni (drugi pasaż komórek), natomiast jako „komórki stare", traktowano hodowle, które wyczerpały całkowicie swoje właściwości proliferacyjne. Przeciętnie, hodowle stare były poddawane działaniu związków badanych przez około 40 dni.

3.3.3. Komórki śródbłonka naczyniowego

Eksperymenty prowadzono na ludzkich komórkach śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC), zakupionych w firmie ATCC. Komórki inkubowane były w naczyniach hodowlanych powleczonych żelatyną, w medium M199 z dodatkiem 15% FBS, L-glutaminy (2 mM), HEPES (20 mM), EGF (10 μg/ml), heparyny, (5 U/ml), penicyliny (100 U/ml) i streptomycyny (100 μg/ml).

W celu uwrażliwienia komórek śródbłonkowych na medium kondycjonowane wygenerowane przez LKMO, hodowle HUVEC eksponowane były na właściwe dla komórek mezotelialnych medium M199 wzbogacone w 10 % FBS i antybiotyki, lecz bez dodatkowych suplementów, przez dwa tygodnie przed planowanym eksperymentem.

3.4. Ocena żywotności komórek nowotworowych

Badania żywotności komórek nowotworowych, będącej miarą cytotoksyczności związków badanych, wykonano z wykorzystaniem metody MTT. Doświadczenia przeprowadzono w 96-studzienkowych płytkach mikrotitracyjnych na komórkach wysianych w wysokiej gęstości $5x10^5$ komórek na studzienkę. Do czasu osiągnięcia przez hodowlę około 90% zlewności, komórki inkubowano w pełnym medium M199 z dodatkiem 10%

FBS. Następnie, komórki synchronizowano i uwrażliwiano na działanie związków badanych poprzez ich 24-godzinną inkubację w medium pozbawionym surowicy (SFM).

Po ekspozycji komórek nowotworowych na badane związki, komórki inkubowano ze świeżym SFM zawierającym roztwór MTT przez 4 godziny. Wytworzony formazan (produkt redukcji bromku 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolylo)-2,5-difenylotetra-zolowego) był następnie solubilizowany przez dodanie 20% roztworu soli sodowej siarczanu dodecylu (SDS) i 50% *N,N*-dimetyloformamidu. Pomiaru absorbancji dokonano przy użyciu czytnika płytek EL_X808^{TM} firmy Bio-Tek Ltd. (Winooski, USA), przy długości fali 690 nm.

Wartości półmaksymalnego stężenia hamującego (IC_{50}) wyznaczono na podstawie uzyskanych wyników żywotności komórek, z zastosowaniem programu CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, UK).

3.5. Ocena apoptozy komórek metodą cytometrii przepływowej

Istotą analizy było określenie wielkości frakcji komórek nowotworowych, cechujących się obecnością pofragmentowanego, niskocząsteczkowego DNA, będącego wykładnikiem śmierci apoptotycznej. Komórki apoptotyczne wykazują zmniejszoną barwliwość DNA po wyznakowaniu jodkiem propidyny (PI) i grupują się w histogramie jako dodatkowa subpopulacja, określana jako tzw. frakcja $subG_1$ [248].

W trakcie doświadczeń, komórki poddane działaniu badanych związków pasażowano z użyciem roztworu trypsyny (0,05%) i EDTA (0,02%), liczono, a następnie $1x10^6$ komórek zawieszono w roztworze PBS i utrwalano w lodowatym etanolu (70%). Następnie, komórki odwirowywano, ponownie płukano w roztworze PBS i zawieszono w roztworze cytrynianu sodu (0,1 M), pH 7,8 na 1 minutę. W kolejnym etapie komórki płukano w PBS, a następnie inkubowano przez 30 minut w roztworze PI (5 mg/ml) i rybonukleaz (0,1 mg/ml) w PBS. Pomiaru odsetka komórek będących w fazie $subG_1$ dokonano za pomocą cytometru przepływowego FACS Calibur™ zaopatrzonego w program Cell-Quest (Becton-Dickinson, Plymouth, UK).

3.6. Badania proliferacji komórek

3.6.1. Ocena proliferacji komórek nowotworowych metodą fluorescencyjną

Do oceny aktywności podziałowej komórek wykorzystano zestaw Cell Proliferation Kit I, zakupiony w firmie PromoKine (Heidelberg, RFN). Istotą analizy było wyznakowanie komórek barwnikiem fluorescencyjnym, estrem sukcynimidylowym dwuoctanu [5-(i -6)-

karboksyfluoresceiny) (CFDA SE), który po wejściu do komórek przyłącza się kowalencyjnie do wewnątrzkomórkowych białek, a rozkładany przez komórkowe esterazy przekształca się do produktu o właściwościach fluorescencyjnych. Ponieważ znacznik jest przekazywany komórkom potomnym, emitowana przez komórki fluorescencja jest wykorzystywana jako miara ich potencjału proliferacyjnego.

W toku doświadczeń, komórki posiewane były w semitransparentnych płytkach 96-studzienkowych, w gęstości $5x10^4$ komórek na studzienkę. Po upływie 24 godzin, komórki poddawano ekspozycji na badane stilbeny w ustalonych stężeniach, przez określony czas. Po inkubacji komórki były płukane za pomocą roztworu HBSS, a następnie inkubowane przez 15 minut z CFDA SE w stężeniu 2 μM, w temperaturz 37 ºC. Po inkubacji, preparaty ponownie płukano dwukrotnie roztworem HBSS. Odczytu fluorescencji dokonano za pomocą spektrofluorymetru Wallac Victor 2 (Perkin-Elmer), przy długości fali wzbudzenia 435 nm i emisji 535 nm.

3.6.2. Ocena dystrybucji w cyklu komórkowym metodą cytometrii przepływowej

Po ekspozycji komórek nowotworowych na związki badane, komórki złuszczano za pomocą roztworu trypsyny (0,05%) i EDTA (0,02%), liczono, a następnie $1x10^6$ komórek zawieszono w roztworze PBS i utrwalano w lodowatym etanolu (70%). Utrwalone komorki odwirowywano, płukano w PBS, a następnie zawieszano w roztworze cytrynianu sodu (0,1 M) pH 7,8 na 1 minutę. W dalszej kolejności, komórki ponownie płukano w PBS i inkubowano przez 30 minut w roztworze jodku propidyny (PI) (5 mg/ml) i rybonukleaz (0,1 mg/ml) w PBS. Analizy dystrybucji komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego dokonano za pomocą cytometru przepływowego FACS Calibur™ (Becton-Dickinson, Plymouth, UK) wyposażonego w program ModFit LT™ (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

3.6.3. Ocena proliferacji komórek śródbłonka naczyniowego metodą MTT

Badania proliferacji komórek śródbłonka naczyniowego metodą MTT przeprowadzono na hodowlach komórek HUVEC posianych w 96-studzienkowych naczyniach mikrotitracyjnych, w niskiej gęstości $1,5x10^3$ komórek na studzienkę. Po 24 godzinach inkubacji w pełnym medium wzrostowym, komórki synchronizowano przez 4 godziny w medium pozbawionym surowicy. Po tym czasie, komórki poddawano przez 48 godzin

działaniu medium kondycjonowanego, pochodzącego z hodowli młodych i starych LKMO eksponowanych na badane związki użyte w stężeniach 0,5 i 10 μM [166]. Po inkubacji komórki były starannie płukane i przeprowadzano test MTT [166]. Uzyskane wyniki normalizowano względem liczby komórek, które wygenerowały medium kondycjonowane [249]. Doświadczenia wstępne wykazały, że wyniki badania proliferacji uzyskane za pomocą testu MTT na hodowlach i niskiej gęstości są zgodne z wynikami pomiarów innymi metodami, w tym metodą fluorescencyjną z wykorzystaniem zestawu Cell Proliferation Kit I.

3.7. Ocena aktywności β-galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA-β-Gal)

Ilościowej oceny aktywności SA-β-Gal w komórkach nowotworowych dokonano metodą fluorescencyjną, z wykorzystaniem pomiaru tempa przemiany 4-metyloumbelliferylo-β-D-galaktopiranozydu (MUG) do fluorescencyjnego produktu, 4-metyloumbelliferonu (4-MU), w pH 6,0, według metodologii opisanej przez Gary i Kindell [250].

Po ekspozycji komórek nowotworowych na związki badane, hodowle pasażowano, komórki liczono celem przygotowania zawiesiny $2x10^5$ komórek. Komórki te następnie płukano ze pomocą PBS, odwirowywano, a uzyskaną peletę lizowano za pomocą buforu, w skład którego wchodziły: 3-[(3-cholamidopropylo)-dimetyloamonio]-propano-sulfonian (CHAPS) (5 mM), kwas cytrynowy (40 mM), fosforan sodu (40 mM), benzamidyna (0,5 mM) oraz fluorek fenylometylosulfonowy (PMSF) (0,25 mM), o pH 6,0. W kolejnym kroku, lizaty wirowano przy prędkości 12 000 x *g*, a uzyskany supernatant wykorzystywano w dalszej analizie. Próbkę supernatantu zmieszano z identyczną objętością buforu reakcyjnego, w skład którego wchodziły: kwas cytrynowy (40 mM), fosforan sodu (40 mM), chlorek sodu (300 mM), β-merkaptoetanol (10 mM), chlorek magnezu (4 mM) oraz MUG (1,7 mM), przy pH 6,0, i umieszczono w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C na dwie godziny, z łagodnym wytrząsaniem. Po tym czasie, reakcję zatrzymano przez dodanie węglanu sodu (400 mM). Wyemitowaną przez próbki fluorescencję oceniano przy długości fali wzbudzenia 360 nm i emisji 465 nm na spektrofluorymetrze Wallac Victor 2 (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA). Uzyskane wyniki normalizowano w przeliczeniu na 10^5 komórek badanych.

3.8. Ocena produkcji reaktywnych form tlenu (RFT)

Oznaczenia poziomu generowania RFT dokonano za pomocą metody fluorescencyjnej na komórkach wyznakowanych roztworem dwuoctanu 2',7'-dichlorodihydro-fluoresceiny (H_2DCFDA) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) [251]. Po ekspozycji na związki badane, komórki pasażowano i przygotowywano zawiesinę $1x10^5$ komórek. Po odpłukaniu medium za pomocą PBS komórki zawieszono w świeżym medium M199 bez surowicy, z dodatkiem H_2DCFDA (5 μM), a następnie inkubowano przez 45 minut w temperaturze 37 °C, lekko wytrząsając. Po inkubacji, komórki odwirowywano i lizowano z wykorzystaniem buforu lizującego (Promega, Madison WI, USA). Pomiaru fluorescencji dokonywano przy długości fali wzbudzenia 485 nm i emisji 535 nm, z użyciem spektrofluorymetru Wallac Victor 2 (Perkin-Elmer). Uzyskane wyniki normalizowano w przeliczeniu na 10^5 komórek badanych.

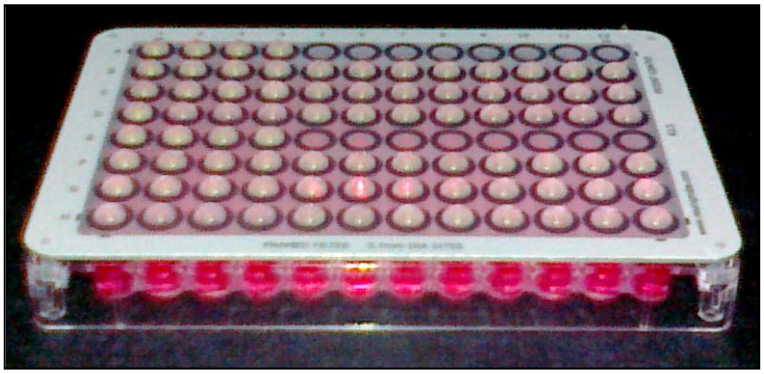
3.9. Ocena adhezji komórek nowotworowych

Istotą badania było określenie wpływu związków badanych na adhezję komórek raka jajnika do monowarstwy utworzonej przez LKMO. W tym celu, komórki nowotworowe poddane ekspozycji na stilbeny złuszczano za pomocą roztworu trypsyny (0,05%) i EDTA (0,02%), a następnie $4x10^4$ komórek zawieszano w HBSS i wyznakowywano kalceiną-AM (5 μM) przez 45 minut w 37 °C, mieszając. Po tym czasie, komórki odwirowywano, płukano HBSS celem usunięcia nadmiaru znacznika i zawieszano w standardowym medium bez surowicy. Tak przygotowywane komórki aplikowano w małej objętości medium (50 μl) do 96-studzienkowych płytek mikrotitracyjnych, w których uprzednio posiano i doprowadzono do stadium pełnej zlewności hodowle młodych LKMO. Po 45 minutach inkubacji w temperaturze 37 °C studzienki delikatnie wypłukano świeżym medium bez surowicy i dokonano pomiaru fluorescencji komórek przy długości fali wzbudzenia 485 nm i emisji 535 nm. Wydajność adhezji komórek wyliczono jako % fluorescencji komórek badanych względem fluorescencji emitowanej przez komórki kontrolne, z uwzględnieniem różnic w liczbie LKMO tworzących monowarstwę.

3.10. Ocena migracji komórek

3.10.1. Migracja komórek nowotworowych

Istotą pomiaru migracji komórek raka jajnika była ocena efektywności ich przechodzenia przez błonę poliwęglanową (średnica porów 8 μm) pod wpływem chemotaktycznego działania czynników zawartych w medium kondycjonowanym, wygenerowanym przez te komórki. Układ eksperyentalny obejmował komórki rakowe poddawane działaniu badanych związków oraz uzyskane od nich medium. Do badań wykorzystano zestawy płytkowe w formacie 96-studzienkowym ChemoTx firmy Neuro Probe (Gaithersburg, MD, USA).



Rycina 6. Płytkowy zestaw migracyjny ChemoTx, wykorzystywany do oceny migracji komórek nowotworowych. Zawiesina komórek raka jajnika jest naniesiona na membranę w formie kropli. W studzienkach znajduje się odpowiednia objętość medium kondycjonowanego z hodowli komórek nowotworowych traktowanych badanymi związkami.

Po ekspozycji komórek nowotworowych na badane związki, medium zawierające stilbeny odpłukano, a komórki poddano 48-godzinnej inkubacji z medium bez surowicy, celem pozyskania medium kondycjonowanego. Następnie, medium kondycjonowane naniesiono do studzienek jako czynnik chemotaktyczny, a na wierzchu płytki zamocowano membranę, składającą się z maski hydrofobowej, na którą naniesiono formując kroplę komórki nowotworowe wyznakowane uprzednio kalceiną-AM (5 μM, 45 minut w 37 °C). Migrację komórek poprzez błonę poliwęglanową oceniano w czasie 60 minut. Po upływie tego czasu, membranę odczepiano (usuwając tym samym komórki, które nie przemigrowały), a płytkę wstawiano do spektrofluorymetru Wallac Victor 2 celem pomiaru fluorescencji (długość fali wzbudzenia 485 nm i emisji 535 nm). Efektywność migracji komórek wyrażono jako % kontroli, tj. komórek nie poddawanych działaniu związków badanych.

3.10.2. Migracja komórek śródbłonka naczyniowego

Migracja komórek śródbłonkowych eksponowanych na stilbeny została oceniona za pomocą systemu komór inwazyjnych Transwell (Costar Inc., NY,USA), wyposażonych w membrany poliwęglanowe o średnicy porów 8 μm. Jako czynnik chemotaktyczny w tych badaniach wykorzystano próbki medium kondycjonowanego, zebranego z hodowli młodych i starych LKMO, które poddano wcześniej ekspozycji na badane stilbeny w stężeniach 0,5 i 10 μM [166].

Tworząc system migracyjny, komórki śródbłonka naczyniowego były posiewane w liczbie $2{,}5x10^4$, w medium bez surowicy do górnej komory zestawu, natomiast próbki medium kondycjonowanego dodawano do części dolnej. Ocenę migracji prowadzono w czasie 48 godzin, w temperaturze 37 °C. Komórki, które po upływie tego czasu nie przemigrowały usuwano z górnej komory za pomocą bibuły. Z kolei komórki, które przeszły z komory górnej do dolnej były utrwalane za pomocą roztworu 3,7% formaldehydu z dodatkiem 2% fioletu krystalicznego. Po wypłukaniu, liczba komórek, które przemigrowały była oceniana pod mikroskopem.

3.11. Zbiórka medium kondycjonowanego z komórek nowotworowych i LKMO

Na 48 godzin przed planowanym pasażem hodowli, komórki starannie płukano HBSS, a następnie podawano im 4 ml standardowego medium wzrostowego pozbawionego surowicy. W trakcie pasażu pobierano próbki medium (określanego dalej jako medium kondycjonowane), które przefiltrowywano za pomocą filtrów strzykawkowych o średnicy porów 0,2 μm. Do czasu wykorzystania, próbki medium kondycjonowanego były przechowywane w temperaturze –80 °C. W trakcie procedury pasażowania, dokładnie liczono komórki w komorze hematologicznej, aby uzyskać informację, jaka liczba komórek generowała rozpuszczalne czynniki obecne w próbce medium, w danym układzie eksperymentalnym.

3.12. Ocena produkcji mediatorów inwazyjności komórek nowotworowych

Stężenie kwasu hialuronowego (HA) w medium kondycjonowanym oraz stężenie integryn α5β1 w lizatach komórkowych oceniano za pomocą metody immunoenzymatycznej ELISA, z wykorzystaniem zestawów DuoSet Development Kit (R&D Systems). Badanie przeprowadzono w 96-studzienkowych płytkach mikrotitracyjnych typu MaxiSorp (Nunc),

które opłaszczano przeciwciałem „wychwytującym", zawieszonym w PBS na 24 godziny (lub agrekanem w przypadku oznaczenia kwasu hialuronowego), inkubując w temperaturze pokojowej. Następnie, płytki płukano trzykrotnie buforem płuczącym, tj. roztworem Tween 20 (0,05%) w PBS, po czym pozostałe miejsca wiążące blokowano roztworem Roti®-Block (10%) (Carl Roth, Karlsruhe, RFN) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej.

Tabela 5. Charakterystyka przeciwciał wykorzystanych w metodzie ELISA
***** W przypadku immunoenzymatycznego oznaczania stężenia kwasu hialuronowego, zamiast przeciwciał wychwytujących i detekcyjnych, zestaw analityczny wykorzystuje, odpowiednio, ludzki agrekan i biotynylowany ludzki agrekan.

czynnik badany	**I przeciwciało („wychwytujące")**		**II przeciwciało ("detekcyjne")**		krzywa wzorcowa w zakresie
	rodzaj	stężenie	rodzaj	stężenie	
integryny α5β1	mysie monoklonalne anty-integryny β1	2 μg/ml	kozie poliklonalne anty-α5	150 ng/ml	312,5-20000 pg/ml
kwas hialuronowy	ludzki agrekan*	0,5 μg/ml	biotynylowany ludzki agrekan*	400 ng/ml	1,406-90 ng/ml

Po trzykrotnym płukaniu studzienek, podawano do nich ustaloną objętość próbek oraz szereg rozcieńczeń wzorców o znanych stężeniach. Jako bufor rozcieńczający wykorzystano roztwór, w skład którego wchodziły albumina bydlęca (0,1%), Tween 20 (0,05%), NaCl (150 mM), Tris (20 mM) w PBS, o pH 7,3. Tak przygotowaną płytkę inkubowano 24 godziny w temperaturze 4 °C. Po tym czasie, studzienki płukano, a następnie aplikowano do nich przeciwciała biotynylowane (lub biotynylowany agrekan w przypadku oznaczeń kwasu hialuronowego), rozcieńczone w PBS. Po 2 godzinach inkubacji w temperaturze pokojowej i trzykrotnym płukaniu, płytkę inkubowano przez 30 minut z konjugatem streptawidyny i peroksydazy chrzanowej (HRP) (ICN Biochemicals, Cleveland, OH, USA), rozcieńczonym 1:10000 w buforze rozcieńczającym. Po kolejnym, trzykrotnym płukaniu, rozwijano reakcję barwną poprzez podanie stabilizowanego roztworu 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyny (TMB) i H_2O_2. Po 20 minutach przetrzymywania płytki w ciemności, reakcję zatrzymywano poprzez dodanie roztworu H_2SO_4 (2 N). Odczytu absorbancji dokonywano przy długości fali 450 nm

za pomocą czytnika płytek EL_X808^{TM} (BioTek, Winooski, VT, USA). Stężenia badanych substancji zostały automatycznie wygenerowane z krzywej wzorcowej.

3.13. Identyfikacja mediatorów angiogenezy

Celem określenia udziału określonych czynników angiogennych w proliferacji i migracji komórek śródbłonka naczyniowego pod wpływem medium kondycjonowanego z hodowli LKMO, próbki medium kondycjonowanego były preinkubowane przez 2 godziny w 37 °C ze specyficznymi przeciwciałami neutralizującymi, skierowanymi przeciwko takim czynnikom, jak: VEGF (5 μg/ml; AF-293-NA), GRO-1/CXCL1 (20 μg/ml; MAB275), MCP-1/CCL2 (10 μg/ml; AF-279-NA) i IL-8/CXCL8 (0,5 μg/ml, MAB208), przed podaniem ich na hodowle komórek śródbłonkowych. W każdej grupie doświadczalnej zastosowano także odpowiednie, zgodne izotypowo przeciwciało kontrolne. Stężenia przeciwciał wybrano na podstawie badań pilotażowych oraz danych literaturowych [163;252;253].

W niektórch eksperymentach, proliferacja i migracja komórek śródbłonka naczyniowego oceniana była także w obecności medium kondycjonowanego wzbogaconego w egzogenne rekombnowane formy ludzkich VEGF, GRO-1/CXCL1, MCP-1/CCL2 i IL-8/CXCL8, które zostały użyte w dawkach odpowiadających różnicy między stężeniem danego czynnika w medium kondycjonowanym z komórek kontrolnych (nie poddawanych ekspozycji na stilbeny) i medium kondycjonowanym z komórek poddanych działaniu resweratrolu.

3.14. Prezentacja wyników doświadczeń

Wyniki badań zilustrowano za pomocą tabel i wykresów. Ponieważ kluczowym dla projektu zagadnieniem było porównanie działania syntetycznych stilbenów, 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS z ich naturalnym prekursorem, resweratrolem, każdorazowo na pojedynczym wykresie ujęto efekt biologiczny wszystkich stilbenów, we wszystkich zastosowanych stężeniach, w jednym punkcie czasowym. Wyniki uzyskane w kolejnych punktach czasowych zobrazowano na kolejnych wykresach.

3.15. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników wykonano przy użyciu programu statystycznego GraphPad Prism™ 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) posługując się testem

analizy wariancji dla powtórzonych pomiarów oraz testem Newman-Keuls jako post-hoc. Różnice między dwoma grupami porównywano testem znakowanych rang Wilcoxona dla prób zależnych. W przypadkach, gdy liczebność grupy (n) była czynnikiem wykluczającym użycie testu Wilcoxona, średnie porównywano testem *t*-studenta. Krzywe przeżywalności komórek nowotworowych analizowano przy pomocy wieloczynnikowej analizy wariancji.

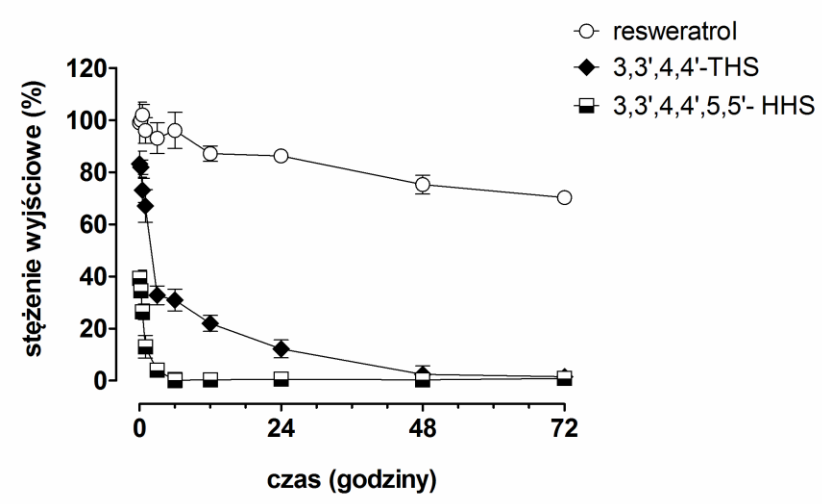
Wyniki doświadczeń przedstawiono jako wartości średnie ± standardowy błąd średniej (SEM). Za spełniające warunek istotności statystycznej przyjmowano różnice między grupami z wartością współczynnika $P<0,05$. Na rycinach obecność istotności statystycznej oznaczano za pomocą symboli * lub #.

4. WYNIKI

4.1. Stabilność chemiczna związków badanych

W rozprawie wykorzystano wyniki badań stabilności resweratrolu, 3,3',4,4'-THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS, które uzyskano metodą HPLC w trakcie realizacji wcześniejszego projektu badawczego [247]. Dane te wykorzystano ponownie, gdyż analiza była efektem pracy zespołowej, ukierunkowanej na potrzeby realizacji dwóch różnych rozpraw doktorskich, dotyczących działania tych samych związków, jednak w odniesieniu do innego typu komórek i zjawisk.

Stwierdzono, że spośród trzech badanych stilbenów, najwyższą stabilnością cechował się resweratrol, który po 72 godzinach inkubacji w temperaturze 37 °C ulegał rozkładowi tylko w około 30 ± 3%. Drugi z badanych stilbenów, 3,3',4,4'-THS, charakteryzował się wyższym tempem rozkładu, czego odzwierciedleniem była degradacja związku do 31 ± 4% wartości wyjściowej już w pierwszych 6 godzinach inkubacji. Po 72 godzinach, związek ten uległ rozkładowi w 99 ± 2%. Najwyższe tempo rozkładu cechowało 3,3',4,4',5,5'-HHS, który ulegał rozkładowi do 13 ± 4%, 0,2 ± 3% i 0,8 ± 0,7% stężenia początkowego po, odpowiednio, 1, 6 i 72 godzinach inkubacji (**Rycina 7**).



Rycina 7. Ocena stabilności badanych stilbenów w medium hodowlanym. Badania wykonano na próbkach medium hodowlanego, zawierającego określone stężenie resweratrolu, 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS. W każdym z punktów czasowych zbierano trzy próbki medium i poddawano je analizie chromatograficznej, ustalając stężenie związku, a następnie odnosząc wynik do stężenia wyjściowego. Dane wyrażono w procentach, przy czym jako 100% dla czasu t=0 wykorzystano roztwór metanolu.

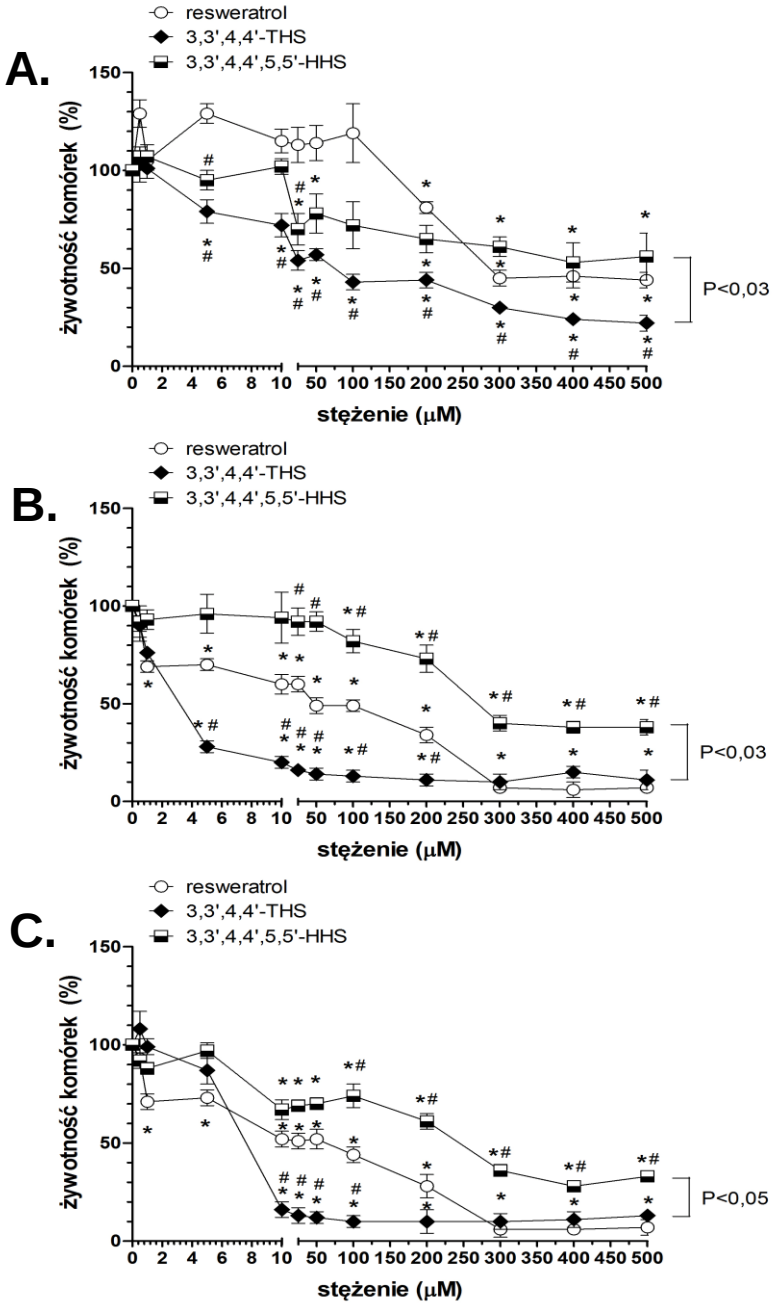
4.2. Wpływ stilbenów na żywotność komórek raka jajnika

4.2.1. Komórki A2780

Badania na komórkach A2780 poddawanych działaniu stilbenów wykazały, że po 24 godzinach ekspozycji najsilniejszym działaniem cytotoksycznym charakteryzuje się 3,3',4,4'-THS, w przypadku którego zahamowanie żywotności komórek odnotowano już przy stężeniu 5 μM (o 21 ± 6%). Resweratrol wywierał efekt dopiero przy stężeniu 200 μM (zahamowanie żywotności o 19 ± 7%), natomiast 3,3',4,4',5,5'-HHS przy stężeniu 25 μM (zahamowanie o 30 ± 8%). Począwszy od stężenia 5 μM efekty wywierane przez 3,3',4,4'-THS były istotnie silniejsze w porównaniu z resweratrolem oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS. Ten drugi analog wykazywał wyższą cytotoksyczność od resweratrolu w stężeniach 5 i 10 μM, natomiast przy wyższych stężeniach aktywność obu związków były podobna (**Rycina 8A**).

Ekspozycja komórek trwająca 48 godzin potwierdziła siłę działania 3,3',4,4'-THS, który ograniczał żywotność komórek nowotworowych jeszcze bardziej niż w pierwszej dobie. Przykładowo, zahamowanie żywotności komórek przy stężeniu 1 μM, które okazało się być pierwszym stężeniem hamującym, wynosiło 24 ± 2%, natomiast przy stężeniu 5 μM wartość ta wzrosła do 72 ± 3%. W tym punkcie czasowym wyższą cytotoksycznością cechował się również resweratrol, który hamował żywotność komórek już przy stężeniu 1 μM (o 31 ± 3%), a przy kolejnych stężeniach efekt ten się pogłębiał, zrównując się w zakresie stężeń 300-500 μM z efektami wywieranymi przez 3,3',4,4'-THS. Z kolei aktywność 3,3',4,4',5,5'-HHS po dwóch dobach ekspozycji okazała się zmniejszyć w porównaniu z eksperymentem 24-godzinnym. Jako pierwsze stężenie hamujące rozpoznano 100 μM (zahamowanie żywotności o 18 ± 6%), przy czym w przypadku każdego kolejnego stężenia efekty wywierane przez ten analog były słabsze niż resweratrolu oraz 3,3',4,4'-THS (**Rycina 8B**).

W wyniku ekspozycji komórek przedłużonej do 72 godzin, najefektywniej działającym związkiem był 3,3',4,4'-THS, przy czym jego cytotoksyczność wystąpiła przy stężeniu 5 μM (zahamowanie żywnotności o 13 ± 7%), a przy stężeniu 10 μM zahamowanie osiągnęło 86 ± 4%. W tym punkcie czasowym resweratrol wywierał działanie toksyczne przy niższych stężeniach, tj. przy 1 μM (zahamowanie o 29 ± 4%) i 5 μM (zahamowanie o 27 ± 4%). W zakresie stężeń 10-200 μM jego działanie było słabsze niż 3,3',4,4'-THS, natomiast przy wyższych stężeniach aktywność obu związków była podobna. Działanie 3,3',4,4',5,5'-HHS po 72 godzinach ekspozycji było słabsze w porównaniu z resweratrolem oraz 3,3',4,4'-THS (**Rycina 8C**).



Rycina 8. Krzywe przeżywalności komórek raka jajnika A2780 eksponowanych na resweratrol, 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS przez 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godziny. Wyniki pochodzą z badań na 6 odrębnych hodowlach. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu stilbenów (**grupa kontrolna**), których żywotność traktowano jako 100%. Symbolem # oznaczono różnice istotnie statystyczne w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol. Celem zachowania przejrzystości wykresu, znaczniki istotności wprowadzano nad lub pod odpowiednim punktem krzywej, poziomo lub pionowo, w zależności od dostępności pola. W przypadku punktów nakładających się, stosowano znacznik tylko dla jednego z nich.

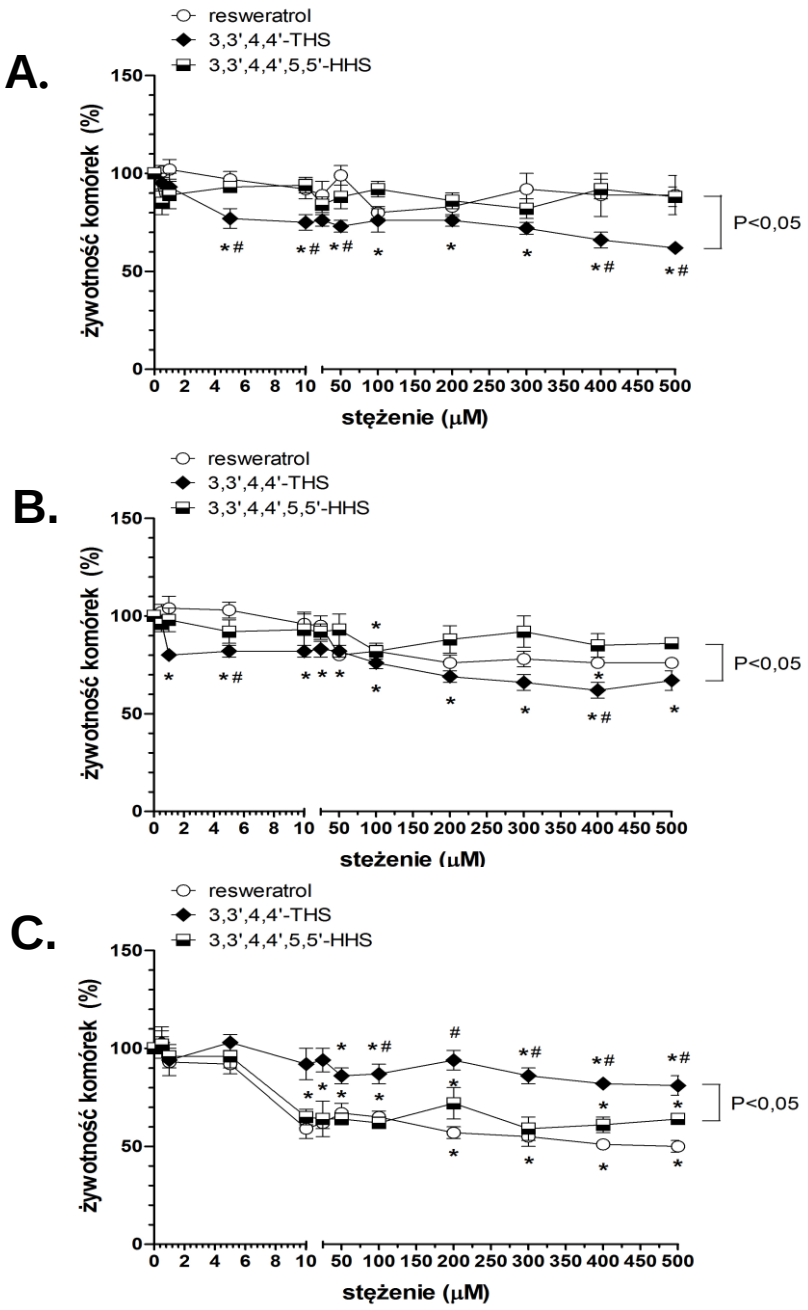
4.2.2. Komórki OVCAR-3

W odróżnieniu do komórek A2780, komórki raka jajnika OVCAR-3 cechowały się znacząco mniejszą wrażliwością na działanie stilbenów. Wykorzystując analogicznie szeroki zakres stężeń związków badanych, w żadnym z trzech punktów czasowych nie odnotowano zahamowania żywotności komórek przekraczającego 50%.

Stwierdzono, że w pierwszej dobie ekspozycji resweratrol hamuje żywotność komórek tylko w stężeniach 100 μM (o 20 ± 3%) i 200 μM (o 17 ± 3%). Z kolei 3,3',4,4'-THS wywierał działanie cytotoksyczne już od stężenia 5 μM (zahamownie o 23 ± 3%) i podobny stopień hamowania żywotności utrzymywał się w zakresie stężeń 10-300 μM. W najwyższych stężeniach, 3,3',4,4'-THS hamował żywotność komórek o 34 ± 4% (przy 400 μM) i 38 ± 1% (przy 500 μM). Przy stężeniach 5,10 i 50 μM, a także 400 i 500 μM działanie 3,3',4,4'-THS było istotnie silniejsze niż resweratrolu. 3,3',4,4',5,5'-HHS wywierał natomiast w całym zakresie stężeń efekty zbliżone do działania swego prekursora (**Rycina 9A**).

Po 48 godzinach ekspozycji, nadal najsilniejsze efekty wywierał 3,3',4,4'-THS, który już przy stężeniu 1 μM hamował żywotność komórek o 20 ± 2%. Najwyższą cytotoksyczność związek ten wykazywał przy stężeniu 400 μM, hamując żywotność komórek o 38 ± 4%. Przy stężeniach 5 μM i 400 μM efekty jego działania były istotnie silniejsze w porównaniu z resweratrolem. Resweratrol hamował żywotność komórek od stężenia 50 μM (o 20 ± 2%), a najsilniejszy efekt wywierał przy stężeniu 500 μM (zahamowanie o 24 ± 2%). Działanie 3,3',4,4',5,5'-HHS w tym punkcie czasowym było najsłabsze spośród trzech związków badanych. Największe zahamowanie żywotności komórek pod jego wpływem odnotowano przy stężeniu 100 μM (o 18 ± 2%) (**Rycina 9B**).

Ekspozycja komórek przedłużona do 72 godzin wykazała, że najwyższą cytotoksyczność względem komórek OVCAR-3 wykazuje resweratrol, który przy stężeniu 10 μM zahamował żywotność komórek o 41 ± 5%, a przy stężeniu 500 μM o 50 ± 5%. Jednocześnie stwierdzono osłabienie działania 3,3',4,4'-THS, który hamował żywotność komórek dopiero przy stężeniu 50 μM (o 14 ± 4%), a najsilniejszy efekt wywierał przy stężeniu 500 μM (zahamowanie o 19 ± 5%). Efektywność działania 3,3',4,4',5,5'-HHS była niższa niż resweratrolu, ale istotnie wyższa niż 3,3',4,4'-THS. Jako pierwsze stężenie hamujące zidentyfikowano 10 μM, przy którym żywotność komórek była obniżona o 35 ± 4%. Najsilniejsze zahamowanie żywotności komórek pod wpływem tego stilbenu zaobserwowano przy stężeniu 300 μM (o 41 ± 6%) (**Rycina 9C**).



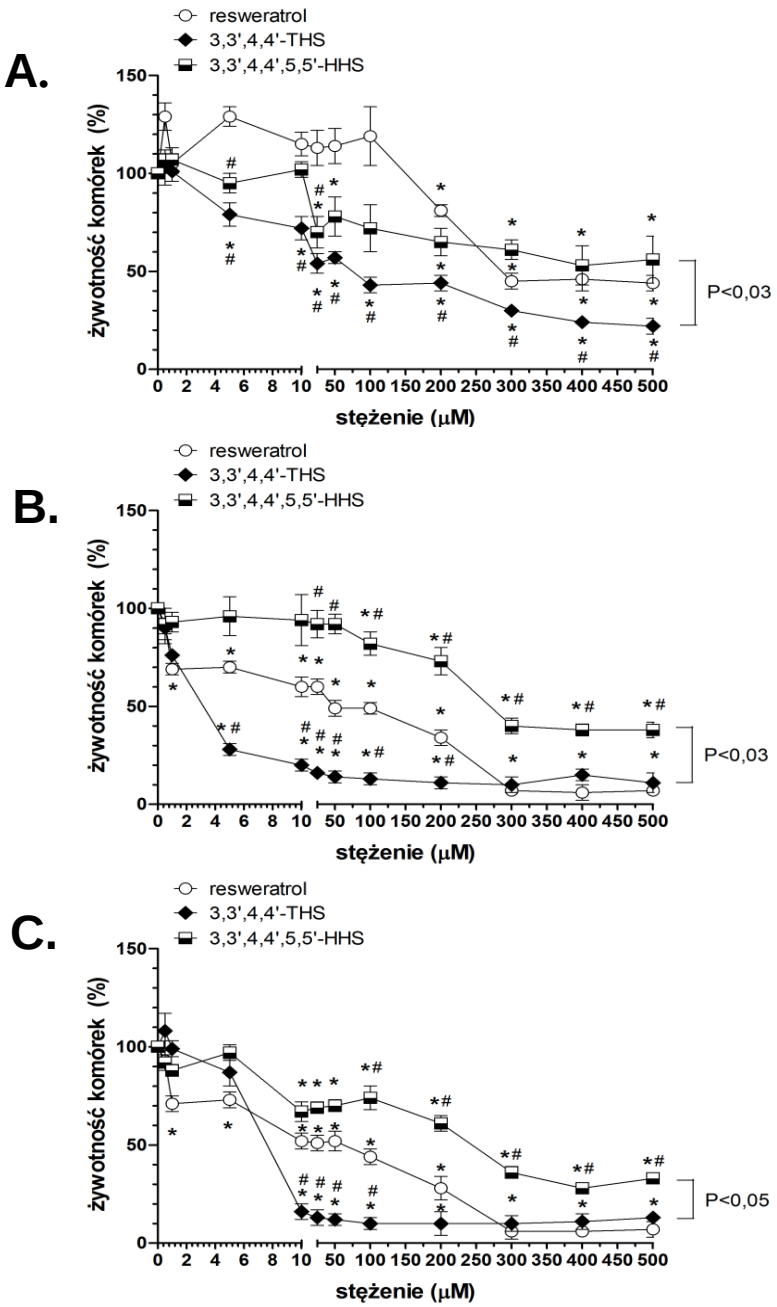
Rycina 9. Krzywe przeżywalności komórek raka jajnika OVCAR-3 eksponowanych na resweratrol, 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS przez 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godziny. Wyniki pochodzą z badań na 6 odrębnych hodowlach. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu stilbenów (**grupa kontrolna**), których żywotność traktowano jako 100%. Symbolem # oznaczono różnice istotnie statystyczne w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol. Celem zachowania przejrzystości wykresu, znaczniki istotności wprowadzano nad lub pod odpowiednim punktem krzywej, poziomo lub pionowo, w zależności od dostępności pola. W przypadku punktów nakładających się, stosowano znacznik tylko dla jednego z nich.

4.2.3. Komórki SKOV-3

W pierwszej dobie ekspozycji komórek raka jajnika SKOV-3 na badane związki najwyższą aktywnością charakteryzował się 3,3',4,4'-THS, który wykazywał działanie cytotoksyczne względem komórek nowotworowych począwszy od stężenia 10 μM (zahamowanie żywotności o 47 ± 4%). Także od tego stężenia, poprzez każde kolejne, efekty wywierane przez 3,3',4,4'-THS były znacząco silniejsze w porównaniu z resweratrolem oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS. Najwyższy stopień cytotoksyczności tego związku odnotowano przy stężeniu 400 μM, kiedy to zahamowanie żywotności komórek wyniosło 75 ± 3%). Resweratrol podawany na 24 godziny zahamował żywotność komórek SKOV-3 dopiero przy stężeniu 300 μM (zahamowanie o 23 ± 2%), przy czym kolejne, wyższe stężenia tego związku wywierały zbliżony efekt. Dobowa ekspozycja komórek na 3,3',4,4',5,5'-HHS przełożyła się z kolei na zahamowanie żywotności komórek o 18 ± 3% przy stężeniu 100 μM, natomiast przy wyższych dawkach tego związku obserwowane efekty były porównywalne z resweratrolem (**Rycina 10A**).

W badaniu przedłużonym do 48 godzin, jeszcze większy potencjał cytotoksyczny wykazywał 3,3',4,4'-THS, który już przy stężeniu 1 μM hamował żywotność komórek o 62 ± 6%. Z kolei resweratrol zainicjował działanie cytotoksyczne przy stężeniu 200 μM, hamując żywotność komórek o 45 ± 6%. W zakresie stężeń 200-500 μM, efektywność działania resweratrolu zrównała się z tą, charakteryzującą 3,3',4,4'-THS. Stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS wpływał na zahamowanie żywotności komórek tylko przy stężeniach 100 μM (18 ± 3%) i 200 μM (18 ± 5), a jego działanie było znacząco słabsze niż 3,3',4,4'-THS (**Rycina 10B**).

W trzeciej dobie eksperymentu, najniższym efektywnym stężeniem cytotoksycznym względem komórek nowotworowych cechował się 3,3',4,4'-THS, który przy wartości 1 μM ograniczał żywotność komórek o 34 ± 6%. Zarówno przy tym stężeniu, jak i przy stężeniach 5, 10 i 25 μM, efekty działania tego związku były istotnie silniejsze w porównaniu z resweratrolem i 3,3',4,4',5,5'-HHS. Z kolei przy wyższych stężeniach, a szczególnie od stężenia 200 μM, związkiem wywołującym najwyższą cytotoksyczność był resweratrol, który przy wartości 200 μM hamował żywotność komórek o 68 ± 2%. Ostatni ze związków, 3,3',4,4',5,5'-HHS hamował żywotność komórek nowotworowych począwszy od stężenia 100 μM (o 20 ± 3%), przy czym w zakresie stężeń 200-500 μM, wywierane przez niego efekty były porównywalne z działaniem 3,3',4,4'-THS, a zarazem znacząco niższe od tych, wywoływanych przez resweratrol (**Rycina 10C**).



Rycina 10. Krzywe przeżywalności komórek raka jajnika SKOV-3 eksponowanych na resweratrol, 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS przez 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godziny. Wyniki pochodzą z badań na 6 odrębnych hodowlach. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu stilbenów (**grupa kontrolna**), których żywotność traktowano jako 100%. Symbolem # oznaczono różnice istotnie statystyczne w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol. Celem zachowania przejrzystości wykresu, znaczniki istotności wprowadzano nad lub pododpowiednim punktem krzywej, poziomo lub pionowo, w zależności od dostępności pola. W przypadku punktów nakładających się, stosowano znacznik tylko dla jednego z nich.

4.3. Określenie wartości IC_{50} związków badanych

Wartości półmaksymalnego stężenia hamującego (IC_{50}) dla związków badanych wyznaczono na podstawie uzyskanych wyników oceny wpływu stilbenów na żywotność komórek nowotworowych, wykorzystując w tym celu programu CalcuSyn.

4.3.1. Komórki A2780

Przeprowadzona analiza wykazała, że w przypadku komórek raka jajnika A2780 najkorzystniejsze pod kątem działania przeciwnowotworowego, w rozumieniu - najniższe wartości IC_{50} uzyskano dla stilbenu 3,3',4,4'-THS, który okazał się być najefektywniejszy we wszystkich punktach czasowych. Drugim najefektywniejszym z perspektywy ustalonych wartości IC_{50} związkiem, także w trzech punktach czasowych, był resweratrol. Działanie stilbenu 3,3',4,4',5,5'-HHS pod kątem stężeń wywołujących śmierć połowy populacji komórek badanych okazało się być najsłabsze (**Tabela 6**).

Tabela 6. Wartości IC_{50} wyznaczone dla związków badanych, podawanych na komórki raka jajnika A2780, w czasie 24, 48 i 72 godzin.

A2780			
	24 godziny	**48 godzin**	**72 godziny**
resweratrol	272 μM	48 μM	64 μM
3,3',4,4'-THS	91 μM	3 μM	9 μM
3,3',4,4',5,5'-HHS	865 μM	280 μM	210 μM

4.3.2. Komórki OVCAR-3

W przypadku komórek OVCAR-3, w pierwszych dwóch dobach eksperymentu najniższymi wartościami IC_{50} ponownie cechował się 3,3',4,4'-THS, przy czym różnice między jego działaniem, a działaniem dwóch pozostałych związków nie była tak znacząca, jak w przypadku komórek raka jajnika A2780. Nieco mniejszą efektywnością od 3,3',4,4'-THS charakteryzował się resweratrol, a najsłabiej działał, tj. zastosowania najwyższych stężeń celem wywołania śmierci 50% komórek wymagał 3,3',4,4',5,5'-HHS. W ekspozycji przedłużonej do 72 godzin, najefektywniejszy stał się resweratrol, który pod kątem uzyskanych wartości IC_{50} działał silniej niż, kolejno, 3,3',4,4',5,5'-HHS i 3,3',4,4'-THS. Należy stwierdzić jednocześnie, że ustalone dla komórek raka jajnika OVCAR-3 wartości

IC_{50} były, w zależności od badanego związku i punktu czasowego, kilku, kilkunasto lub nawet kilkusetkrotnie wyższe w porównaniu z komórkami A2780 (**Tabela 7**).

Tabela 7. Wartości IC_{50} wyznaczone dla związków badanych, podawanych na komórki raka jajnika OVCAR-3, w czasie 24, 48 i 72 godzin.

OVCAR-3			
	24 godziny	**48 godzin**	**72 godziny**
resweratrol	2251 μM	1640 μM	480 μM
3,3',4,4'-THS	2010 μM	1210 μM	1600 μM
3,3',4,4',5,5'-HHS	2880 μM	2611 μM	610 μM

4.3.3. Komórki SKOV-3.

Analiza wyników uzyskanych dla komórek SKOV-3 wykazała, że w każdym z trzech punktów czasowych najsilniej działającym związkiem był 3,3',4,4'-THS, który wywoływał śmierć 50% komórek przy najniższych stężeniach. Drugim pod względem efektywności działania związkiem był resweratrol, natomiast najsłabsze działanie wykazywał w stosunku do tej linii komórek nowotworowych 3,3',4,4',5,5'-HHS (**Tabela 8**).

Tabela 8. Wartości IC_{50} wyznaczone dla związków badanych, podawanych na komórki raka jajnika SKOV-3, w czasie 24, 48 i 72 godzin.

SKOV-3			
	24 godziny	**48 godzin**	**72 godziny**
resweratrol	1460 μM	380 μM	71 μM
3,3',4,4'-THS	65 μM	8 μM	21 μM
3,3',4,4',5,5'-HHS	841 μM	940 μM	940 μM

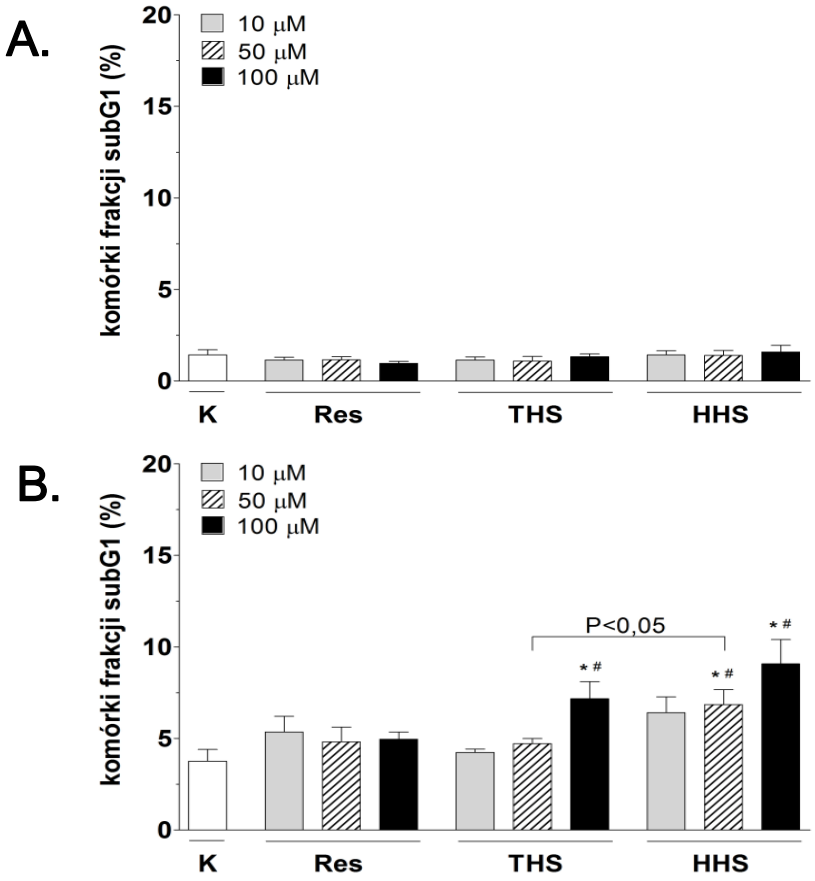
Na podstawie uzyskanych wyników badań cytotoksyczności stilbenów, do dalszych eksperymentów wyselekcjonowano trzy stężenia związków, tj. 10, 50 i 100 μM. Każdy z kolejnych parametrów oceniano także w analogicznych punktach czasowych, tj. po 24, 48 i 72 godzinach ekspozycji.

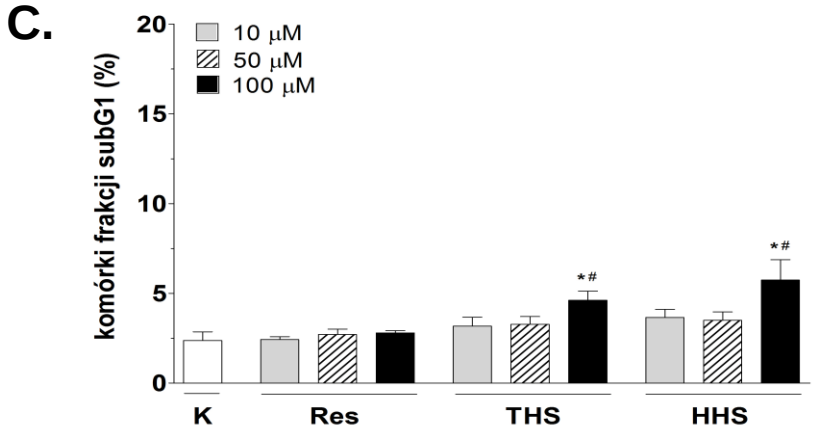
4.4. Wpływ stilbenów na apoptozę komórek raka jajnika

Badania wpływu stilbenów na częstość apoptotycznej śmierci komórek raka jajnika przeprowadzono metodą cytometrii przepływowej, po uprzednim wyznakowaniu komórek nowotworowych PI. Metoda ta dostarcza informacji na temat klasycznej apoptozy komórek, identyfikowanej na podstawie oligonukleosomalnej fragmentacji ich DNA oraz ich gromadzenia się na histogramie jako tzw. frakcja subG$_1$.

4.4.1. Komórki A2780

Przeprowadzone badania wykazały, że resweratrol nie wpływa na częstość apopotycznej śmierci komórek A2780, niezależnie od użytego stężenia oraz czasu ekspozycji. Z kolei 3,3',4,4'-THS zastosowany w stężeniu 100 μM indukował apoptozę po 48 i 72 godzinach inkubacji, co przekładało się na wzrost wielkości frakcji komórek w fazie subG$_1$ o, odpowiednio, 90 ± 4% i 94 ± 7%. Stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS nasilał apoptozę komórek po 48 godzinach inkubacji, przy stężeniach 50 i 100 μM (wzrost, odpowiednio, o 80 ± 6% i 141 ± 12%) oraz po 72 godzinach inkubacji, przy stężeniu 100 μM (wzrost o 140 ± 11%) (**Rycina 11**).





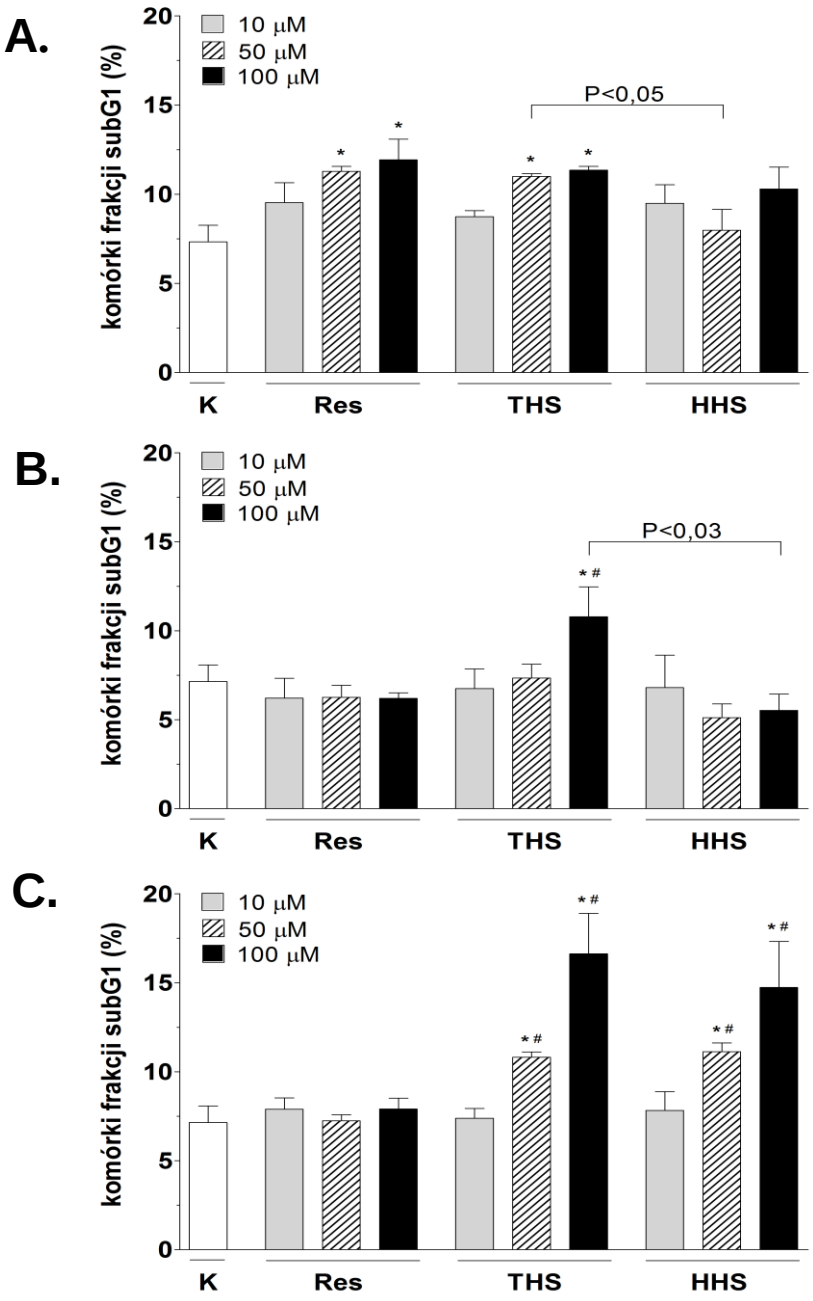
Rycina 11. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na wielkość frakcji apoptotycznych komórek raka jajnika A2780 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w 8 powtórzeniach. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.4.2. Komórki OVCAR-3

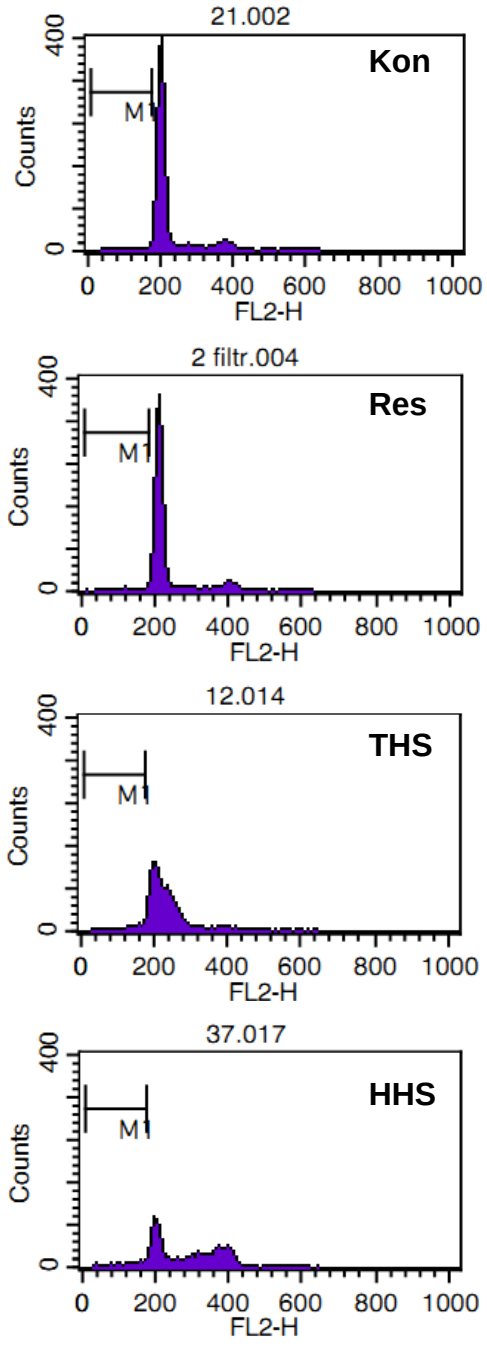
Komórki OVCAR-3 cechowały się wyższym wyjściowym odsetkiem komórek apoptotycznych niż hodowle A2780, a efekty wywierane przez stilbeny stwierdzano już po 24 godzinach ekspozycji. W tym punkcie czasowym aktywność proapoptotyczną wykazywał resweratrol, który zwiększał odsetek komórek frakcji $subG_1$ przy stężeniach 50 i 100 μM o, odpowiednio, 54 ± 6% i 63 ± 7%. Działanie na poziomie zbliżonym do resweratrolu wykazywał także 3,3',4,4'-THS, który przy stężeniu 50 μM zwiększał odsetek komórek frakcji $subG_1$ o 48 ± 9%, a przy stężeniu 100 μM o 57 ± 7%. Ostatni ze związków, 3,3',4,4',5,5'-HHS nie powodował natomiast w tym punkcie czasowym istotnych zmian wielkości frakcji komórek apoptotycznych (**Rycina 12A**).

W wyniku ekspozycji komórek przedłużonej do 48 godzin, działanie proapoptotyczne wykazywał jedynie 3,3',4,4'-THS, który zastosowany w stężeniu 100 μM zwiększał odsetek komórek frakcji $subG_1$ o 51 ± 3% (**Rycina 12B**).

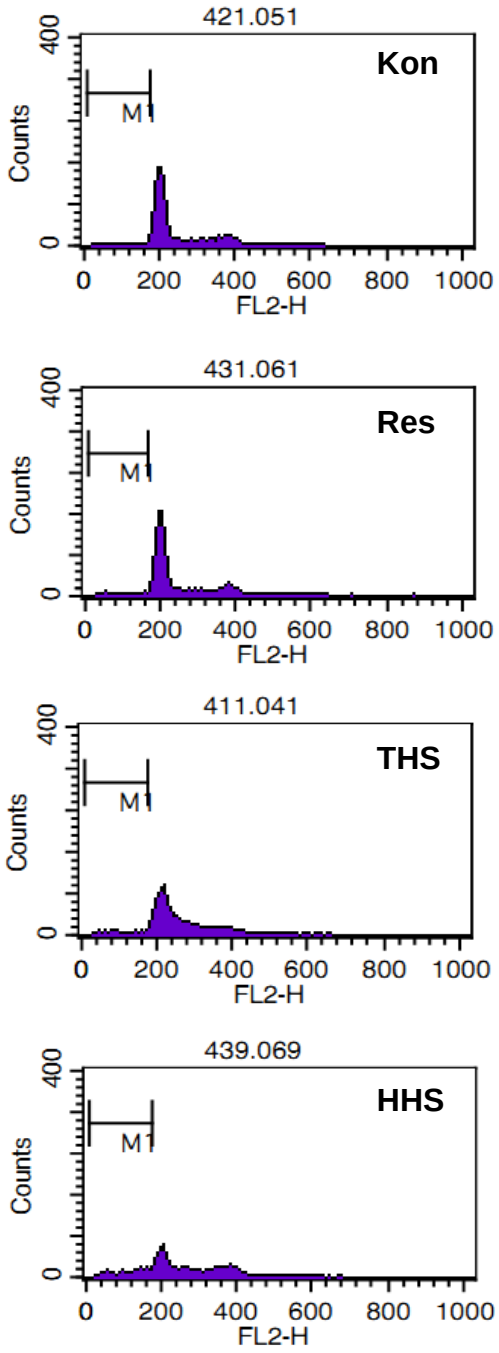
W ostatniej dobie eksperymentu, 3,3',4,4'-THS zastosowany w stężeniu 50 μM zwiększał odsetek komórek apoptotycznych o 52 ± 4%, a użyty w stężeniu 100 μM o 133 ± 8%. Zbliżone do niego działanie wykazywał także 3,3',4,4',5,5'-HHS, a efekty wywierane przez oba syntetyczne analogi były znacząco silniejsze w porównaniu z resweratrolem (**Rycina 12C**).



Rycina 12. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na wielkość frakcji apoptotycznych komórek raka jajnika OVCAR-3 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w 8 powtórzeniach. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.



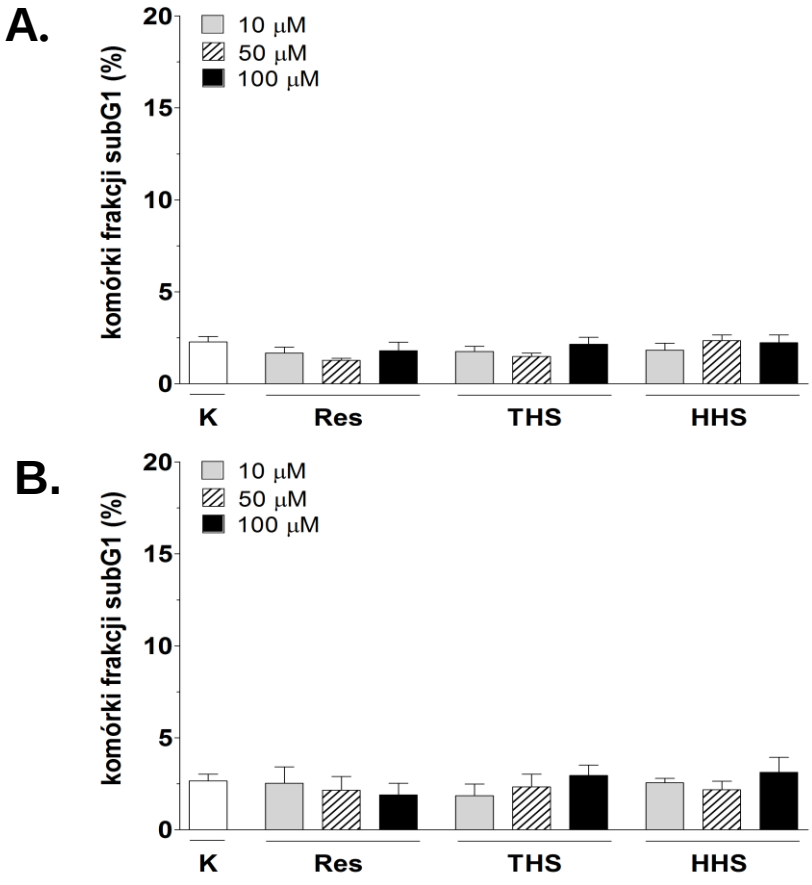
Rycina 13. Reprezentatywne histogramy uzyskane w trakcie analizy cytometrycznej, ilustrujące wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na wielkość frakcji subG$_1$ (bramkowanej jako M1) w hodowlach komórek raka jajnika A2780 eksponowanych na badane związki w stężeniu 100 μM przez 72 godziny. Wyniki uzyskane dla danego związku odnoszono w stosunku do komórek grupy kontrolnej (**Kon**), tj. komórek nie poddawanych działaniu stilbenów.

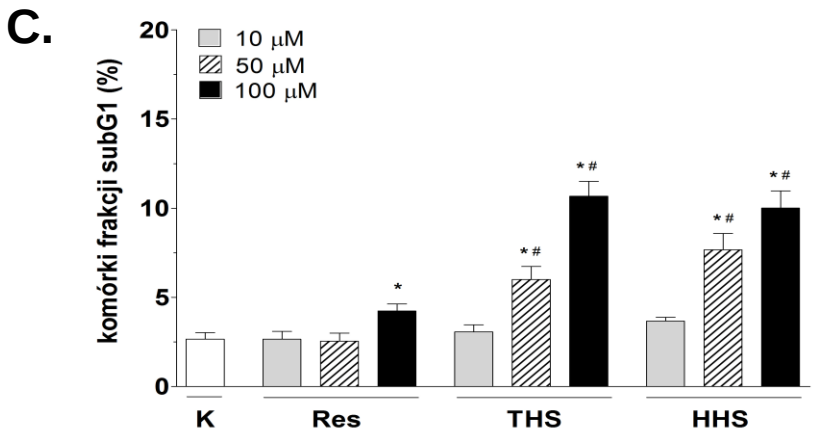


Rycina 14. Reprezentatywne histogramy uzyskane w trakcie analizy cytometrycznej, ilustrujące wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na wielkość frakcji subG$_1$ (bramkowanej jako M1) w hodowlach komórek raka jajnika OVCAR-3 eksponowanych na badane związki w stężeniu 100 μM przez 72 godziny. Wyniki uzyskane dla danego związku odnoszono w stosunku do komórek grupy kontrolnej (**Kon**), tj. komórek nie poddawanych działaniu stilbenów.

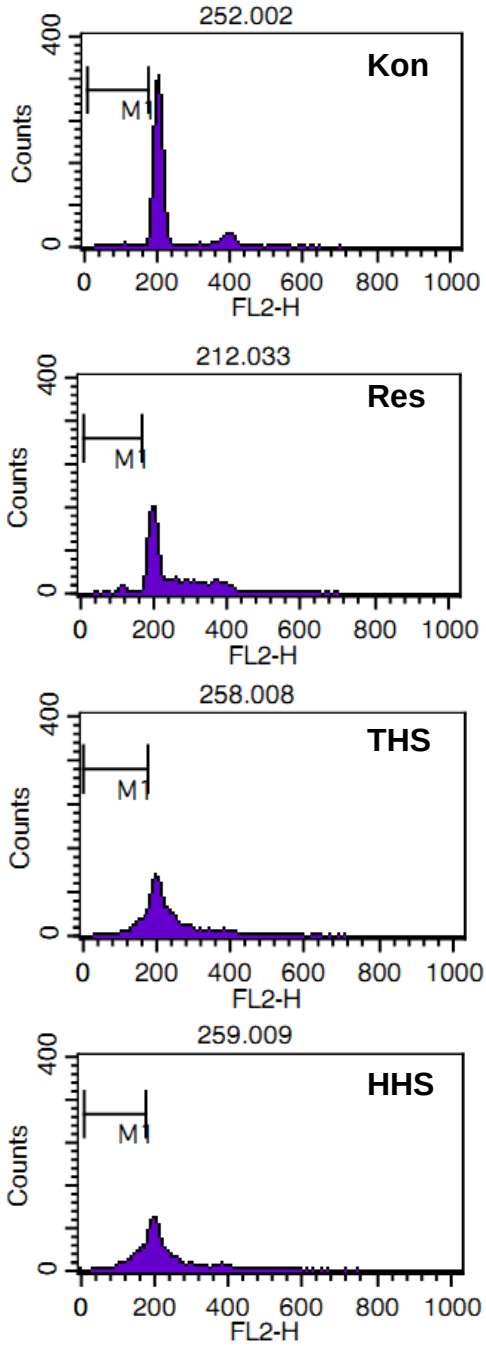
4.4.3. Komórki SKOV-3

Badania wpływu resweratrolu i jego syntetycznych pochodnych na apoptozę komórek raka jajnika linii SKOV-3 pokazały, że komórki te nie wykazują zmian wielkości frakcji komórek martwych ($subG_1$) w wyniku ekspozycji trwającej 24 i 48 godzin (**Rycina 15A i B**). Pierwsze oznaki wzrostu częstości występowania apoptozy odnotowano dopiero w trzeciej dobie eksperymentu, kiedy swoje działanie proapoptotyczne ujawnił każdy ze związków badanych. Resweratrol nasilał apoptozę wyłącznie przy stężeniu 100 μM, czego odzwierciedleniem był wzrost odsetka komórek frakcji $subG_1$ o 63 ± 3%. Istotnie silniejsze od resweratrolu działanie w tym punkcie czasowym wykazywały jednak jego dwa analogi. 3,3',4,4'-THS użyty w stężeniu 50 μM zwiększał frakcję komórek apoptotycznych o 130 ± 12%, a zastosowany w stężeniu 100 μM, o 307 ± 31%. Porównywalne w swej skali z 3,3',4,4'-THS efekty proapoptotyczne wywierał w trzeciej dobie eksperymentu także 3,3',4,4',5,5'-HHS, który przy stężeniu 50 μM zwiększał frakcję komórek apoptotycznych o 192 ± 18%, a zastosowany w stężeniu 100 μM o 284 ± 11% (**Rycina 15C**).





Rycina 15. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na wielkość frakcji apoptotycznych komórek raka jajnika SKOV-3 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w 8 powtórzeniach. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.



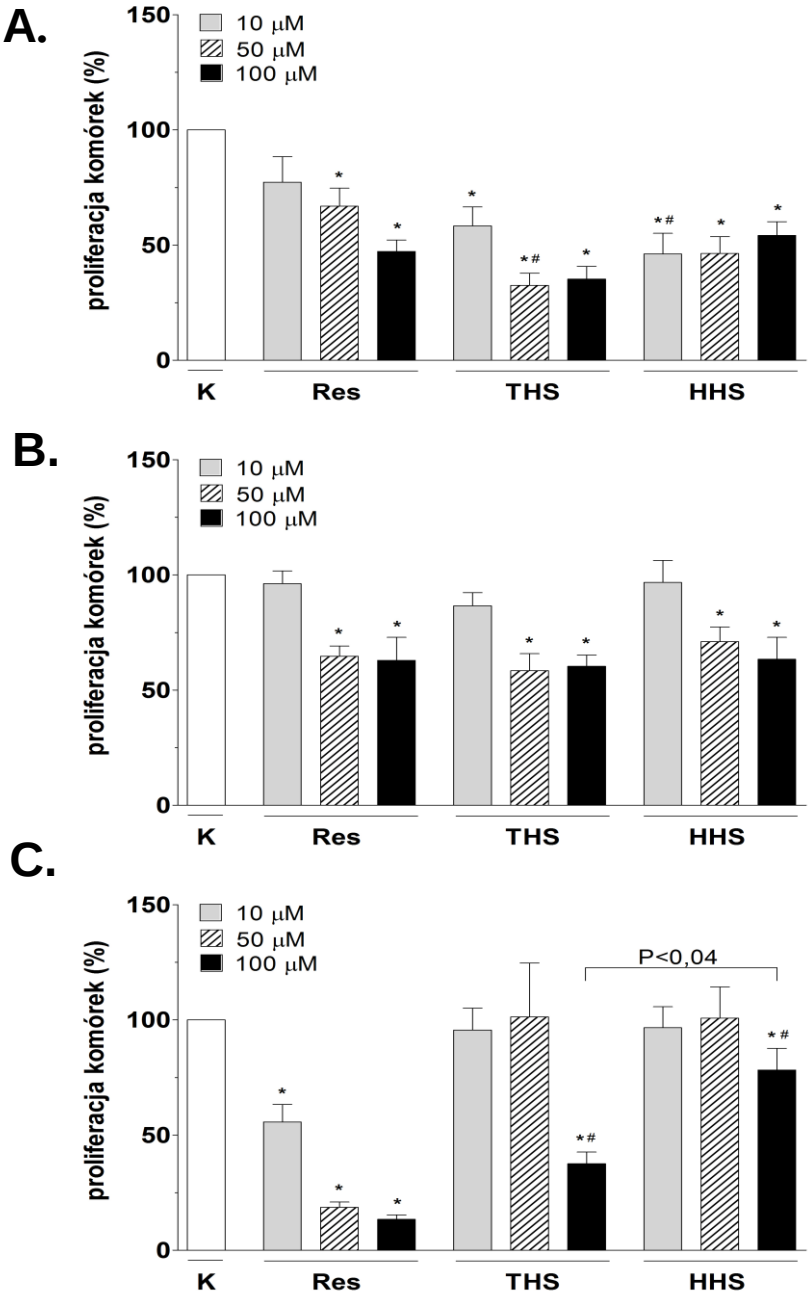
Rycina 16. Reprezentatywne histogramy uzyskane w trakcie analizy cytometrycznej, ilustrujące wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na wielkość frakcji subG$_1$ (bramkowanej jako M1) w hodowlach komórek raka jajnika SKOV-3 eksponowanych na badane związki w stężeniu 100 μM przez 72 godziny. Wyniki uzyskane dla danego związku odnoszono w stosunku do komórek grupy kontrolnej (**Kon**), tj. komórek nie poddawanych działaniu stilbenów.

4.5. Wpływ stilbenów na proliferację komórek raka jajnika
4.5.1. Komórki A2780

Badania przeprowadzone na komórkach raka jajnika A2780 wykazały, że po 24 godzinach ekspozycji komórek na resweratrol dochodzi do zahamowania ich proliferacji o 34 ± 8% przy stężeniu 50 μM i o 53 ± 5% przy stężeniu 100 μM. Silniejsze niż resweratrol działanie antyproliferacyjne wywierał jednak jego analog 3,3',4,4'-THS, który wykazywał efekty istotne statystycznie już przy stężeniu 10 μM, hamując potencjał podziałowy komórek o 42 ± 8%. Przy wyższych stężeniach, tj. 50 i 100 μM działanie tego związku wzrosło jeszcze bardziej, czego odzwierciedleniem było zahamowanie proliferacji odpowiednio o 68 ± 5% i 65 ± 5%. Stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS także hamował proliferację przy stężeniu 10 μM (o 54 ± 9%), a efekt ten był istotnie silniejszy w porównaniu z resweratrolem. Z kolei przy wyższych stężeniach, związek ten działał porównywalnie do resweratrolu, hamując proliferację o 54 ± 7% przy stężeniu 50 μM i o 46 ± 6% przy stężeniu 100 μM (**Rycina 17A**).

W wyniku przedłużenia ekspozycji komórek do 48 godzin, działanie antyproliferacyjne resweratrolu nie uległo wzmocnieniu i występowało w tym samym zakresie stężeń. Związek użyty w dawce 50 μM hamował proliferację komórek o 36 ± 4%, a przy stężeniu 100 μM o 38 ± 10%. Wyraźnemu osłabieniu natomiast uległo działanie 3,3',4,4'-THS, który hamował proliferację już tylko przy stężeniach 50 i 100 μM, a efekty te były mniejsze niż po pierwszej dobie ekspozycji (hamowanie proliferacji o, odpowiednio, 42 ± 7% i 40 ± 5%). Analogiczne osłabienie reakcji komórek zaobserwowano w przypadku 3,3',4,4',5,5'-HHS, który wykazywał aktywność antyproliferacyjną tylko przy stężeniach 50 i 100 μM. Przy zastosowaniu pierwszego z nich hamował proliferację komórek o 29 ± 7%, a przy drugim stężeniu o 37 ± 10% (**Rycina 17B**).

Po 72 godzinach ekspozycji na związki badane, wzmocnieniu uległo antyproliferacyjne działanie resweratrolu, który wykazywał aktywność już przy stężeniu 10 μM (hamowanie o 45 ± 8%). Przy kolejnych, wyższych stężeniach, resweratrol hamował proliferację komórek o 82 ± 2% (50 μM) i o 87 ± 2% (100 μM). Jednocześnie, dalsze osłabienie efektu antyproliferacyjnego dało się zauważyć w przypadku 3,3',4,4'-THS, który był efektywny już tylko przy stężeniu 100 μM (hamowanie o 63 ± 5%), a działanie to było już istotnie słabsze niż jego naturalnego prekursora. Zbliżony efekt odnotowano dla 3,3',4,4',5,5'-HHS, który działając antyproliferacyjnie tylko w stężeniu 100 μM hamował proliferację komórek o 22 ± 9%, działając zarazem istotnie słabiej niż 3,3',4,4'-THS (**Rycina 17C**).



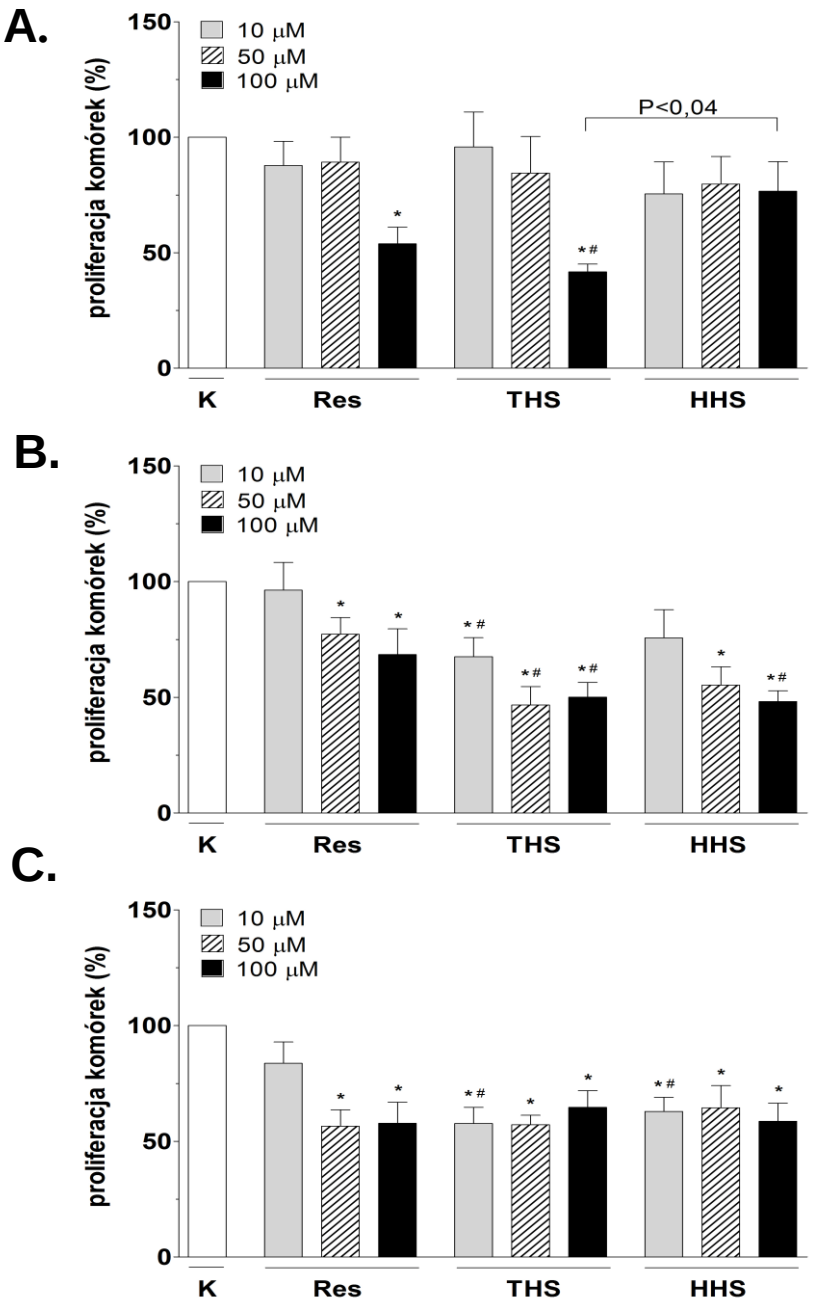
Rycina 17. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na proliferację komórek raka jajnika A2780 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 8 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.5.2. Komórki OVCAR-3

Badanie proliferacji komórek raka jajnika OVCAR-3 przeprowadzone po 24 godzinach ekspozycji na stilbeny wykazało, że zarówno resweratrol, jak i 3,3',4,4'-THS hamują efektywność podziałów komórkowych przy najwyższym z użytych stężeń, tj. przy 100 μM, odpowiednio o 47 ± 7% i 59 ± 3%. Działanie 3,3',4,4'-THS było istotnie statystycznie silniejsze w porównaniu z resweratrolem. W tym punkcie czasowym, 3,3',4,4',5,5'-HHS nie wywierał działania antyproliferacyjnego w żadnym z zastosowanych stężeń (**Rycina 18A**).

W wyniku przedłużenia ekspozycji komórek na stilbeny do 48 godzin nastąpiło wzmocnienie działania antyproliferacyjnego wszystkich trzech związków. W przypadku resweratrolu, efekt nastąpił już przy stężeniu 50 μM i polegał na zahamowaniu proliferacji komórek o 23 ± 7%. Przy stężeniu 100 μM proliferacja obniżyła się natomiast o 32 ± 11%. W przypadku 3,3',4,4'-THS, związek ten działał antyproliferacyjnie przy każdym z zastosowanych stężeń. Przy stężeniu 10 μM proliferacja komórek została zahamowana o 33 ± 8%, przy stężeniu 50 μM o 54 ± 8%, a przy stężeniu 100 μM o 50 ± 6%. W każdym przypadku efekt wywierany przez ten związek był istotnie statystycznie silniejszy w porównaniu z resweratrolem. W tym punkcie czasowym, 3,3',4,4',5,5'-HHS działał antyproliferacyjnie przy stężeniach 50 i 100 μM (hamowanie, odpowiednio, o 45 ± 8% i 52 ± 5%). W odniesieniu do wyższego ze stężeń, obserwowany efekt był silniejszy niż resweratrolu, a zarazem porównywalny z działaniem 3,3',4,4'-THS (**Rycina 18B**).

Po 72 godzinach ekspozycji, podobnie jak w przypadku komórek A2780, dalszemu wzmocnieniu uległo działanie resweratrolu, który przy stężeniu 50 μM hamował potencjał podziałowy komórek o 44 ± 7%, a przy stężeniu 100 μM o 42 ± 9%. Z kolei 3,3',4,4'-THS działał antyproliferacyjnie już przy stężeniu 10 μM, kiedy to hamując proliferację komórek o 43 ± 7% wywierał działanie istotnie silniejsze w porównaniu z resweratrolem. Przy zastosowaniu stężeń 50 i 100 μM związek ten ograniczał proliferację komórek OVACR-3 o 43 ± 4 % i 36 ± 7%, a skala tego działania była porównywalna z działaniem resweratrolu. Stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS wykazywał działanie antyproliferacyjne w całym zakresie stężeń, przy czym w najniższym z nich, hamując proliferację o 38 ± 6% działał efektywniej od resweratrolu. Przy zastosowaniu stężeń 50 i 100 μM, związek ten wywierał działanie porównywalne z 3,3',4,4'-THS, hamując potencjał proliferacyjny komórek nowotworowych o, odpowiednio, 36 ± 10% i 42 ± 8% (**Rycina 18C**).



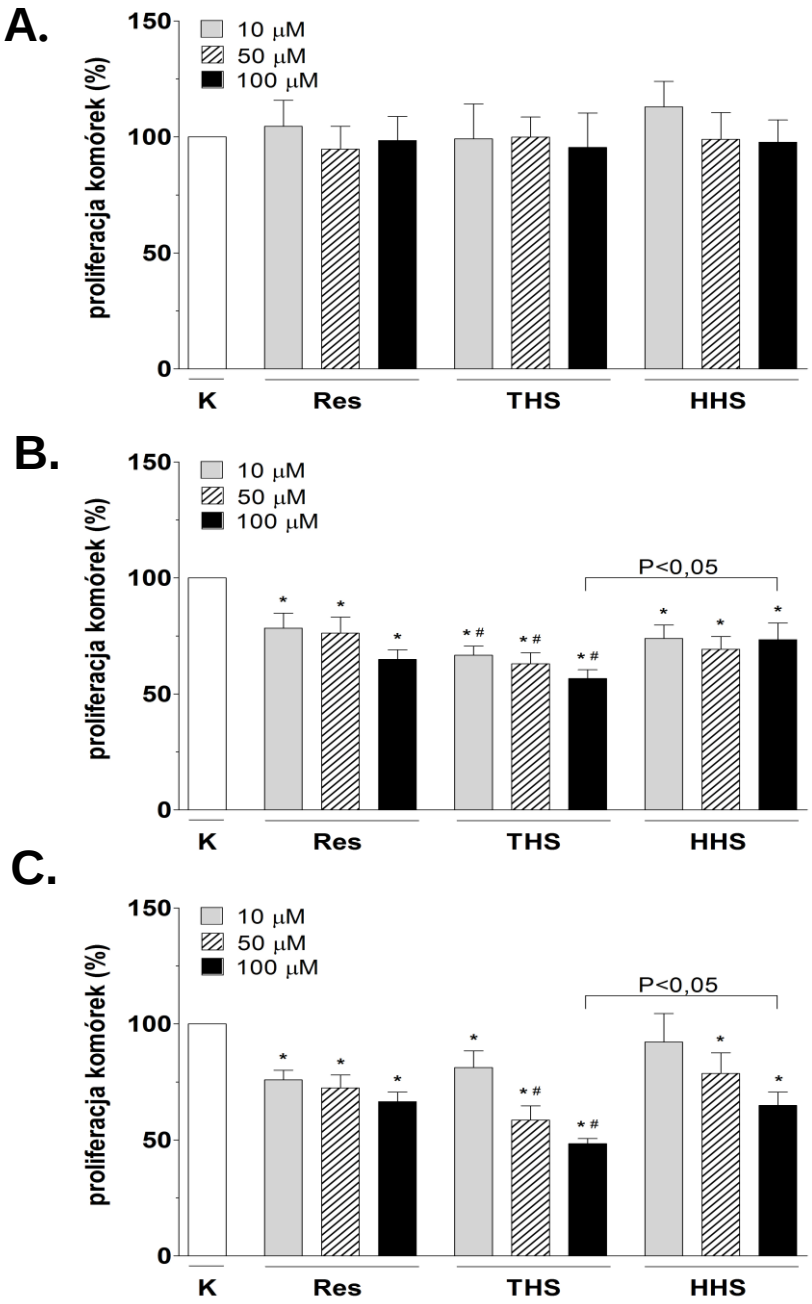
Rycina 18. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na wielkość proliferację komórek raka jajnika OVCAR-3 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 8 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.5.3. Komórki SKOV-3

W odniesieniu do trzeciego z badanych typów komórek raka jajnika, SKOV-3, nie odnotowano zmian proliferacji komórek eksponowanych na badane związki w trakcie 24-godzinnej inkubacji (**Rycina 19A**).

W wyniku ekspozycji przedłużonej do 48 godzin, resweratrol wykazywał aktywność przy wszystkich trzech użytych stężeniach, hamując proliferację komórek o 22 ± 6% przy stężeniu 10 μM, o 24 ± 7% przy stężeniu 50 μM oraz o 36 ± 4% przy stężeniu 100 μM. Z kolei stilben 3,3',4,4'-THS wykazywał działanie silniejsze od resweratrolu przy każdym z zastosowanych stężeń, hamując proliferację komórek SKOV-3 o 34 ± 4% przy stężeniu 10 μM, o 38 ± 5% przy stężeniu 50 μM i o 44 ± 4% przy stężeniu 100 μM. Jego działanie przy użyciu najwyższego ze stężeń było także istotnie statystycznie silniejsze w porównaniu z 3,3',4,4',5,5'-HHS. Efekty działania tego drugiego syntetycznego analogu były w swej skali zbliżone do resweratrolu, co potwierdziło zahamowanie proliferacji komórek o 27 ± 6% przy stężeniu 10 μM, o 31 ± 5% przy stężeniu 50 μM i o 27 ± 7% przy stężeniu 100 μM (**Rycina 19B**).

Po 72 godzinach ekspozycji efekty wywierane przez resweratrol okazały się być bardzo podobne do tych, odnotowanych w drugiej dobie eksperymentu. Ponownie najsilniejszy efekt zaobserwowano w komórkach poddawanych działaniu związku w stężeniu 100 μM, w którym to przypadku proliferacja komórek uległa zahamowaniu o 34 ± 4%. Stilben 3,3',4,4'-THS zastosowany w najniższym ze stężeń, w przeciwieństwie do poprzedniego punktu czasowego, hamował proliferację komórek w sposób porównywalny do resweratrolu (o 19 ± 7%). Jednocześnie, związek ten zastosowany w stężeniach 50 i 100 μM wywierał działanie silniejsze niż resweratrol, hamując proliferację komórek SKOV-3 o 42 ± 6% przy stężeniu 50 μM i o 52 ± 2% przy stężeniu 100 μM. Przy najwyższym ze stężeń, 3,3',4,4'-THS wywierał silniejsze działanie antyproliferacyjne względem komórek nowotworowych niż 3,3',4,4',5,5'-HHS. Ten drugi analog hamował proliferację tylko przy stężeniach 50 i 100 μM, przy czym wywierane przez niego efekty były zbliżone do resweratrolu (hamowanie proliferacji o 22 ± 9% przy stężeniu 50 μM i o 36 ± 6% przy stężeniu 100 μM) (**Rycina 19C**).



Rycina 19. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na wielkość proliferację komórek raka jajnika SKOV-3 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 8 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.6. Wpływ stilbenów na dystrybucję komórek raka jajnika w cyklu podziałowym

Celem potwierdzenia wyników oceny proliferacji komórek, uzyskanych metodą fluorescencyjną przeprowadzono analogiczne doświadczenia, w przebiegu których komórki raka jajnika eksponowane na trzy stilbeny były analizowane cytometrycznie, po uprzednim ich wyznakowaniu PI. Następnie za pomocą oprogramowania ModFit LT™ określano dystrybucję komórek w poszczególnych fazach cyklu mitotycznego, zwracając szczególną uwagę na odsetek komórek w fazie S, odzwierciedlający frakcję komórek aktywnie replikujących swoje DNA. Także analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono pod kątem różnic w wielkości frakcji komórek w fazie S cyklu. Ze względu na tabelaryczne wyrażenie wyników analizy w formie procentów (%), w tekście pracy posłużono się tylko fenomenologicznym opisem zaobserwowanych zmian.

4.6.1. Komórki A2780

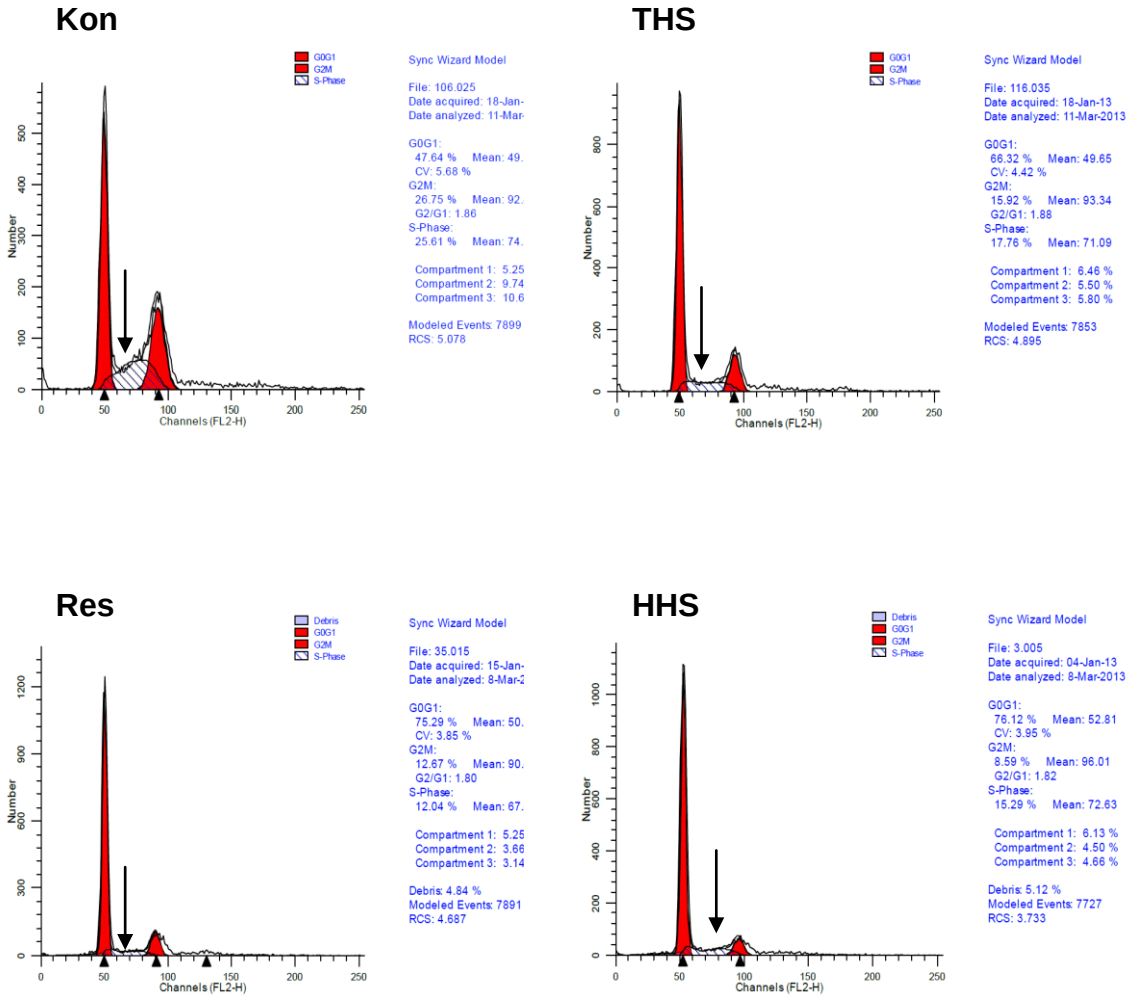
Wyniki badań wpływu stilbenów na wielkości frakcji komórek A2780 w fazie S po 24 godzinach ekspozycji okazały się korespondować z wynikami badań potencjału podziałowego komórek, uzyskanymi metodą fluorescencyjną. Stwierdzono, że resweratrol obniża wielkość frakcji komórek w fazie S przy zastosowaniu stężeń 50 i 100 μM, natomiast stilben 3,3',4,4'-THS działa od niego efektywniej, obniżając odsetek komórek proliferujących już przy stężeniu 10 μM. Przy każdym z zastosowanych stężeń efekty wywierane przez 3,3',4,4'-THS były istotnie silniejsze niż jego naturalnego prekursora. Trzeci ze związków, 3,3',4,4',5,5'-HHS obniżał frakcję komórek w fazie S w każdym z użytych stężeń, jednak tylko przy stężeniu 10 μM wywierał efekt silniejszy od resweratrolu. Jednocześnie działanie to, podobnie jak w przypadku pomiaru proliferacji metodą fluorescencyjną, było słabsze od działania 3,3',4,4'-THS ($P<0,05$).

W wyniku przedłużenia czasu ekspozycji do 48 godzin, metoda cytometryczna ujawniła istotny statystycznie wpływ antyproliferacyjny resweratrolu, zachodzący przy stężeniu 10 μM, który to efekt nie był wcześniej dostrzegalny w badaniu fluorescencyjnym. Istotne zmniejszenie odsetka komórek w fazie S odnotowano także przy kolejnych stężeniach resweratrolu, jednak wywierane wówczas efekty były bardzo porównywalne. To samo można powiedzieć o wpływie 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS, które to związki zmniejszały odsetek komórek replikujących DNA w porównaniu z kontrolą, a zarazem ich efekty nie różniły się ani między sobą, ani w porównaniu z resweratrolem.

Po 72 godzinach inkubacji, związkiem, który w najwyższym stopniu ograniczał odsetek komórek w fazie S cyklu był resweratrol, który wykazywał aktywność w całym zakresie stężeń (w przeciwieństwie do obu swoich syntetycznych pochodnych), a zarazem efekty jego działania spośród trzech badanych związków były najsilniejsze. W tym punkcie czasowym zaobserwowano zanik aktywności 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS przy stężeniach 10 i 50 μM (**Tabela 9**).

Tabela 9. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na dystrybucję komórek raka jajnika A2780 w cyklu komórkowym. Badania przerowadzono w duplikatach na 3 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

czas		**24 godziny**			**48 godzin**			**72 godziny**		
związek	**stężenie**	**G1** (%)	**S** (%)	**G2/M** (%)	**G1** (%)	**S** (%)	**G2/M** (%)	**G1** (%)	**S** (%)	**G2/M** (%)
K		62±7	32±6	6±2	57±9	31±6	12±1	68±1	24±2	8±2
Res	**10**	60±8	33±6	7±2	75±1	16±2*	9±1	72±3	19±1*	9±1
	50	75±2	20±1*	5±1	75±2	14±1*	11±1	70±3	12±1*	18±2
	100	76±1	16±1*	8±2	74±1	14±1*	12±3	72±7	12±2*	16±4
THS	**10**	70±4	20±1$^{*\#}$	10±2	74±1	14±1*	12±1	61±5	25±3$^{\#}$	14±3
	50	73±2	14±2$^{*\#}$	13±6	74±1	13±1*	13±3	63±2	26±3$^{\#}$	11±1
	100	70±7	10±1$^{*\#}$	16±4	61±5	18±3*	21±2	58±6	18±2$^{*\#}$	24±2
HHS	**10**	76±1	14±1$^{*\#}$	10±4	61±7	19±3*	20±4	58±2	35±8$^{\#}$	7±7
	50	73±2	16±2*	11±2	61±3	19±2*	20±4	60±3	33±7$^{\#}$	7±4
	100	60±15	20±2*	18±4	71±5	16±3*	13±3	69±6	16±3$^{*\#}$	6±1



Rycina 20. Reprezentatywne histogramy uzyskane w trakcie analizy cytometrycznej, ilustrujące wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na dystrybucję w cyklu mitotycznym komórek raka jajnika A2780, eksponowanych na badane związki w stężeniu 100 μM przez 72 godziny. Wyniki uzyskane dla danego związku odnoszono względem komórek grupy kontrolnej (**Kon**), tj. hodowli nie poddawanych działaniu stilbenów. Skala na osi rzędnych została arbitralnie ustalona przez program ModFit LT™. Pole obrazujące komórki w fazie S zakreskowano i dodatkowo wskazano strzałką.

4.6.2. Komórki OVCAR-3

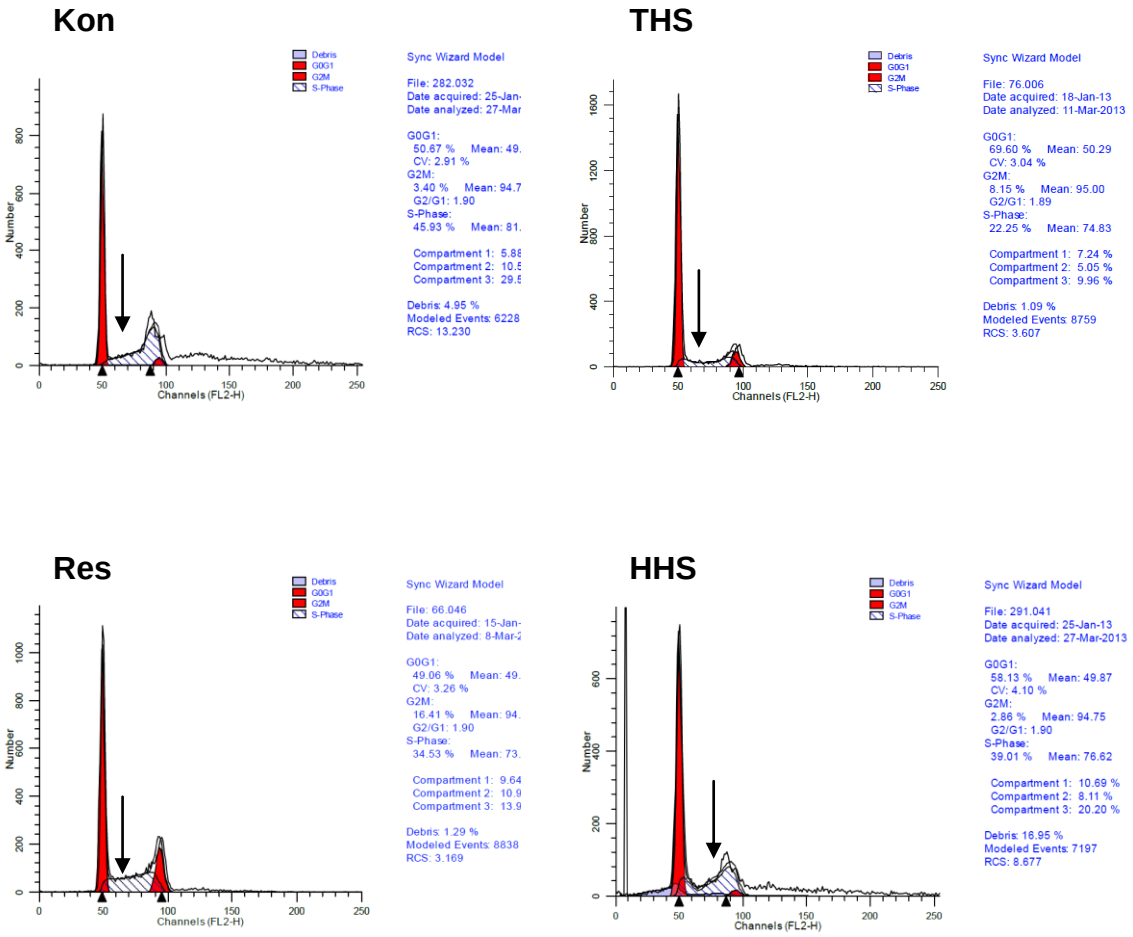
Po 24 godzinach ekspozycji, resweratrol obniżył wielkość frakcji komórek w fazie S tylko przy stężeniu 100 μM. Stilben 3,3',4,4'-THS wykazywał aktywność już od stężenia 50 μM, przy czym efekty wywierane przy tym stężeniu, jak i przy stężeniu 100 μM były istotnie wyższe w porównaniu z resweratrolem. Brakiem wpływu na wielkość frakcji komórek w fazie S po 24 godzinach ekspozycji cechował się natomiast 3,3',4,4',5,5'-HHS. Dla stężeń 50 μM i 100 μM uzyskane efekty były istotnie statystycznie mniejsze w porównaniu z 3,3',4,4'-THS (wartości P, odpowiednio, $< 0,05$ i $<0,04$).

W wyniku ekspozycji komórek trwającej 48 godzin, resweratrol wykazywał aktywność antyproliferacyjną przy stężeniach 50 i 100 μM, jednak efekty wywierane przez 3,3',4,4'-THS były znacząco silniejsze przy każdym z zastosowanych stężeń, wliczając w to wartość 10 μM. Stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS był aktywny, podobnie jak resweratrol, przy stężeniach 50 i 100 μM, przy czym przy stężeniu 100 μM wywierany efekt był istotnie silniejszy w porównaniu z resweratrolem. W tym punkcie czasowym, różnice między dwoma analogami zaobserwowano tylko w odniesieniu do stężenia 10 μM, kiedy to efekty zależne od 3,3',4,4'-THS były istotnie silniejsze ($P<0,04$).

72-godzinna ekspozycja komórek OVCAR-3 na stilbeny doprowadziła do pogłębienia antyproliferacyjnego efektu wywieranego przez resweratrol, a obecnego przy stężeniach 50 i 100 μM. Z kolei 3,3',4,4'-THS cechował się zbliżoną aktywnością antyproliferacyjną przy wszystkich trzech użytych stężeniach, przy czym tylko przy stężeniu 10 μM wywierany przez niego efekt był istotnie silniejszy niż resweratrolu. Analogicznie rzecz się miała w przypadku stilbenu 3,3',4,4',5,5'-HHS. Wpływ obu pochodnych resweratrolu na wielkość frakcji komórek w fazie S cyklu, w tym punkcie czasowym i przy użytych stężeniach był niemal identyczny (**Tabela 10**).

Tabela 10. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na dystrybucję komórek raka jajnika OVCAR-3 w cyklu komórkowym. Badania przeprowadzono w duplikatach na 3 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

czas		**24 godziny**			**48 godzin**			**72 godziny**		
związek	**stężenie**	**G1** (%)	**S** (%)	**G2/M** (%)	**G1** (%)	**S** (%)	**G2/M** (%)	**G1** (%)	**S** (%)	**G2/M** (%)
K		41±3	41±2	18±6	47±3	48±2	5±4	40±3	41±5	19±4
Res	**10**	38±4	41±5	21±3	47±1	44±3	9±3	46±2	43±5	9±3
	50	38±3	39±2	23±3	50±3	38±1*	12±3	62±2	32±1*	6±1
	100	35±3	35±1*	30±4	46±3	38±2*	16±2	61±5	32±1*	7±5
THS	**10**	36±2	43±3	21±2	47±3	38±3*#	15±5	59±6	33±2*#	8±1
	50	35±3	31±1*#	34±2	52±3	32±1*#	16±4	58±3	34±1*	8±1
	100	39±2	25±2*#	36±6	52±2	31±2*#	17±3	54±6	35±3*	11±3
HHS	**10**	35±3	50±4	15±3	41±3	46±2	13±1	49±4	35±2*#	16±2
	50	44±4	40±1	16±5	44±2	32±5*	24±3	52±2	36±2*	12±4
	100	46±4	42±2	12±2	52±1	32±2*#	16±7	56±3	31±2*	13±2



Rycina 21. Reprezentatywne histogramy uzyskane w trakcie analizy cytometrycznej, ilustrujące wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na dystrybucję w cyklu mitotycznym komórek raka jajnika OVCAR-3, eksponowanych na badane związki w stężeniu 100 μM przez 24 godziny. Wyniki uzyskane dla danego związku odnoszono względem komórek grupy kontrolnej (**Kon**), tj. hodowli nie poddawanych działaniu stilbenów. Skala na osi rzędnych została arbitralnie ustalona przez program ModFit LT™. Pole obrazujące komórki w fazie S zakreskowano i dodatkowo wskazano strzałką.

4.6.3. Komórki SKOV-3

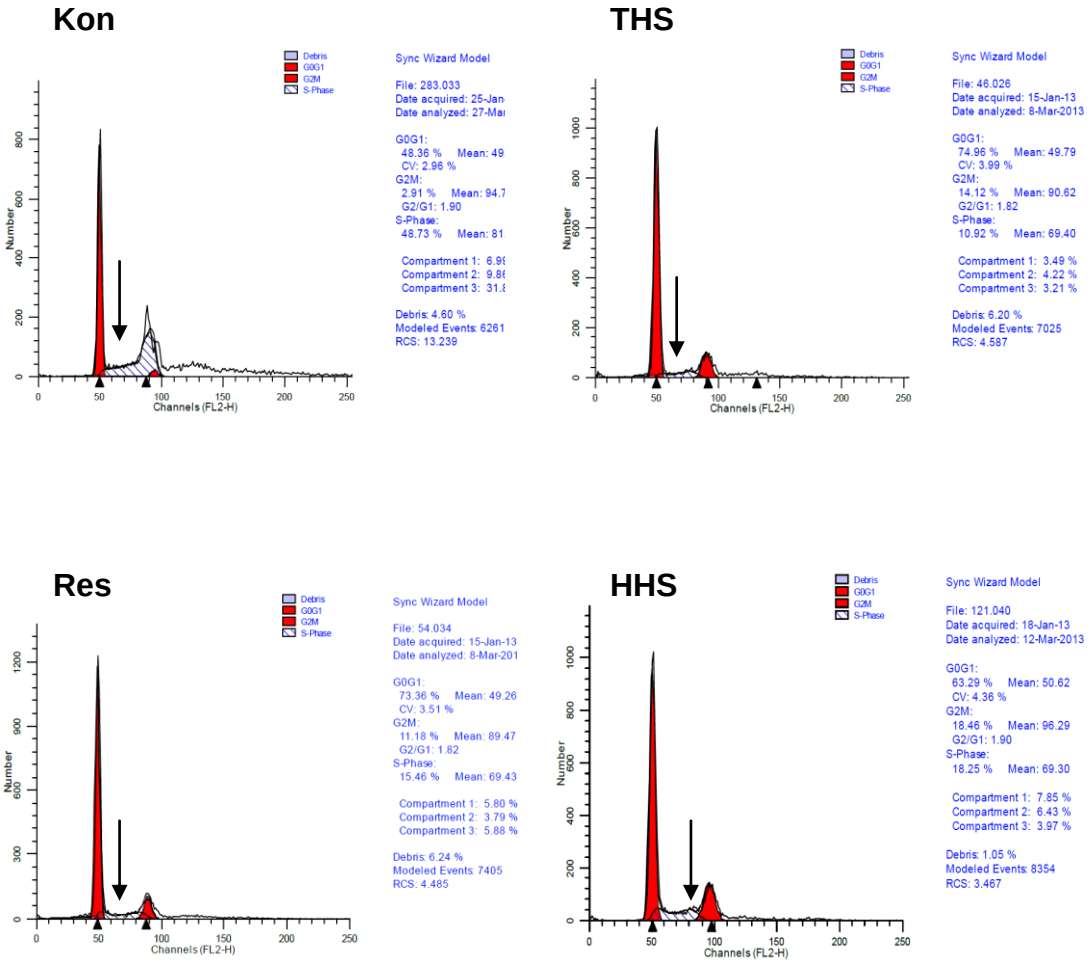
Badanie wpływu stilbenów na dystrybucję komórek raka jajnika SKOV-3 w cyklu komórkowym wykazało, że po 24 godzinach ekspozycji, resweratrol zmniejsza frakcję komórek w fazie S, przy użytych stężeniach 10 i 50 μM. Stilben 3,3',4,4'-THS działał natomiast efektywnie przy stężeniach 50 i 100 μM, przy czym stosując wyższe ze stężeń zaobserwowano efekt istotnie silniejszy w porównaniu z resweratrolem. Stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS cechował się aktywnością antyproliferacyjną w całym zakresie stosowanych stężeń, a jego efekty w stężeniu 10 μM były silniejsze od tych, wykazywanych przez 3,3',4,4'-THS ($P<0,04$).

W wyniku przedłużenia ekspozycji komórek do 48 godzin zaobserwowano istotne wzmocnienie siły działania resweratrolu, który swą aktywność wywierał przy każdym z zastosowanych stężeń. Co więcej, przy stężeniu 10 μM efekty działania resweratrolu były istotnie wyższe niż obu jego syntetycznych pochodnych. Analizując, z kolei, stężenie 100 μM, silniejszym działaniem od resweratrolu charakteryzował się 3,3',4,4'-THS. Efekty wywierane przez ten analog były przy tym stężeniu także istotnie wyższe w porównaniu z 3,3',4,4',5,5'-HHS ($P<0,05$).

W trzeciej dobie eksperymentu stwierdzono, że resweratrol obniża odsetek komórek w fazie S w stopniu porównywalnym z poprzednim punktem czasowym. Działaniem silniejszym od resweratrolu charakteryzował się natomiast stilben 3,3',4,4'-THS użyty w stężeniu 100 μM. Przy tym stężeniu jego działanie było także silniejsze w porównaniu z 3,3',4,4',5,5'-HHS ($P<0,03$). Ten ostatni związek wykazywał aktywność przy stężeniach 50 i 100 μM, a stopień tej aktywności był porównywalny z resweratrolem (**Tabela 11**).

Tabela 11. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na dystrybucję komórek raka jajnika SKOV-3 w cyklu komórkowym. Badania przeprowadzono w duplikatach na 3 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

czas		**24 godziny**			**48 godzin**			**72 godziny**		
związek	**stężenie**	**G1** (%)	**S** (%)	**G2/M** (%)	**G1** (%)	**S** (%)	**G2/M** (%)	**G1** (%)	**S** (%)	**G2/M** (%)
K		55±6	40±4	5±2	51±2	44±3	5±2	52±1	43±4	5±3
Res	**10**	60±2	33±2*	7±5	77±3	13±2*	10±2	75±1	16±5*	9±4
	50	50±5	21±3*	29±4	74±2	16±2*	10±5	77±3	15±2*	8±3
	100	43±2	35±4	22±2	72±5	16±3*	12±1	78±3	12±2*	10±3
THS	**10**	42±2	35±6	23±1	58±2	30±1*#	12±5	65±2	22±1*	12±4
	50	54±2	18±3*	28±6	71±1	18±2*	11±2	71±3	12±3*	17±2
	100	56±3	21±3*#	23±1	76±3	10±1*#	14±1	78±2	7±1*#	15±4
HHS	**10**	55±5	26±3*	19±4	48±5	39±6#	13±3	50±3	38±6	12±4
	50	53±2	20±1*	27±1	70±3	21±3*	9±5	76±4	12±3*	12±6
	100	55±6	22±3*#	23±3	72±2	17±1*	11±1	78±1	14±3*	8±2



Rycina 22. Reprezentatywne histogramy uzyskane w trakcie analizy cytometrycznej, ilustrujące wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na dystrybucję w cyklu mitotycznym komórek raka jajnika SKOV-3, eksponowanych na badane związki w stężeniu 100 μM przez 48 godzin. Wyniki uzyskane dla danego związku odnoszono względem komórek grupy kontrolnej (**Kon**), tj. hodowli nie poddawanych działaniu stilbenów. Skala na osi rzędnych została arbitralnie ustalona przez program ModFit LT™. Pole obrazujące komórki w fazie S zakreskowano i dodatkowo wskazano strzałką.

4.7. Wpływ stilbenów na aktywność β-galaktozydazy związanej ze starzeniem w hodowlach komórek raka jajnika

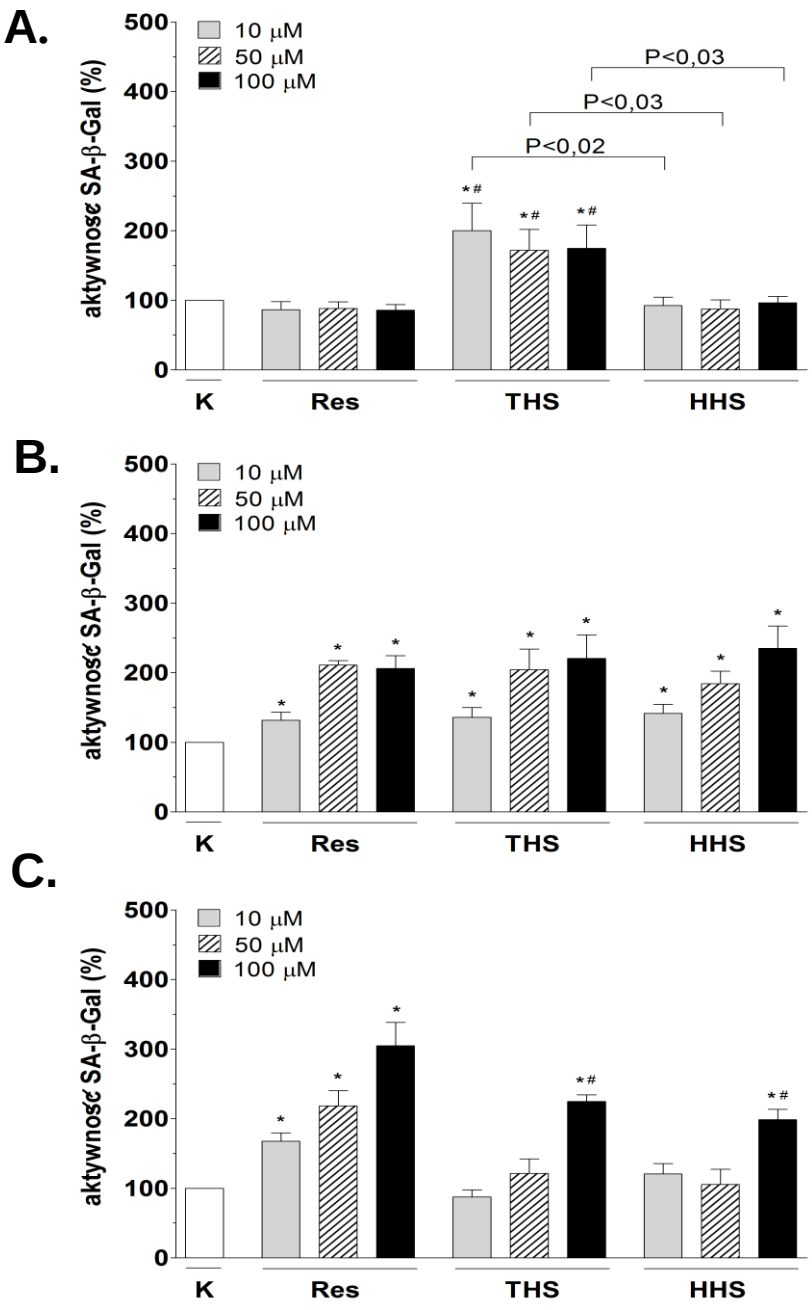
β-galaktozydaza związana ze starzeniem (SA-β-Gal) jest najczęściej wykorzystywanym markerem komórek starych w badaniach *in vitro*. W niniejszej rozprawie wykorzystano ilościową ocenę aktywności enzymu w całej populacji komórek nowotworowych, traktując ją jako miarę komórkowego starzenia się hodowli.

4.7.1. Komórki A2780

Stwierdzono, że komórki A2780 eksponowane przez 24 godziny na resweratrol nie wykazują zmian aktywności SA-β-Gal. Wzrost aktywności enzymu zaobserwowano natomiast w komórkach poddawanych działaniu 3,3',4,4'-THS, który w każdym z użytych stężeń wywierał efekt silniejszy od resweratrolu, zwiększając aktywność SA-β-Gal o 100 ± 40% (przy stężeniu 10 μM), o 72 ± 30% (przy stężeniu 50 μM) i o 75 ± 35% (przy stężeniu 100 μM). 3,3',4,4',5,5'-HHS, podobnie jak resweratrol, nie powodował zmian aktywności SA-β-Gal (**Rycina 23A**).

Wydłużenie czasu ekspozycji komórek do 48 godzin spowodowało ujawnienie się pobudzającego aktywność SA-β-Gal działania resweratrolu. Związek ten w stężeniu 10 μM zwiększył aktywność enzymu o 32 ± 12%, przy stężeniu 50 μM o 111 ± 6%, a przy stężeniu 100 μM o 106 ± 19%. Zbliżone w swej skali efekty działania wywierały w tym punkcie obie syntetyczne pochodne resweratrolu, przy czym w żadnym z użytych stężeń nie wykazano przewagi w sile działania jednego związku nad drugim. Warto jednak zwrócić uwagę, że 48 godzina ekspozycji była także dla 3,3',4,4',5,5'-HHS punktem, w którym po raz pierwszy wykazywał zdolność indukcji komórkowego starzenia komórek A2780 (**Rycina 23B**).

Badania przeprowadzone w trzeciej dobie eksperymentu wykazały dalszy wzrost działania resweratrolu, który przy stężeniu 10 μM zwiększał aktywność SA-β-Gal o 68 ± 12%, przy stężeniu 50 μM o 118 ± 22%, a przy stężeniu 100 μM o 205 ± 33%. W tym punkcie czasowym resweratrol był związkiem wykazującym najwyższą aktywność spośród trzech badanych stilbenów. Zaobserwowano także, że w przypadku dwóch syntetycznych pochodnych, doszło do zaniku ich pobudzającego działania względem aktywności SA-β-Gal przy stężeniach 10 i 50 μM. Pobudzające działanie odnotowano tylko dla najwyższego ze stężeń, kiedy to 3,3',4,4'-THS zwiększał aktywność enzymu o 125 ± 10%, a 3,3',4,4',5,5'-HHS o 99 ± 15% (**Rycina 23C**).



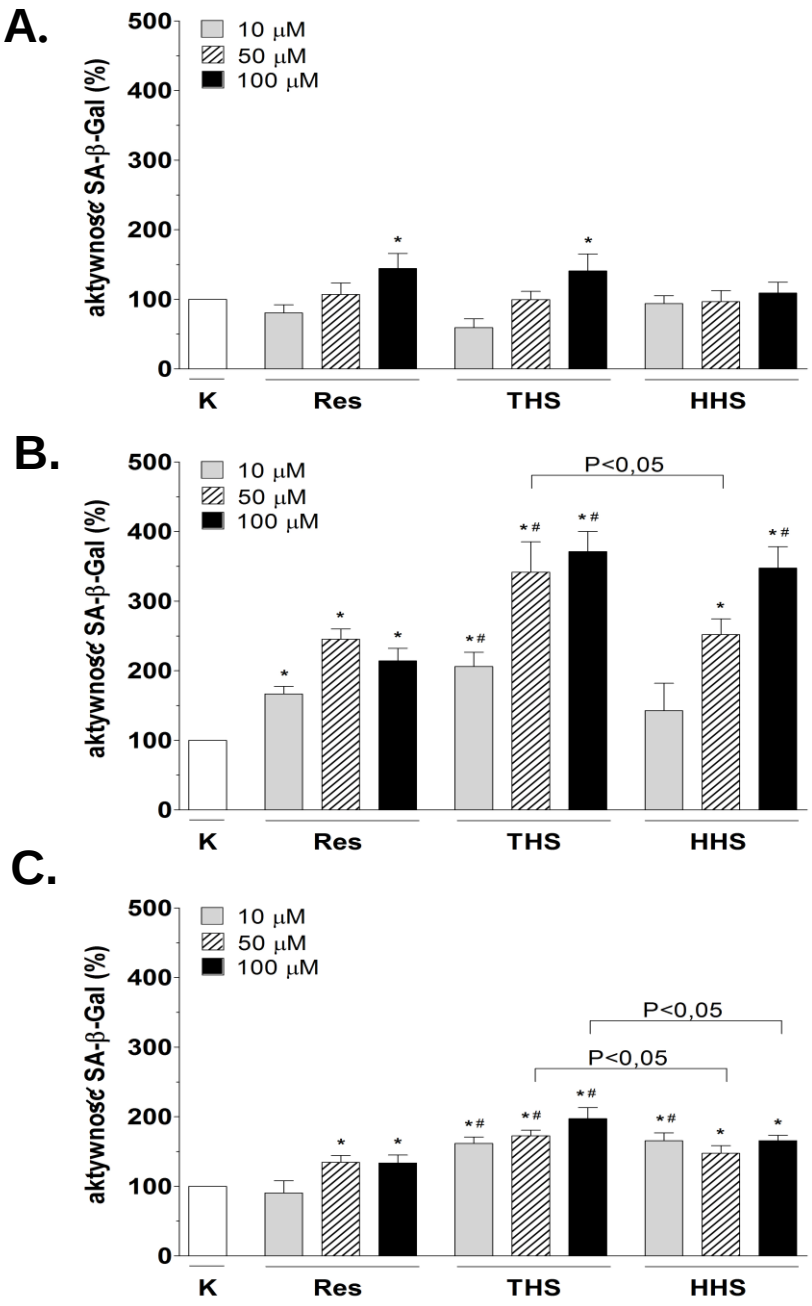
Rycina 23. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na aktywność SA-β-Gal w hodowlach komórek raka jajnika A2780 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 6 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.7.2. Komórki OVCAR-3

Analogiczne badania aktywności SA-β-Gal na komórkach raka jajnika OVCAR-3 wykazały, że po 24 godzinach ekspozycji pobudzenie aktywności enzymu następuje tylko pod wpływem resweratrolu w stężeniu 100 μM (wzrost o 44 ± 22%) oraz 3,3',4,4'-THS w tym samym stężeniu (wzrost o 41 ± 25%) (**Rycina 24A**).

W następstwie ekspozycji przedłużonej do 48 godzin, resweratrol powodował wzrost aktywności SA-β-Gal przy każdym z użytych stężeń, tj. o 67 ± 11% przy stężeniu 10 μM, o 145 ± 15% przy stężeniu 50 μM, i o 114 ± 18% przy stężeniu 100 μM. Związkiem działającym jednak od niego efektywniej był 3,3',4,4'-THS, który przy każdym z użytych stężeń wywierał efekty istotnie silniejsze od resweratrolu. Wykazano, że przy stężeniu 10 μM związek ten zwiększał aktywność SA-β-Gal o 106 ± 20%, przy stężeniu 50 μM o 242 ± 44%, a przy stężeniu 100 μM o 271 ± 29%. Trzeci ze związków, 3,3',4,4',5,5'-HHS wpływał na aktywność SA-β-Gal przy stężeniu 50 μM (wzrost o 152 ± 23%) i 100 μM (wzrost o 248 ± 31%), przy czym tylko wyższe stężenie związku dawało efekt istotnie statystycznie silniejszy niż resweratrol. Z kolei efekty wywierane przez 3,3',4,4',5,5'-HHS przy stężeniu 50 μM były znamiennie słabsze w porównaniu z 3,3',4,4'-THS (**Rycina 24B**).

Po 72 godzinach ekspozycji, działanie resweratrolu uległo osłabieniu w porównaniu z poprzednim punktem czasowym, czego dowodem był m.in. zanik efektu wywieranego przez ten związek przy stężeniu 10 μM. Efektywność działania resweratrolu odnotowano dla stężeń 50 i 100 μM, przy czym zarejestrowany stopień aktywacji SA-β-Gal był porównywalny z efektem obserwowanym w pierwszej dobie eksperymentu. Także pobudzający aktywność SA-β-Gal wpływ pochodnych resweratrolu uległ osłabieniu w tym punkcie czasowym, przy czym 3,3',4,4'-THS zwiększał aktywność enzymu przy każdym z użytych stężeń (o 62 ± 9% przy stężeniu 10 μM, o 73 ± 8% przy stężeniu 50 μM i o 97 ± 16% przy stężeniu 100 μM). Dodatkowo, przy każdym stężeniu efekty wywierane przez 3,3',4,4'-THS były statystycznie silniejsze od tych, charakteryzujących resweratrol. Ostatni ze związków, 3,3',4,4',5,5'-HHS użyty w stężeniu 10 μM pobudzał aktywność SA-β-Gal silniej niż resweratrol (wzrost o 65 ± 12%), natomiast przy wyższych stężeniach wywierane przez niego efekty były porównywalne z resweratrolem i istotnie słabsze od tych, wywieranych przez 3,3',4,4'-THS (**Rycina 24C**).



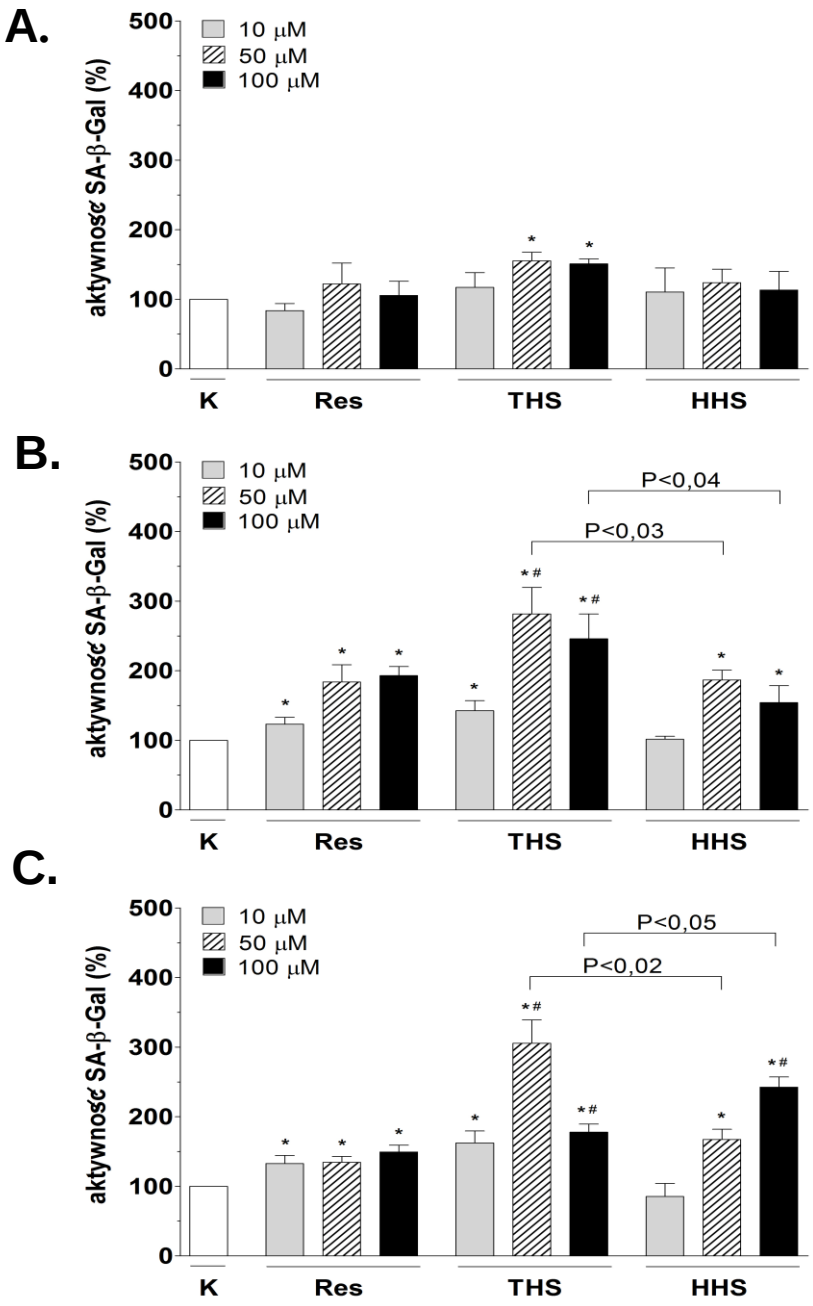
Rycina 24. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na aktywność SA-β-Gal w hodowlach komórek raka jajnika OVCAR-3 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 6 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.7.3. Komórki SKOV-3

Po 24 godzinach ekspozycji komórek raka jajnika SKOV-3 stwierdzono, że spośród trzech związków badanych tylko 3,3',4,4'-THS zwiększa aktywność SA-β-Gal, o, odpowiednio, 55 ± 12% przy stężeniu 50 μM i 51 ± 7% przy stężeniu 100 μM (**Rycina 25A**).

Wynikiem przedłużenia ekspozycji komórek na stilbeny do 48 godzin było ujawnienie się pobudzającego aktywność SA-β-Gal wpływu resweratrolu, który indukował enzym przy każdym z użytych stężeń (o 23 ± 10% przy stężeniu 10 μM, o 84 ± 25% przy stężeniu 50 μM i o 93 ± 13% przy stężeniu 100 μM). Z kolei 3,3',4,4'-THS zastosowany w steżeniu 10 μM wywierał działanie porównywalne do resweratrolu, natomiast przy wyższych stężeniach działał od niego znacząco silniej, pobudzając aktywność SA-β-Gal o 182 ± 38% przy stężeniu 50 μM i o 146 ± 36% przy stężeniu 100 μM. Trzeci ze związków, 3,3',4,4',5,5'-HHS, pobudzał aktywność SA-β-Gal przy stężeniach 50 i 100 μM, przy czym w obu przypadkach efekty działania tego związku były zbliżone do resweratrolu, a zarazem istotnie niższe w porównaniu z 3,3',4,4'-THS (**Rycina 25B**).

W ostatnim z analizowanych punktów czasowych, działanie resweratrolu uległo nieznacznemu osłabieniu, a efekty wywierane przez trzy stężenia tego związku były dość zbliżone do siebie (wzrost aktywności o 33 ± 12% dla stężenia 10 μM, o 35 ± 9% dla stężenia 50 μM i o 49 ± 10% dla stężenia 100 μM. Działanie 3,3',4,4'-THS po 72 godzinach ekspozycji nie uległo znaczącemu wzmocnieniu w porównaniu z poprzednim punktem czasowym, przy czym najefektywniej działającym stężeniem było 50 μM, które zwiększało aktywność SA-β-Gal w komórkach o 206 ± 33%. Efekty wywierane przez ten związek w stężeniach 50 i 100 μM były jednocześnie znacząco wyższe w porównaniu z resweratrolem. Stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS ponownie wpływał na wzrost aktywności SA-β-Gal w stężeniach 50 i 100 μM (odpowiednio o 67 ± 15% i 143 ± 15%). Działanie tego związku przy stężeniu 50 μM było porównywalne z resweratrolem, a zarazem znacząco słabsze niż 3,3',4,4'-THS, natomiast przy stężeniu 100 μM było ono silniejsze zarówno od resweratrolu, jak i od drugiego testowanego analogu (**Rycina 25C**).



Rycina 25. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na aktywność SA-β-Gal w hodowlach komórek raka jajnika SKOV-3 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 6 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

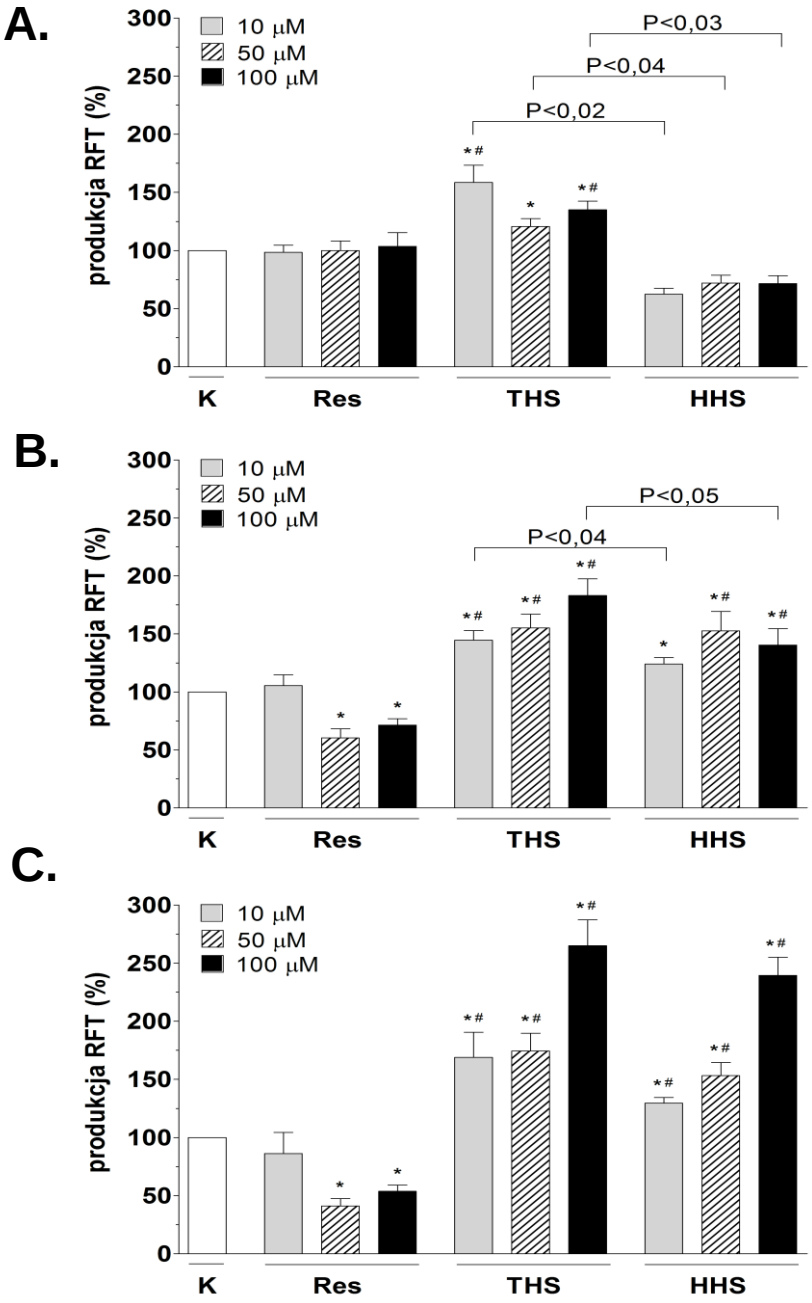
4.8. Wpływ resweratrolu i jego pochodnych na produkcję reaktywnych form tlenu przez komórki raka jajnika

4.8.1. Komórki A2780

Badania wykazały, że 24-godzinna ekspozycja komórek raka jajnika A2780 na resweratrol nie wpływa na zmianę produkcji RFT. Z kolei ekspozycja komórek na 3,3',4,4'-THS spowodowała znaczący wzrost generowania RFT, który odnotowano dla każdego z użytych stężeń związku. Dla stężenia 10 μM odnotowano wzrost produkcji RFT o 59 ± 15%, dla stężenia 50 μM o 21 ± 7%, a dla stężenia 100 μM o 35 ± 8% w porównaniu z grupą kontrolną. Drugi z syntetycznych analogów resweratrolu, 3,3',4,4',5,5'-HHS, podobnie jak jego naturalny prekursor, nie wpływał na zmianę produkcji RFT w tym punkcie czasowym eksperymentu (**Rycina 26A**).

W wyniku inkubacji komórek ze związkami badanymi przedłużonej do 48 godzin stwierdzono pojawienie się antyoksydacyjnego działania resweratrolu, który przy stężeniach 50 i 100 μM obniżył generowanie RFT przez komórki, o, odpowiednio, 40 ± 8% i 29 ± 5%. Jednocześnie, w wyniku działania 3,3',4,4'-THS doszło do nasilenia produkcji RFT, szczególnie przy stężeniach 50 i 100 μM, odpowiednio o 55 ± 12% i 83 ± 14%. Skala wzrostu produkcji RFT pod wpływem działania tego związku w stężeniu 10 μM była porównywalna do wcześniejszego punktu czasowego. Po 48 godzinach ekspozycji, swoje działanie prooksydacyjne także ujawnił 3,3',4,4',5,5'-HHS, który wzmagał generowanie RFT przy każdym z użytych stężeń (o 24 ± 6% przy 10 μM, o 53 ± 17% przy 50 μM i o 40 ± 14% przy 100 μM). Dla stężeń 10 i 100 μM efekty wywierane przez ten związek były jednak istotnie statystycznie niższe w porównaniu z działaniem 3,3',4,4'-THS (**Rycina 26B**).

Po 72 godzinach ekspozycji nastąpiło utrwalenie się antyoksydacyjnego działania resweratrolu, użytego w stężeniach 50 i 100 μM (obniżenie produkcji RFT odpowiednio, o 59 ± 6% i 56 ± 5% w porównaniu z grupą kontrolną). Dalszemu wzmocnieniu uległo natomiast prooksydacyjne działanie 3,3',4,4'-THS, który przy stężeniu 100 μM zwiększał produkcję RFT aż o 165 ± 22%. Podobny efekt odnotowano w stosunku do 3,3',4,4',5,5'-HHS, który przy każdym z użytych stężeń pobudzał produkcję RFT w stopniu porównywalnym z 3,3',4,4'-THS (**Rycina 26C**).



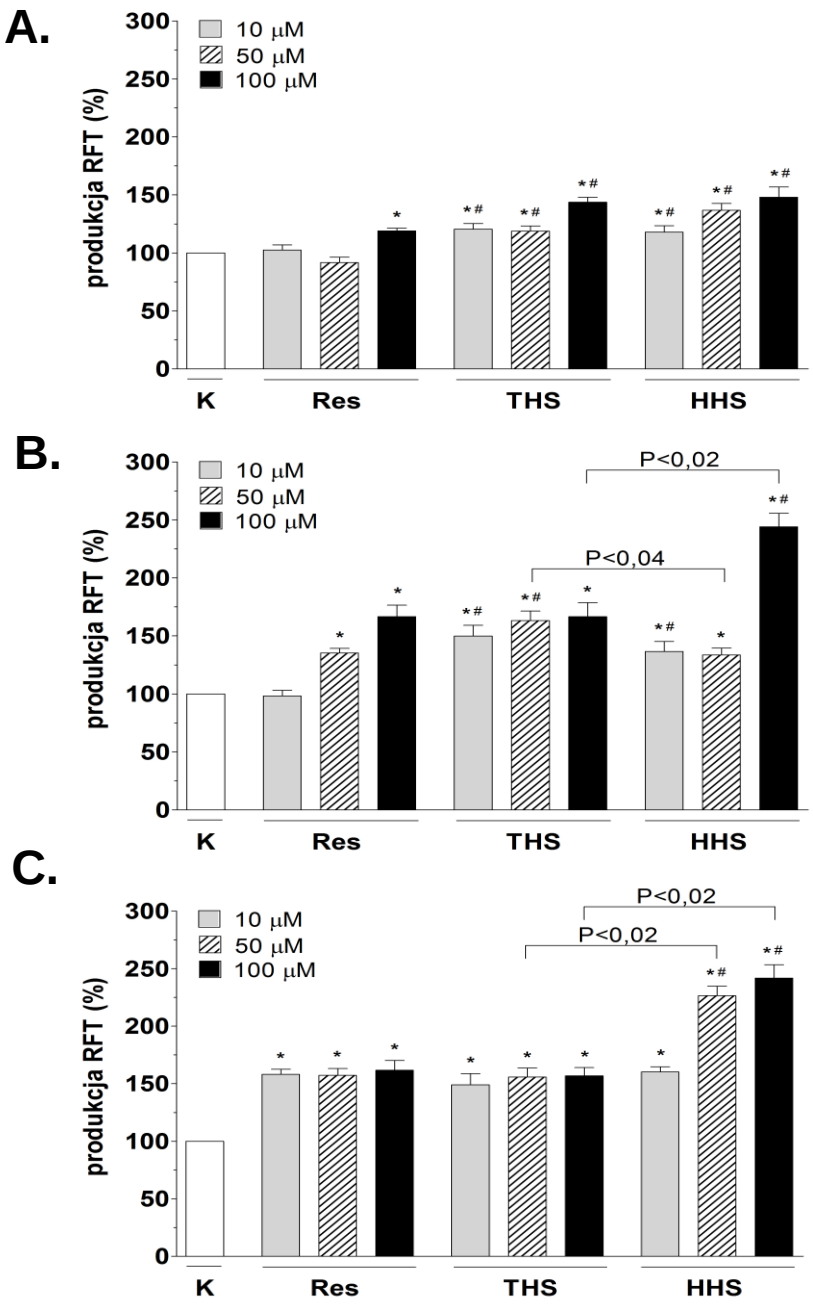
Rycina 26. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na produkcję RFT przez komórki raka jajnika A2780 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 8 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.8.2. Komórki OVCAR-3

Badania na komórkach nowotworowych OVCAR-3 wykazały, że w wyniku 24-godzinnej inkubacji tych komórek w obecności resweratrolu o stężeniu 100 μM dochodzi do dochodzi do wzrostu produkcji RFT o 19 ± 2%. Z kolei w odniesieniu do komórek eksponowanych przez ten sam czas na 3,3',4,4'-THS stwierdzono pobudzenie produkcji RFT przy każdym z zastosowanych stężeń: przy stężeniu 10 μM o 18 ± 4%, przy stężeniu 50 μM o 19 ± 5%, a przy stężeniu 100 μM o 44 ± 4% w porównaniu z grupą kontrolną. Dla każdego ze stężeń efekty wywierane przez 3,3',4,4'-THS były istotnie statystycznie silniejsze w porównaniu z działaniem resweratrolu. Trzeci z badanych związków, 3,3',4,4',5,5'-HHS także wykazywał działanie prooksydacyjne, które w swym nasileniu było niemal identyczne z działaniem 3,3',4,4'-THS, a zarazem, przy każdym ze stężeń było silniejsze niż resweratrolu (**Rycina 27A**).

W rezultacie eksperymentu przedłużonego do 48 godzin doszło do wzmocnienia działania resweratrolu, który wzbudzał produkcję RFT przy stężeniu 50 μM (o 35 ± 4%) oraz 100 μM (o 66 ± 10%). Działanie prooksydacyjne wykazywał w tym punkcie czasowym także 3,3',4,4'-THS, który przy stężeniach 10 i 50 μM wywierał efekty statystycznie silniejsze niż resweratrol (wzrost produkcji RFT o, odpowiednio, 18 ± 4% i 19 ± 5%). W najwyższym z użytych stężeń związek ten zwiększał generowanie RFT o 44 ± 4%. W zakresie użytych stężeń generowanie RFT także zwiększał 3,3',4,4',5,5'-HHS. Szczególnie silne działanie tego związku zaobserwowano w odniesieniu do stężenia 100 μM, przy którym produkcja RFT uległa podwyższeniu o 144 ± 12% w porównaniu z grupą kontrolną. Wówczas, efekt wywierany przez ten związek był znacząco większy niż działanie 3,3',4,4'-THS (**Rycina 27B**).

Po 72 godzinach ekspozycji resweratrol pobudzał generowanie RFT już przy każdym z użytych stężeń, a stopień tego zjawiska był niemal identyczny. Przykładowo, dla stężenia 10 μM odnotowano wzrost produkcji RFT o 58 ± 4%. Bardzo zbliżone do resweratrolu pobudzenie produkcji RFT wykazywał po trzech dobach ekspozycji także 3,3',4,4'-THS. Podobne nasilenie generowania RFT przy stężeniu 10 μM stwierdzono także dla 3,3',4,4',5,5'-HHS. Jednocześnie, związek ten użyty w stężeniach 50 i 100 μM spowodował znaczący wzrost produkcji RFT (odpowiednio o 126 ± 8% i 142 ± 11%), działając każdorazowo silniej w porównaniu z resweratrolem i 3,3',4,4'-THS (**Rycina 27C**).



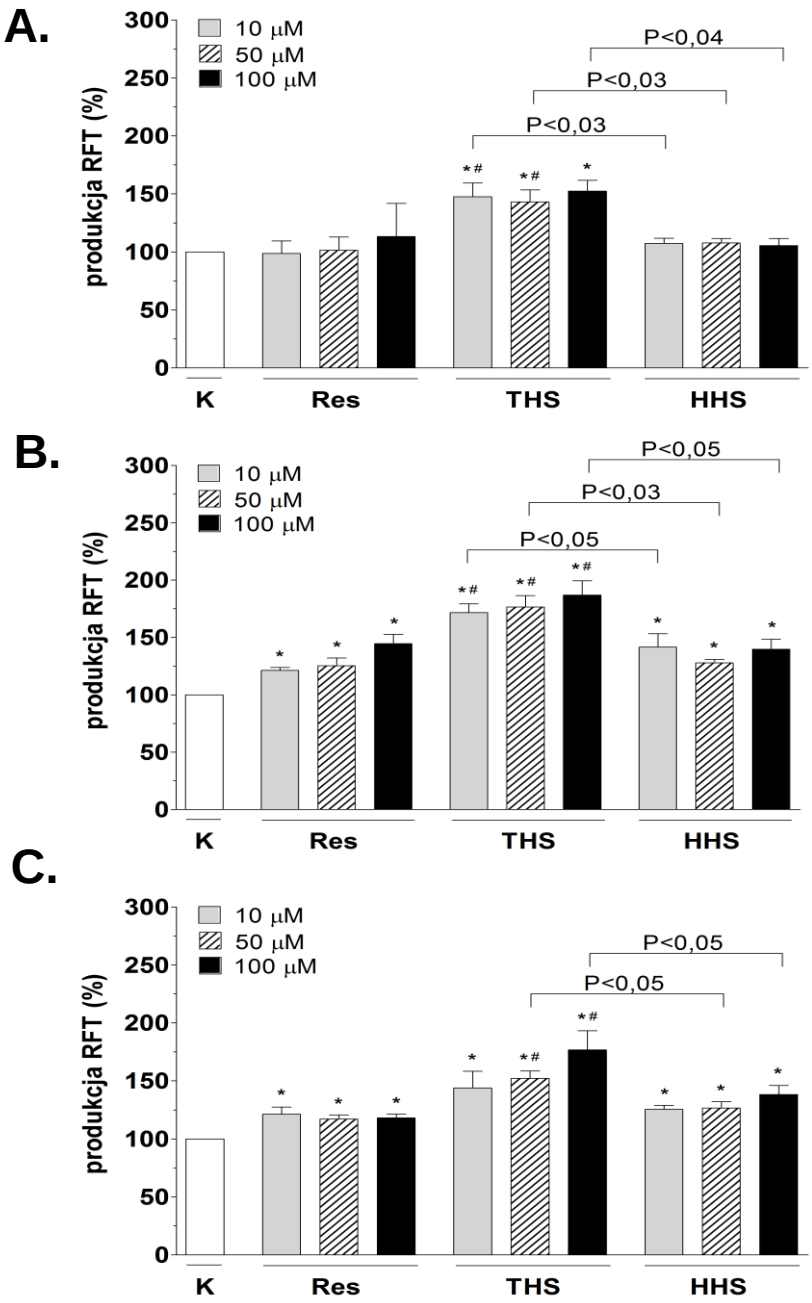
Rycina 27. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na produkcję RFT przez komórki raka jajnika OVCAR-3 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 8 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.8.3. Komórki SKOV-3

W wyniku 24-godzinnej ekspozycji komórek raka jajnika SKOV-3 na resweratrol nie stwierdzono wpływu tego związku na zmianę produkcji RFT. Z kolei stilben 3,3',4,4'-THS spowodował wzrost produkcji RFT przez komórki, o 47 ± 12% przy stężeniu 10 μM, o 43 ± 10% przy stężeniu 50 μM i o 53 ± 9% przy stężeniu 100 μM. W tym punkcie czasowym eksperymentu, stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS nie wpływał na zmiany produkcji RFT, podobnie jak resweratrol (**Rycina 28A**).

W wyniku ekspozycji komórek na stilbeny przedłużonej do 48 godzin nastąpiło ujawnienie się prooksydacyjnego działania resweratrolu, który okazał się pobudzać produkcję RFT przez komórki o 21 ± 3% przy stężeniu 10 μM, o 25 ± 7% przy stężeniu 50 μM i o 44 ± 8% przy stężeniu 100 μM. Istotnie silniejszym wpływem na poziom generowanych RFT, przy każym z użytych stężeń cechował się jednak 3,3',4,4'-THS, który przy stężeniu 10 μM zwiększał produkcję RFT o 72 ± 8%, przy stężeniu 50 μM o 77 ± 10%, a przy stężeniu 100 μM o 87 ± 13%. Działanie niemal identyczne jak resweratrol wykazywał w tym punkcie czasowym 3,3',4,4',5,5'-HHS, którego wpływ na produkcję RFT był przy każdym stężeniu słabszy w porównaniu z 3,3',4,4'-THS (**Rycina 28B**).

Po 72 godzinach ekspozycji resweratrol utrzymał swoje działanie prooksydacyjne przy każdym z użytych stężeń, a skala jego działania była bardzo podobna do poprzedniego punktu czasowego. 3,3',4,4'-THS pobudzał natomiast produkcję RFT silniej od resweratrolu, za wyjątkiem stężenia 10 μM, kiedy to efekty działania obu związków były podobne. Skalą produkcji RFT zbliżoną do resweratrolu charakteryzowały się także komórki eksponowane przez trzy doby na stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS, którego działanie w odniesieniu do stężeń 50 i 100 μM było znacząco słabsze w porównaniu z efektami wywieranymi przez 3,3',4,4'-THS (**Rycina 28C**).



Rycina 28. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na produkcję RFT przez komórki raka jajnika SKOV-3 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 8 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.9. Wpływ resweratrolu i jego pochodnych na adhezję komórek raka jajnika

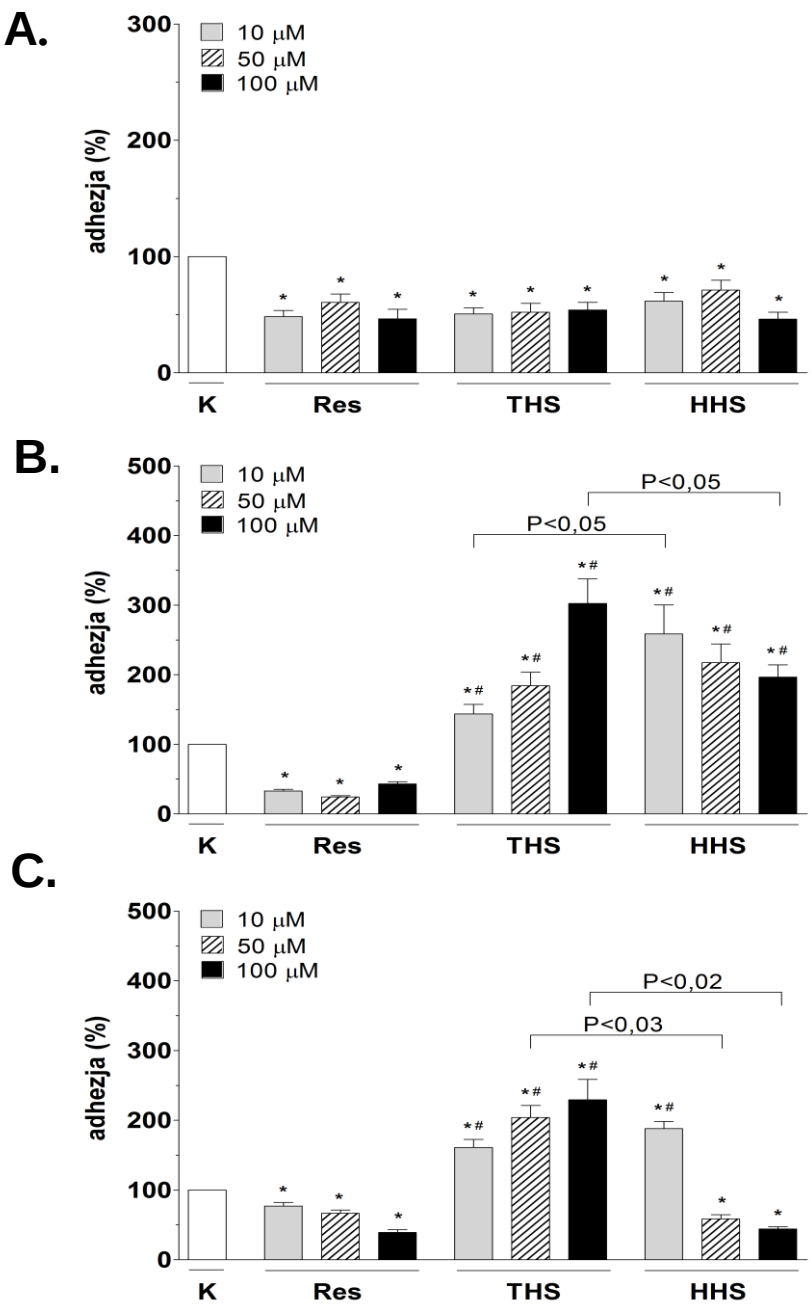
Badania adhezji komórek przeprowadzono metodą fluorescencyjną po ich uprzednim wyznakowaniu kalceiną-AM. Celem oddania realiów panujących *in vivo*, ocenie poddano efektywność adhezji komórek raka jajnika do monowarstwy utworzonej przez LKMO. Wpływ stilbenów na proces adhezji został wyrażony względem grupy kontrolnej, tj. komórek nie poddawanych działaniu badanych związków. Podstawowy, bezwzględny stopień adhezji testowanych linii komórek raka jajnika do LKMO, wyrażony w procentach, został zbadany i opisany w trakcie realizacji wcześniejszych projektów [254].

4.9.1. Komórki A2780

Badania wykazały, że po 24 godzinach inkubacji resweratrol zmniejsza adhezję komórek A2780 do LKMO przy każdym z użytych stężeń. Dla stężenia 10 μM adhezja komórek była niższa o 52 ± 5%, dla stężenia 50 μM o 39 ± 7%, a dla stężenia 100 μM o 54 ± 8%. Podobny efekt wykazywały oba syntetyczne stilbeny, a stopień zahamowania tego zjawiska był w ich przypadku bardzo zbliżony do działania ich naturalnego prekursora (**Rycina 29A**).

W wyniku inkubacji komórek przedłużonej do 48 godzin pogłębieniu uległo działanie resweratrolu, który hamował właściwości adhezyjne komórek o 67 ± 3% przy stężeniu 10 μM, o 75 ± 1% przy stężeniu 50 μM i o 57 ± 3 % przy stężeniu 100 μM. Jednocześnie zaobserwowano odwrócenie efektu wywieranego przez obie jego syntetyczne pochodne. W przypadku 3,3',4,4'-THS, związek ten przy każdym z użytych stężeń pobudzał adhezję komórek nowotworowych, przy czym najwyższe pobudzenie odnotowano przy stężeniu 100 μM (wzrost o 202 ± 35%). Podobnie, pobudzenie adhezji zaobserwowano w odniesieniu do 3,3',4,4',5,5'-HHS, który przy stężeniu 10 μM wywierał efekt istotnie silniejszy niż 3,3',4,4'-THS (wzrost o 159 ± 42%), przy stężeniu 50 μM działał do niego podobnie, a przy stężeniu 100 μM efekty jego działania były słabsze niż 3,3',4,4'-THS (**Rycina 29B**).

Po 72 godzinach ekspozycji komórek na resweratrol nadal obserwowano zahamowanie adhezji do LKMO, przy czym najsilniejszy efekt stwierdzono przy stężeniu 100 μM. 3,3',4,4'-THS wykazywał działanie proadhezyjne, najsilniej wyrażone przy stężeniach 50 i 100 μM (wzrost, odpowiednio, o 104 ± 17% i 129 ± 29%). 3,3',4,4',5,5'-HHS w stężeniu 10 μM pobudzał adhezję komórek w stopniu podobnym do 3,3',4,4'-THS, natomiast w stężeniach 50 i 100 μM hamował właściwości adhezyjne (o 41 ± 6% przy stężeniu 50 μM i o 56 ± 3% przy stężeniu 100 μM) (**Rycina 29C**).



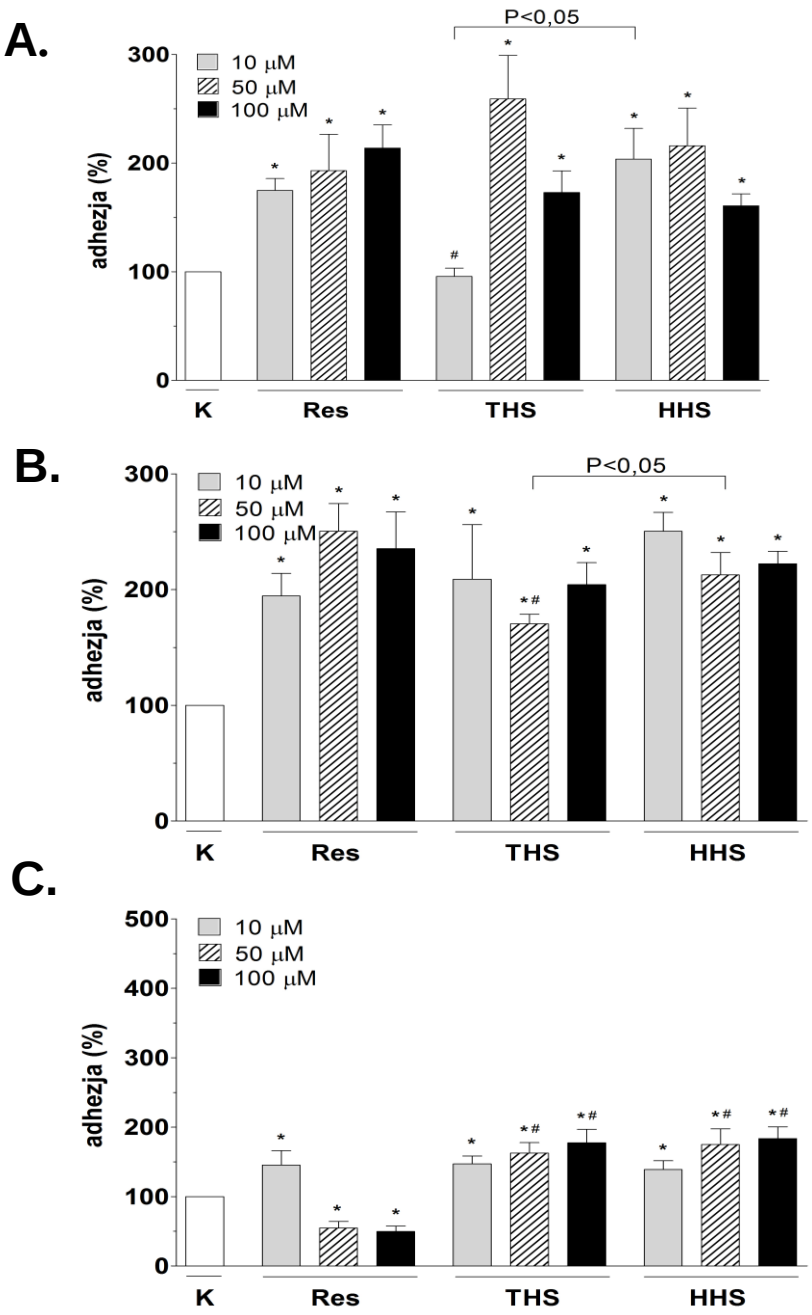
Rycina 29. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na adhezję komórek raka jajnika A2780 do LKMO po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 8 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych, z wykorzystaniem LKMO od 3 różnych dawców. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.9.2. Komórki OVCAR-3

Badania wpływu stilbenów na adhezję komórek raka jajnika OVCAR-3 do monowarstwy młodych LKMO wykazały, że po 24 godzinach ekspozycji każdy z testowanych związków pobudza przyleganie komórek nowotworowych do komórek prawidłowych. Resweratrol użyty w stężeniu 10 μM wzmagał ten proces o 75 ± 11%, w stężeniu 50 μM o 93 ± 34%, a w stężeniu 100 μM o 114 ± 21%. Efekty wywierane przez 3,3',4,4'-THS nie różniły się statystycznie od tych, charakteryzujących resweratrol, za wyjątkiem najniższego ze stężeń, przy zastosowaniu którego adhezja komórek nowotworowych nie ulegała zmianie. Z kolei stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS pobudzał adhezję przy każdym z użytych stężeń, a wywierane przez niego efekty były także porównywalne z resweratrolem. W odniesieniu do stężenia 10 μM, wpływ tego związku na adhezję komórek nowotworowych (pobudzenie zjawiska o 104 ± 28%) był istotnie wyższy w porównaniu z 3,3',4,4'-THS (**Rycina 30A**).

Także w wyniku ekspozycji komórek na stilbeny przedłużonej do 48 godzin zaobserwowano pobudzenie adhezji komórek nowotworowych pod wpływem każdego ze związków badanych, przy zastosowaniu każdego ze stężeń. Nie odnotowano natomiast istotnych statystycznie różnic w skali działania związków, za wyjątkiem efektów działania 3,3',4,4'-THS w stężeniu 50 μM, kiedy to związek ten co prawda nadal pobudzał adhezję komórek nowotworowych, jednak wywierany przez niego efekt biologiczny był istotnie słabszy zarówno w porównaniu z resweratrolem, jak i 3,3',4,4',5,5'-HHS (**Rycina 30B**).

Duże zmiany we wpływie stilbenów na adhezję komórek raka jajnika linii OVCAR-3 odnotowano natomiast po 72 godzinach inkubacji komórek. W tym punkcie czasowym nastąpiło znaczące osłabienie wcześniejszego efektu proadhezyjnego wszystkich związków, obserwowanego w pierwszej i drugiej dobie eksperymentu. W przypadku resweratrolu, związek ten użyty w stężeniu 10 μM pobudzał adhezję komórek o 45 ± 21%, jednak już przy stężeniu 50 μM hamował ten proces o 45 ± 9%, a przy stężeniu 100 μM o 50 ± 8%. Stlbeny 3,3',4,4'-THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS w każdym z użytych stężeń pobudzały proces adhezji, przy czym ich efekty działania były bardzo zbliżone do siebie. Wywierane przez te związki efekty były także wyraźnie słabsze od tych, odnotowanych w drugiej dobie eksperymentu (**Rycina 30C**).



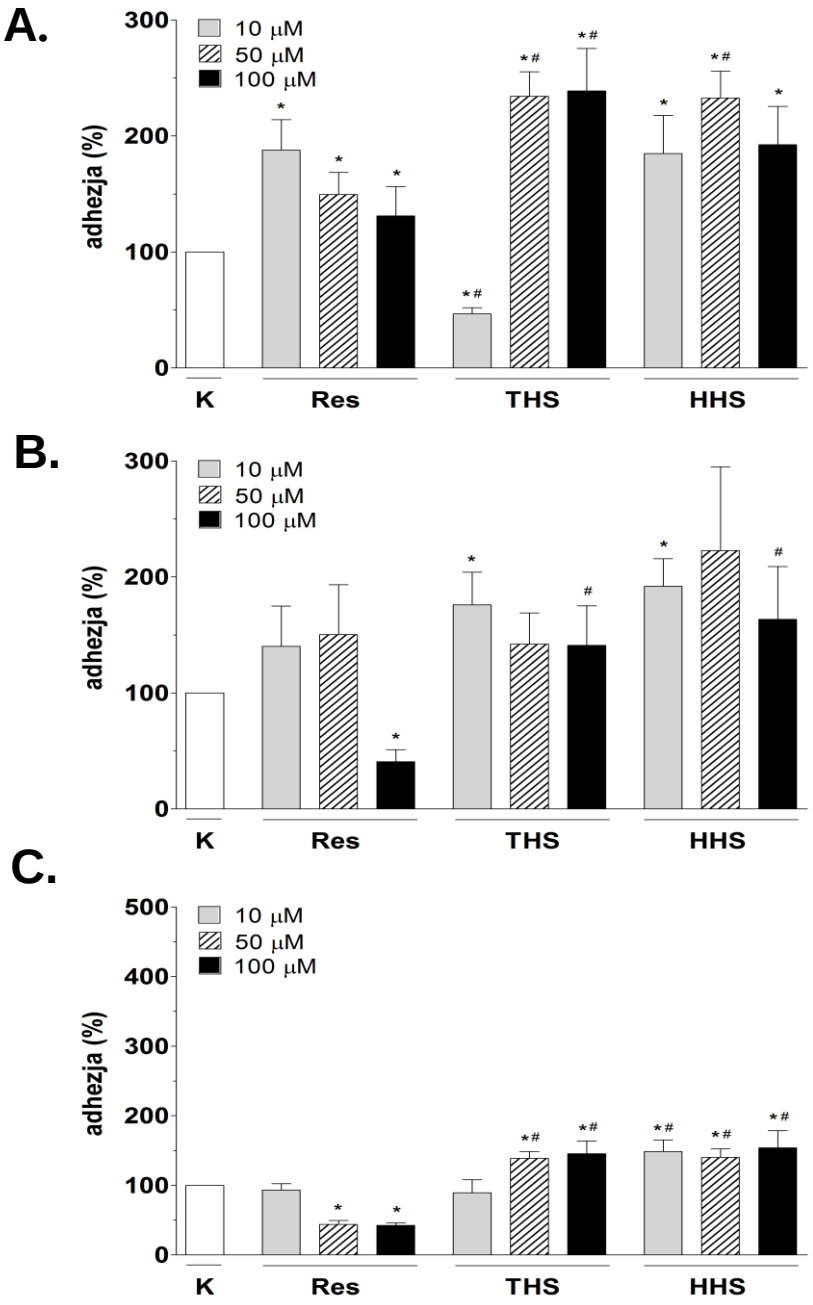
Rycina 30. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na adhezję komórek raka jajnika OVCAR-3 do LKMO po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 8 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych, z wykorzystaniem LKMO od 3 różnych dawców. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.9.3. Komórki SKOV-3

W wyniku 24-godzinnej ekspozycji komórek raka jajnika SKOV-3 na resweratrol wykazano, iż związek ten pobudza adhezję komórek nowotworowych do LKMO. Przy zastosowaniu stężenia 10 μM adhezja wzrosła o 88 ± 26% w porównaniu z grupą kontrolną, przy stężeniu 50 μM wzrosła o 50 ± 19%, a przy stężeniu 100 μM o 31 ± 25%. Jednocześnie, analog resweratrolu 3,3',4,4'-THS użyty w stężeniu 10 μM okazał się hamować proces adhezji (o 53 ± 5%), natomiast użyty w stężeniach 50 i 100 μM wywierał działanie pobudzające (wzrost, odpowiednio, o 134 ± 21% i 139 ± 37%). W przypadku dwóch najwyższych stężeń, efekty działania tego związku były znacząco wyższe w porównaniu z resweratrolem oraz porównywalne do efektów działania drugiej pochodnej, tj. 3,3',4,4',5,5'-HHS. Stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS pobudzał adhezję komórek nowotworowych przy każdym z użytych stężeń, a przy dawce 10 μM jego efekty działania były porównywalne z działaniem resweratrolu (**Rycina 31A**).

Po dwóch dobach ekspozycji komórek na związki badane stwierdzono, że resweratrol utracił wcześniejsze działanie proadhezyjne, obserwowane uprzednio przy stężeniach 10 i 50 μM, natomiast użyty w stężeniu 100 μM rozpoczął działanie antyadhezyjne, hamując to zjawisko o 59 ± 10% w odniesieniu do grupy kontrolnej. Stilbeny 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS pobudzały nadal adhezję komórek SKOV-3 przy zastosowaniu stężenia 10 μM, natomiast przy wyższych stężeniach nie wykazywały zdolności istotnego statystycznie modulowania tego zjawiska (efekt być może w pewnym stopniu zatarty przez relatywnie wysokie wartości SEM grup badanych). Efekty wywierane przez te związki były porównywalne (**Rycina 31B**).

W wyniku przedłużenia ekspozycji do 72 godzin, resweratrol wykazywał jeszcze silniejsze działanie przeciwadhezyjne, hamując ten element inwazyjności komórek nowotworowych przy stężeniach 50 i 100 μM o, odpowiednio, 46 ± 6% i 48 ± 4%. Stilben 3,3',4,4'-THS użyty w stężeniu 10 μM przestał wpływać na adhezję komórek nowotworowych, natomiast w stężeniach 50 i 100 μM ponownie stymulował to zjawisko, choć skala jego działania była wyraźnie niższa w porównaniu z pierwszą dobą eksperymentu. Z kolei 3,3',4,4',5,5'-HHS pobudzał adhezję przy każdym z użytych stężeń, jednak podobnie jak w przypadku drugiego analogu, jego działanie proadhezyjne uległo osłabieniu w porównaniu z wynikami uzyskanymi w pierwszej dobie (**Rycina 31C**).



Rycina 31. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na adhezję komórek raka jajnika SKOV-3 do LKMO po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 8 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych, z wykorzystaniem LKMO od 3 różnych dawców. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.10. Wpływ resweratrolu i jego pochodnych na ekspresję integryn α5β1

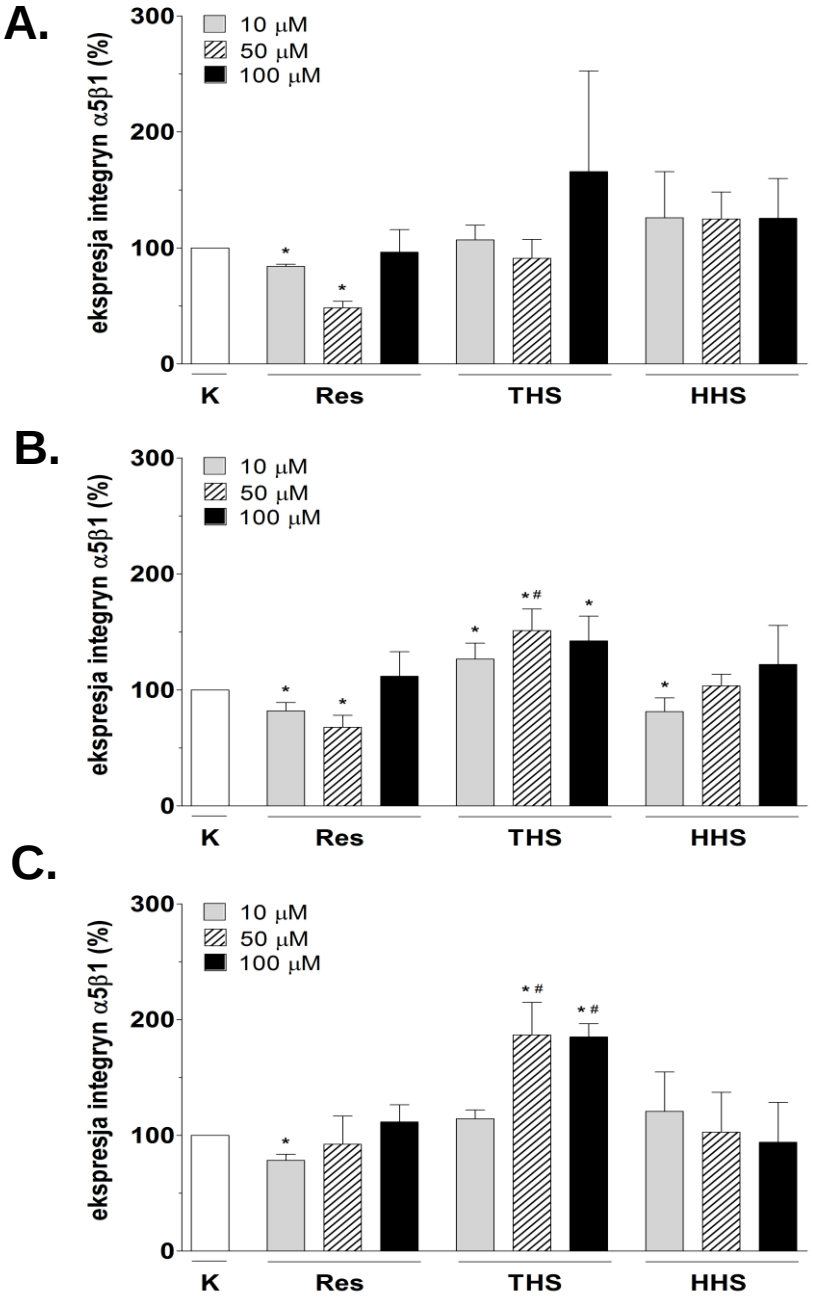
Całkowitą ekspresję integryn α5β1, odgrywających kluczową rolę w adhezji komórek raka jajnika do LKMO (a szczególnie związanej z błoną komórkową fibronektyny) [254], oznaczono w lizatach komórkowych za pomocą metody ELISA.

4.10.1. Komórki A2780

W wyniku 24-godzinnej ekspozycji komórek raka jajnika A2780 na resweratrol stwierdzono obniżenie stężenia integryn α5β1 o 16 ± 1% (przy stężeniu 10 μM) i 52 ± 4% (przy stężeniu 50 μM) w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej. W tym samym punkcie czasowym, żaden z zastosowanych analogów resweratrolu nie wpłynął na zmianę ekspresji ocenianych integryn (**Rycina 32A**).

W wyniku ekspozycji komórek przedłużonej do 48 godzin, resweratrol wywierał efekt zbliżony do tego, z wcześniejszego punktu czasowego, obniżając stężenie badanych integryn, odpowiednio, o 18 ± 5% (przy stężeniu 10 μM) i 32 ± 7% (przy stężeniu 50 μM). Jednocześnie, 3,3',4,4'-THS zwiększył stężenie integryn przy każdej z użytych dawek związku, odpowiednio o 26 ± 10% (dla 10 μM), 51 ± 13% (dla 50 μM) i 42 ± 15% (dla 100 μM). Z kolei drugi z analogów resweratrolu, stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS, okazał się obniżać komórkową zawartość integryn α5β1, przy czym efekt ten był widoczny tylko przy stężeniu związku 10 μM, a odnotowana redukcja wynosiła 19 ± 8% (**Rycina 32B**).

W trzeciej dobie eksperymentu, resweratrol nadal obniżał ekspresję integryn, jednak efektywne było już tylko stężenie 10 μM (obniżenie o 22 ± 4%). Stilben 3,3',4,4'-THS zwiększał z kolei produkcję integryn α5β1 jeszcze silniej niż w drugiej dobie ekspozycji, przy czym efektywne okazały się stężenia 50 i 100 μM (wzrost, odpowiednio, o 87 ± 20% i 82 ± 8%). W przeciwieństwie do niego, trzeci z badanych związków, 3,3',4,4',5,5'-HHS, nie wpływał w tym punkcie czasowym na komórkową zawartość badanych integryn (**Rycina 32C**).



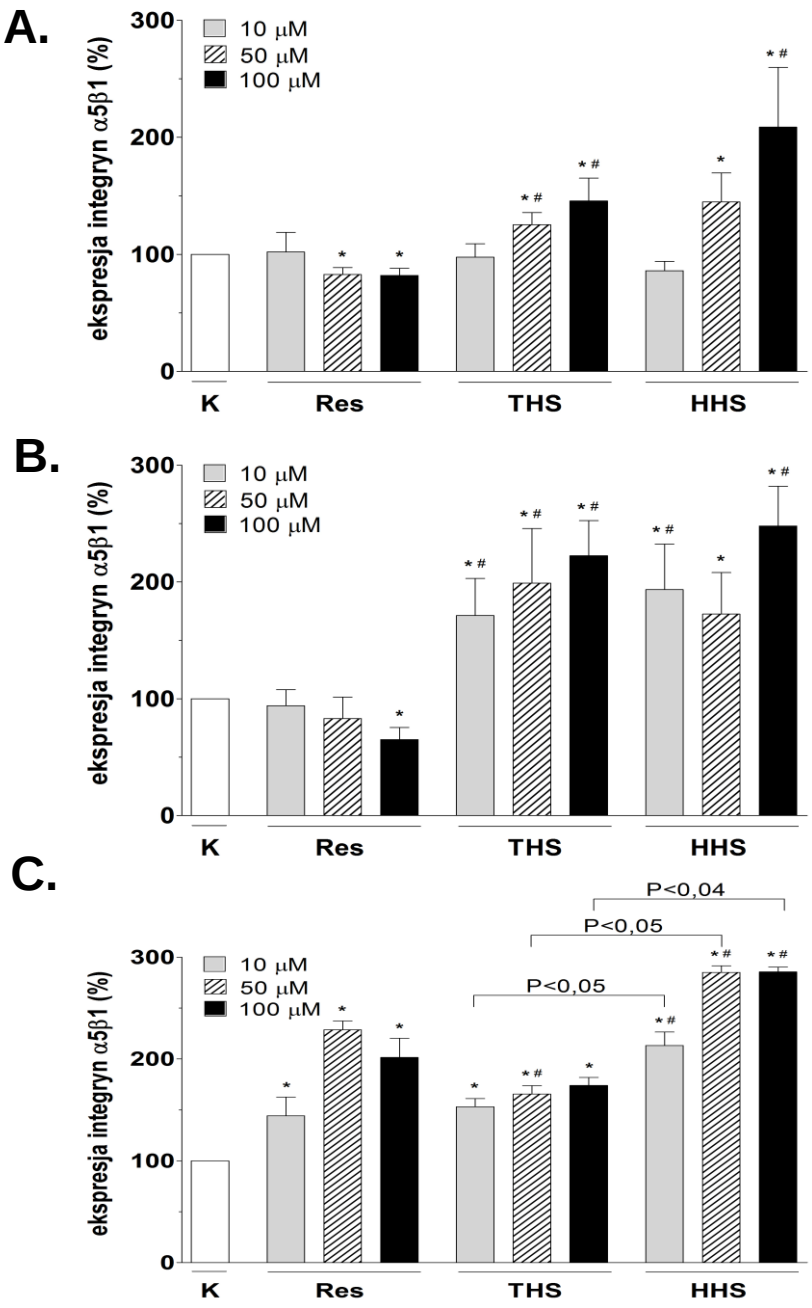
Rycina 32. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na stężenie integryn α5β1 w komórkach raka jajnika A2780 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 4 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.10.2. Komórki OVCAR-3

Ocena stężenia integryn integryn α5β1 w lizatach komórek OVCAR-3 poddawanych działaniu stilbenów wykazała, że po 24 godzinach ekspozycji resweratrol obniża tę wartość o 17 ± 6% (dla stężenia 50 μM) i 18 ± 6% (dla stężenia 100 μM) w porównaniu z grupą kontrolną. W odmienny sposób działały natomiast dwie syntetyczne pochodne resweratrolu, które w zgodny sposób podwyższały produkcję badanych integryn. W przypadku stilbenu 3,3',4,4'-THS odnotowano wzrost o 25 ± 11% (dla stężenia 50 μM) i o 46 ± 19% (dla stężenia 100 μM). Stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS zwiększał komórkowe stężenie integryn o 45 ± 25% (dla stężenia 50 μM) i o 109 ± 51% (dla stężenia 100 μM) (**Rycina 33A**).

Po 48 godzinach ekspozycji stwierdzono, iż reweratrol użyty w stężeniu 100 μM obniżył stężenie integryn α5β1 w komórkach o 35 ± 10% w porównaniu z grupą kontrolną. Syntetyczne analogi resweratrolu, podobnie jak w poprzednim punkcie czasowym powodowały wzrost produkcji badanych integryn, a wywierane przez nie efekty były bardzo zbliżone. Przykładowo, stilben 3,3',4,4'-THS użyty w stężeniu 10 μM podwyższał ekspresję integryn o 71 ± 32%, użyty w stężeniu 50 μM o 99 ± 47%, a użyty w stężeniu 100 μM o 122 ± 30% (**Rycina 33B**).

W trzeciej dobie eksperymentu, resweratrol niespodziewanie zmienił kierunek działania, czego odzwierciedleniem był wzrost produkcji integryn α5β1 przez komórki OVCAR-3. Pobudzające działanie resweratrolu obecne było przy każdym z użytych stężeń związku, a odnotowany wzrost wynosił 44 ± 18% (dla stężenia 10 μM), 129 ± 9% (dla stężenia 50 μM) i 102 ± 19% (dla stężenia 100 μM). Choć w tym punkcie czasowym stilben 3,3',4,4'-THS również zwiększał stężenie integryn, to, paradoksalnie, przy stężeniu związku wynoszącym 50 μM jego efekty działania były istotnie niższe w porównaniu z resweratrolem (wzrost o 66 ± 8%). W przypadku dwóch pozostałych stężeń tego analogu, wzrost poziomu integryn nie różnił się statystycznie od efektu wywieranego przez resweratrol. Najsilniej jednak pod kątem ocenianego parametru działał stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS, który pobudzał wzrost produkcji integryn α5β1 efektywniej niż resweratrol i 3,3',4,4'-THS. Przy stężeniu związku badanego 10 μM, stężenie integryn wzrosło o 113 ± 13%, przy stężeniu 50 μM o 185 ± 6%, a przy stężenu 100 μM o 186 ± 5% (**Rycina 33C**).



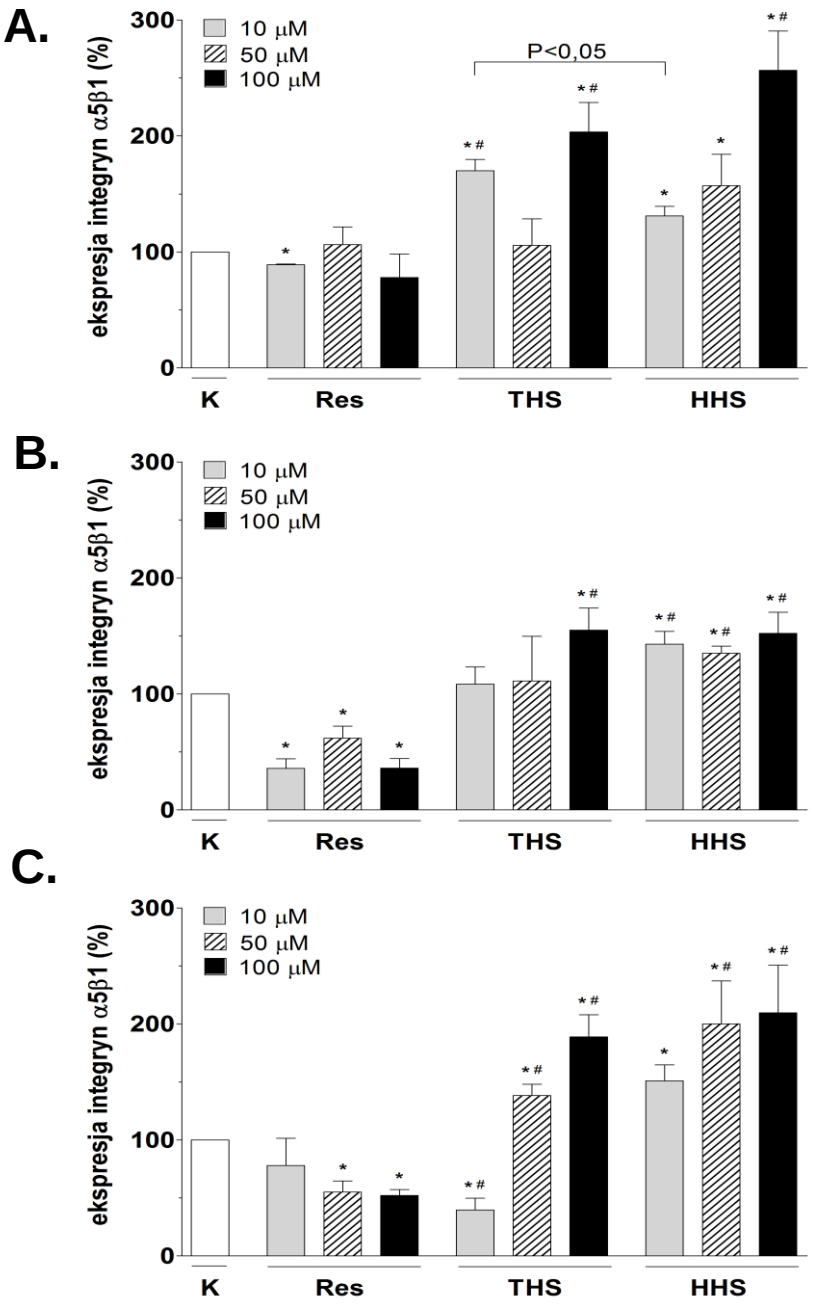
Rycina 33. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na stężenie integryn α5β1 w komórkach raka jajnika OVCAR-3 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 4 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.10.3. Komórki SKOV-3

Badania wykazały, że w wyniku 24-godzinnej ekspozycji komórek SKOV-3 na resweratrol w stężeniu 10 μM dochodzi do obniżenia produkcji integryn α5β1 o 11 ± 1% w porównaniu z grupą kontrolną. Z kolei stilben 3,3',4,4'-THS użyty w stężeniach 10 μM i 100 μM zwiększał produkcję badanych integryn o, odpowiednio, 70 ± 10% i 104 ± 25%. Trzeci z badanych związków, 3,3',4,4',5,5'-HHS wykazywał działanie pobudzające przy wszystkich zastosowanych stężeniach, a wzrost wynosił 31 ± 8%, 57 ± 27% i 157 ± 34% dla, odpowiednio, dawek 10, 50 i 100 μM (**Rycina 34A**).

W wyniku ekspozycji komórek przedłużonej do 48 godzin pogłębił się efekt działania resweratrolu, który obniżył produkcję integryn przy każdym z użytych stężeń, przy czym najsilniejszy, a zarazem identyczny, spadek odnotowano dla stężeń 10 i 100 μM (o 64 ± 8%). W tym punkcie czasowym dwa syntetyczne stilbeny zwiększały produkcję integryn, jednak 3,3',4,4'-THS powodował ten efekt tylko przy stężeniu 100 μM (wzrost o 55 ± 8%), natomiast 3,3',4,4',5,5'-HHS przy każdym z użytych stężeń. W tym przypadku największy wzrost w stosunku do grupy komórek kontrolnych (wynoszący 52 ± 18%) stwierdzono dla stężenia 100 μM (**Rycina 34B**).

W trzeciej dobie doświadczenia resweratrol utrzymał swoją aktywność, obniżając komórkowe stężenie integryn α5β1 w sposób bardzo zbliżony do poprzedniego punktu czasowego. Z kolei w przypadku stilbenu 3,3',4,4'-THS użytego w stężeniu 10 μM odnotowano obniżenie poziomu integryn o 60 ± 10%, a efekt ten był silniejszy statystycznie w porównaniu z działaniem resweratrolu. Z kolei przy stężeniach wyższych, tj. 50 i 100 μM związek ten stymulował produkcję integryn, czyniąc to najsilniej przy stężeniu najwyższym (wzrost o 89 ± 19%). Trzeci ze związków, 3,3',4,4',5,5'-HHS zwiększał produkcję integryn przy każdym z użytych stężeń, przy czym dla stężeń 50 i 100 μM odnotowane efekty były porównywalne z działaniem 3,3',4,4'-THS (**Rycina 34C**).



Rycina 34. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na stężenie integryn α5β1 w komórkach raka jajnika SKOV-3 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 4 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.11. Wpływ resweratrolu i jego pochodnych na migrację komórek raka jajnika

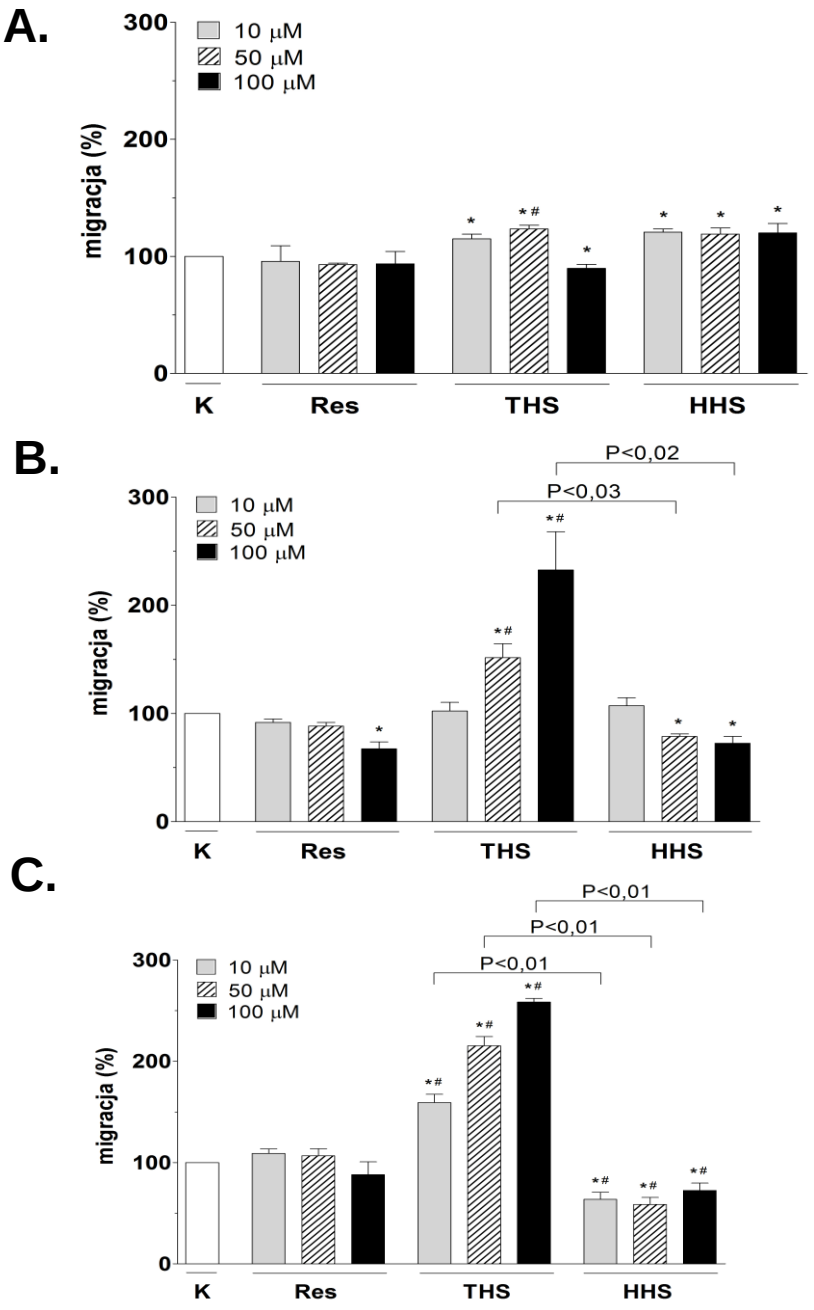
Zmiany migracji komórek nowotworowych oceniono pod kątem autokrynnego wpływu chemotaktycznego czynników wydzielnych do środowiska (medium kondycjonowanego) przez komórki raka jajnika poddawane działaniu badanych związków.

4.11.1. Komórki A2780

Badania dowiodły, że komórki raka jajnika A2780 eksponowane na resweratrol przez 24 godziny nie wykazują zmian w efektywności migracji w kierunku medium kondycjonowanego. Jednocześnie, migracja komórek poddawanych działaniu 3,3',4,4'-THS w stężeniach 10 i 50 μM była wyższa w porównaniu z grupą kontrolną o, odpowiednio, 15 ± 6% i 23 ± 5%. Natomiast pod wpływem działania związku w stężeniu 100 μM zaobserwowano obniżenie migracji komórek o 11 ± 3%. Stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS wywierał działanie pobudzające migrację komórek przy każdym z użytych stężeń, a skala tego efektu była porównywalna z działaniem 3,3',4,4'-THS w stężeniu 50 μM (**Rycina 35A**).

W wyniku przedłużenia ekspozycji komórek do 48 godzin resweratrol użyty w stężeniu 100 μM zahamował migrację komórek A2780 o 33 ± 12% w porównaniu z grupą kontrolną. Jednocześnie doszło do spotęgowania pobudzającego migrację działania 3,3',4,4'-THS, który przy stężeniu 50 μM pobudził to zjawisko o 52 ± 34%, a przy stężeniu 100 μM o 133 ± 80%. Z kolei stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS, który w pierwszej dobie także pobudzał migrację, po dwóch dobach ekspozycji wykazywał działanie hamujące ten proces. W stężeniu 50 μM związek ten zmniejszył migrację komórek nowotworowych o 21 ± 5%, natomiast w stężeniu 100 μM o 27 ± 13%. Efekty wywierane przez 3,3',4,4',5,5'-HHS nie różniły się statystycznie od tych, wywoływanych przez resweratrol, natomiast rozpatrując stężenia 50 i 100 μM były one znamiennie słabsze od efektów działania 3,3',4,4'-THS (**Rycina 35B**).

Po 72 godzinach ekspozycji działanie antymigracyjne resweratrolu zanikło, natomiast działanie promigracyjne 3,3',4,4'-THS utrzymało się, dodatkowo ujawniając się przy stężeniu 10 μM. Pobudzenie migracji komórek pod wpływem tego związku było znacząco silniejsze niż po dwóch dobach ekspozycji, szczególnie w odniesieniu do stężenia 50 μM (wzrost migracji o 115 ± 24%). Stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS zachował w tym punkcie czasowym swoje działanie hamujące migrację, które objęło wszystkie stężenia związku. Przy stężeniu 10 μM migracja zmniejszyła się o 36 ± 18%, przy stężeniu 50 μM o 41 ± 18%, a przy stężeniu 100 μM o 28 ± 19% w porównaniu do grupy kontrolnej (**Rycina 35C**).



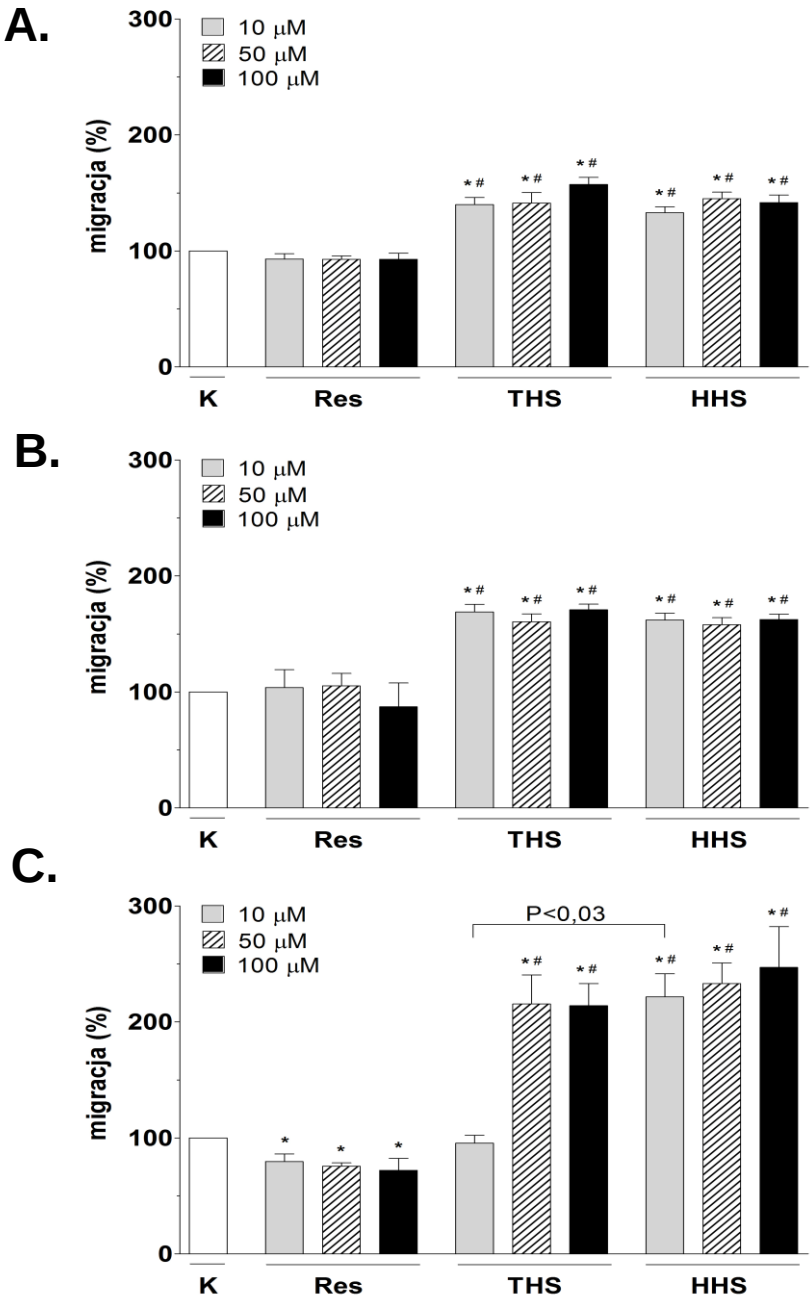
Rycina 35. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na migrację komórek raka jajnika A2780 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 8 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.11.2. Komórki OVCAR-3

W wyniku 24-godzinnej ekspozycji komórek raka jajnika OVCAR-3 na resweratrol nie zaobserwowano zmian w efektywności migracji komórek w kierunku medium kondycjonowanego. Natomiast oba syntetyczne analogi resweratrolu, tj. 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS wykazywały działanie pobudzające migrację, przy czym nie stwierdzono istotnych różnic między efektami wywieranymi przez oba związki. Przykładowo, 3,3',4,4'-THS użyty w stężeniu 10 μM pobudzał migrację komórek nowotworowych o 40 ± 15%, w stężeniu 50 μM o 41 ± 20%, a w stężeniu 100 μM o 57 ± 16% w porównaniu z grupą kontrolną (**Rycina 36A**).

W rezultacie przedłużenia ekspozycji komórek do 48 godzin zaobserwowane efekty były analogiczne do tych, opisujących wcześniejszy punkt czasowy. Oznacza to, że resweratrol ponownie nie wykazywał zdolności modyfikowania migracji komórek pod wpływem chemotaktycznego działania medium kondycjonowanego, natomiast oba jego syntetyczne analogi pobudzały migrację w całym zakresie stężeń, w stopniu identycznym jak po 24 godzinach inkubacji. Także i teraz nie odnotowano różnic w sile działania obu pochodnych resweratrolu (**Rycina 36B**).

Badanie przedłużone do 72 godzin ujawniło antymigracyjne działanie resweratrolu, który użyty w stężeniu 10 μM zahamował ten proces o 20 ± 12%, w stężeniu 50 μM o 24 ± 5%, a w stężeniu 100 μM o 28 ± 17% w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej. Jednocześnie zaobserwowano znaczące wzmocnienie promującego migrację działania obu syntetycznych pochodnych resweratrolu, przy czym skala efektów wywieranych przez oba związki nie różniła się między sobą, za wyjątkiem stężenia 10 μM, przy którym efekt wywierany przez 3,3',4,4',5,5'-HHS był znacząco silniejszy w porównaniu z 3,3',4,4'-THS. W tym właśnie stężeniu stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS pobudzał migrację komórek OVCAR-3 o 122 ± 44%, użyty w stężeniu 50 μM o 133 ± 45%, natomiast w stężeniu 100 μM pobudzał to zjawisko o 147 ± 86% w porównaniu z grupą kontrolną (**Rycina 36C**).



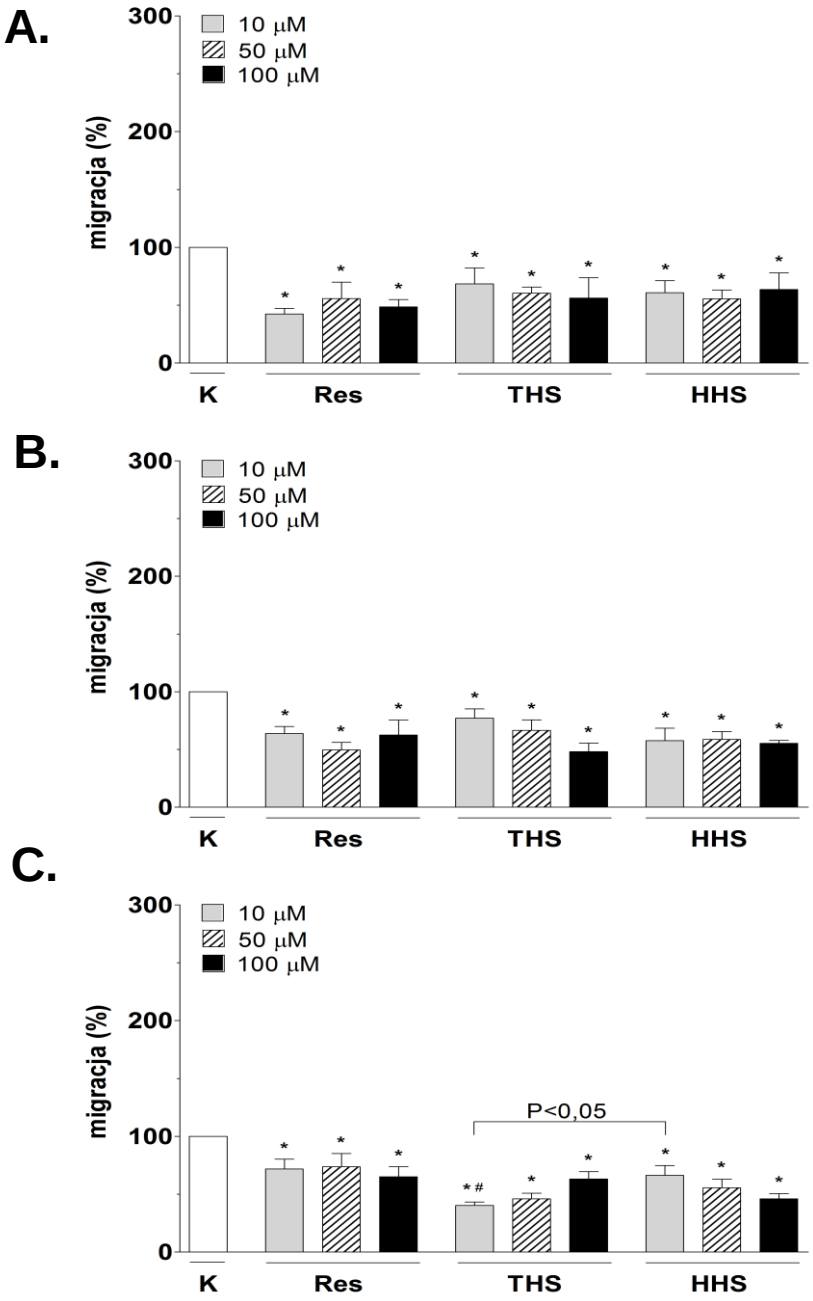
Rycina 36. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na migrację komórek raka jajnika OVCAR-3 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 8 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.11.3. Komórki SKOV-3

W przeciwieństwie do dwóch poprzednich typów komórek raka jajnika, 24-godzinna ekspozycja komórek SKOV-3 na badane stilbeny spowodowała znaczące zahamowanie migracji komórek w kierunku medium kondycjonowanego, który to efekt odnotowano dla wszystkich trzech związków badanych. Skala zahamowania migracji komórek nowotworowych pod wpływem trzech stilbenów była bardzo podobna. W przypadku resweratrolu, związek użyty w stężeniu 10 μM spowodował obniżenie migracji komórek o 57 ± 11%, w stężeniu 50 μM o 44 ± 25%, a w stężeniu 100 μM o 51 ± 13% w porównaniu z grupą kontrolną. Dla porównaniu, stilben 3,3',4,4'-THS użyty w stężeniu 10 μM hamował migrację o 31 ± 31%, w stężeniu 50 μM o 40 ± 11%, a w stężeniu 100 μM o 44 ± 31% (**Rycina 37A**).

Po ekspozycji komórek trwającej 48 godzin, antymigracyjne efekty wywierane przez związki badane utrzymały się w postaci praktycznie niezmienionej w porównaniu z pierwszym punktem czasowym eksperymentu. Aktywność żadnego z syntetycznych stilbenów nie różniła się w sposób znaczący ani między sobą, ani w porównaniu z resweratrolem (**Rycina 37B**).

W trzecim z punktów czasowych, tj. po 72 godzinach eksperymentu stwierdzono, że wpływ stilbenów na zjawisko migracji komórek nowotworowych nie uległ zmianie. Jednocześnie uwagę zwracał efekt wywoływany przez 3,3',4,4'-THS w stężeniu 10 μM, kiedy to związek ten obniżył migrację komórek o 60 ± 7%, czyniąc to w sposób istotnie wyższy w porównaniu z resweratrolem. Przy tym stężeniu antymigracyjne działanie 3,3',4,4'-THS było także istotnie silniejsze niż drugiego analogu, 3,3',4,4',5,5'-HHS (**Rycina 37C**).



Rycina 37. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na migrację komórek raka jajnika SKOV-3 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 8 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.12. Wpływ resweratrolu i jego pochodnych na wydzielanie kwasu hialuronowego

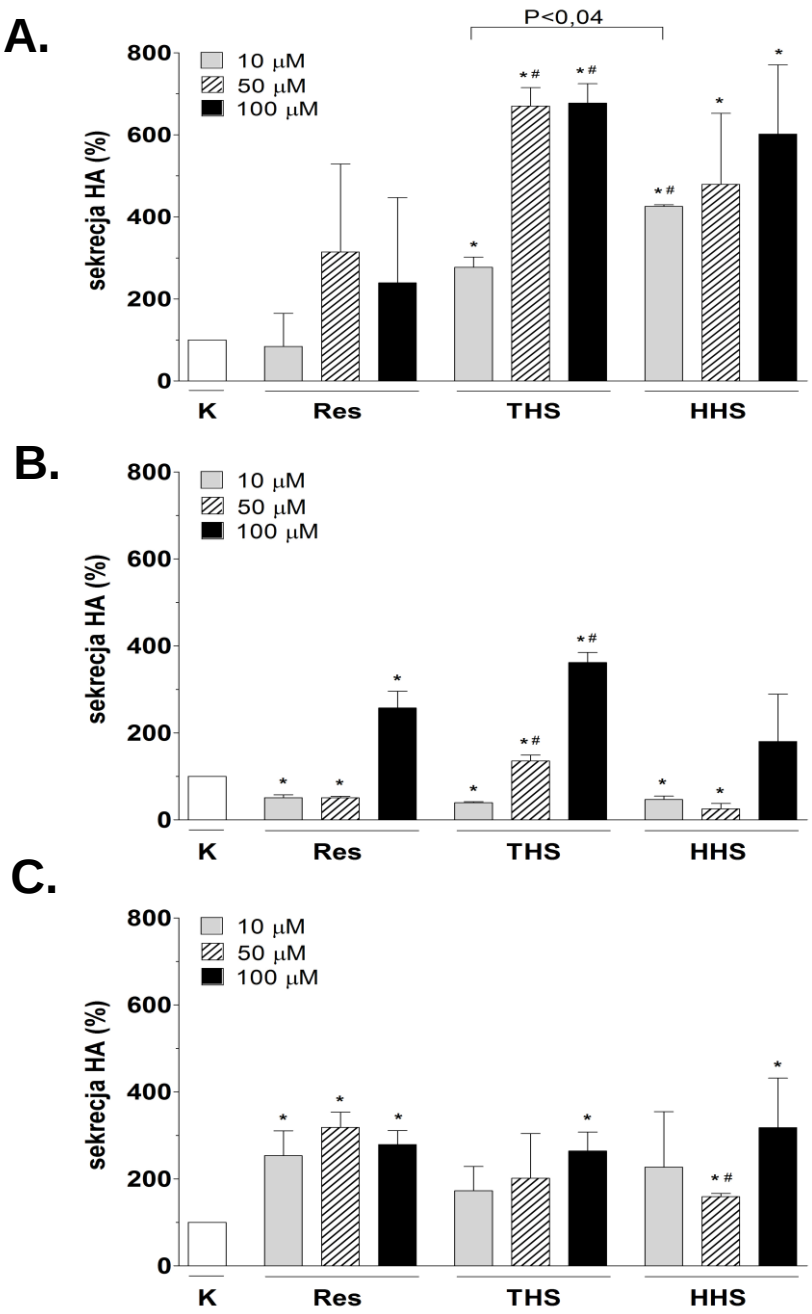
Kwas hialuronowy (HA) jest jednym z mediatorów migracji komórek raka jajnika, zachodzącej w kierunku chemotaktycznego działania medium kondycjonowanego wygenerowanego przez LKMO [100]. W niniejszych badaniach oceniono wpływ stilbenów na stężenie HA w medium kondycjonowanm, wytworzonym przez komórki nowotworowe, które mogłyby wykorzystywać ten czynnik do autokrynnej stymulacji procesu migracji.

4.12.1. Komórki A2780

Stwierdzono, że 24-godzinna ekspozycja komórek A2780 na resweratrol nie powoduje zmian w wydzielaniu HA do wygenerowanego przez nie medium kondycjonowanego. Z kolei ekspozycja komórek na 3,3',4,4'-THS spowodowała wzrost wydzielania HA przy każdym z użytych stężeń związku, przy czym zdecydowanie najwyższy wzrost odnotowano dla stężeń 50 μM (o 570 ± 46%) i 100 μM (o 578 ± 48%). Drugi z syntetycznych analogów resweratrolu, 3,3',4,4',5,5'-HHS także pobudzał wydzielanie HA do medium hodowlanego, przy czym efekt odnotowany dla stężenia 10 μM (wzrost o 326 ± 4%) był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu z działaniem 3,3',4,4'-THS (**Rycina 38A**).

W następstwie ekspozycji komórek przedłużonej do 48 godzin, resweratrol użyty w stężeniach 10 i 50 μM obniżał sekrecję HA (odpowiednio o 49 ± 7% i 47 ± 1%), natomiast w stężeniu 100 μM produkcję HA podwyższał (o 158 ± 39%). Stilben 3,3',4,4'-THS obniżał wydzielanie HA przy stężeniu 10 μM (o 60 ± 2%), natomiast przy stężeniach 50 i 100 μM wydzielanie podwyższał o, odpowiednio, 36 ± 13% i 262 ± 23%. Z kolei stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS wpływał na wydzielanie HA tylko przy stężeniach 10 i 50 μM, i w obu przypadkach było to działanie hamujące (odpowiednio o 53 ± 8% i 74 ± 12%) (**Rycina 38B**).

W trzeciej dobie ekspozycji, resweratrol ponownie wykazywał działanie pobudzające sekrecję HA przez komórki, a odnotowany efekt był porówywalny dla wszystkich trzech stężeń związku (przykładowo, wzrost o 218 ± 35% dla stężenia 50 μM). Stilben 3,3',4,4'-THS pobudzał wydzielanie HA tylko przy stężeniu 100 μM (o 164 ± 44%), natomiast stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS nasilał to zjawisko przy stężeniach 50 i 100 μM (wzrost o, odpowiednio, 59 ± 7% i 218 ± 114%) (**Rycina 38C**).



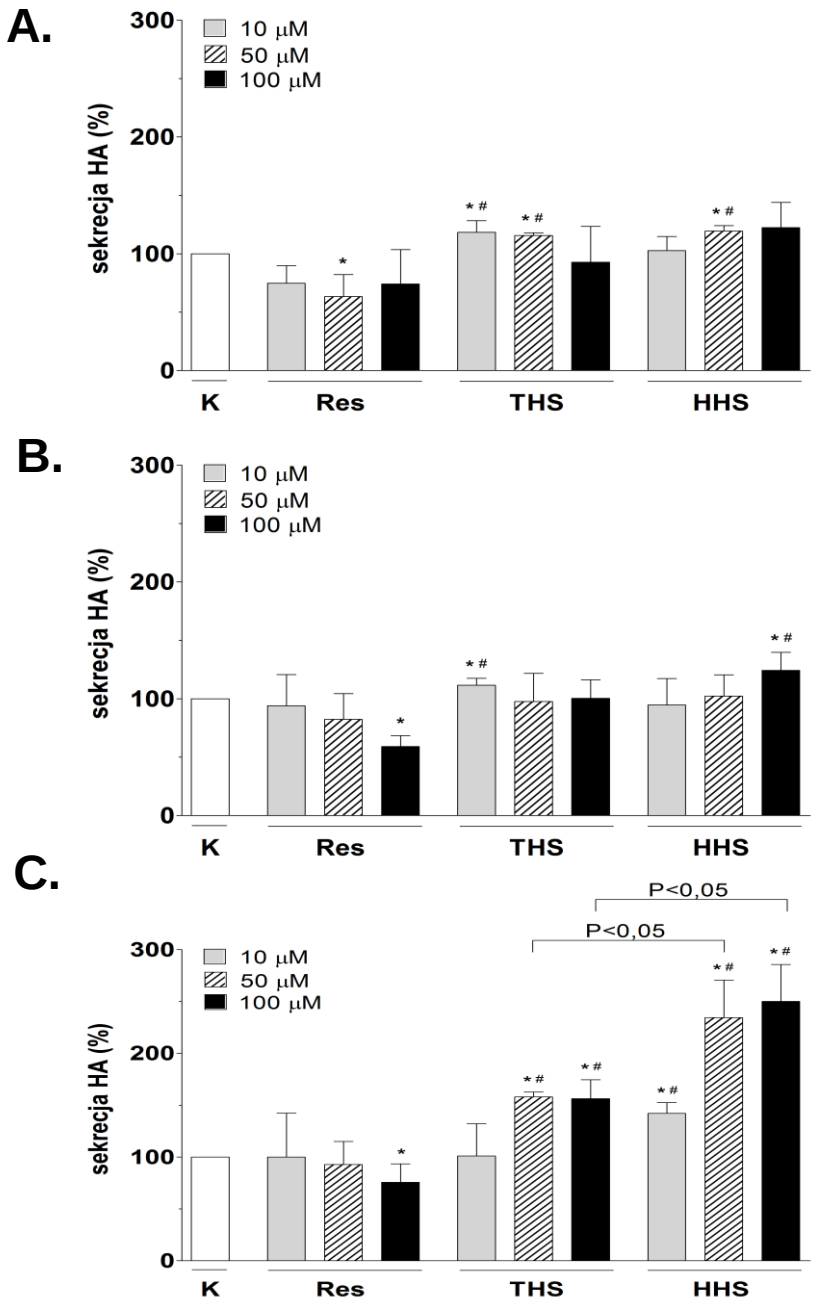
Rycina 38. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na produkcję kwasu hialuronowego (HA) przez komórki raka jajnika A2780 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 4 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.12.2. Komórki OVCAR-3

Stwierdzono, że ekspozycja komórek raka jajnika OVCAR-3 na resweratrol w stężeniu 50 μM powoduje obniżenie sekrecji HA o 37 ± 19% po 24 godzinach ekspozycji. Z kolei dwa syntetyczne analogi resweratrolu powodują wzrost wydzielania HA do medium kondycjonowanego, przy czym stilben 3,3',4,4'-THS czyni to przy stężeniach 10 μM i 50 μM (wzrost o, odpowiednio, 19 ± 9% i 16 ± 2%), natomiast stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS tylko przy stężeniu 50 μM (wzrost o 19 ± 5%) (**Rycina 39A**).

W wyniku ekspozycji komórek przedłużonej do 48 godzin doszło do obniżenia produkcji HA przez komórki eksponowane na resweratrol, jednak efekt ten był widoczny tylko przy stężeniu 100 μM (obniżenie o 41 ± 9%). Ekspozycja komórek na 3,3',4,4'-THS spowodowała wzrost wydzielania HA do medium, a efekt ten zachodził przy stężeniu 10 μM (wzrost o 12 ± 4%). Z kolei w odniesieniu do stilbenu 3,3',4,4',5,5'-HHS zaobserwowano wzrost sekrecji HA przy użyciu stężenia 100 μM, a wzrost ten wynosił 24 ± 12% w stosunku do komórek grupy kontrolnej (**Rycina 39B**).

Trzecia doba ekspozycji komórek OVCAR-3 na badane związki zaowocowała nieznacznym obniżeniem sekrecji HA pod wpływem resweratrolu użytego w stężeniu 100 μM (obniżenie o 24 ± 14%) oraz bardzo silnym wzrostem jego wydzielania pod wpływem dwóch syntetycznych stilbenów. W odniesieniu do 3,3',4,4'-THS stwierdzono, że związek ten w stężeniu 10 μM podwyższa wydzielanie HA do medium o 42 ± 10%, w stężeniu 50 μM o 134 ± 36%, a w stężeniu 100 μM o 150 ± 36%, w porównaniu z grupą kontrolną. Zarówno w stężeniu 50 μM, jak i 100 μM efekty wywierane przez 3,3',4,4',5,5'-HHS były silniejsze niż działanie 3,3',4,4'-THS (**Rycina 39C**).



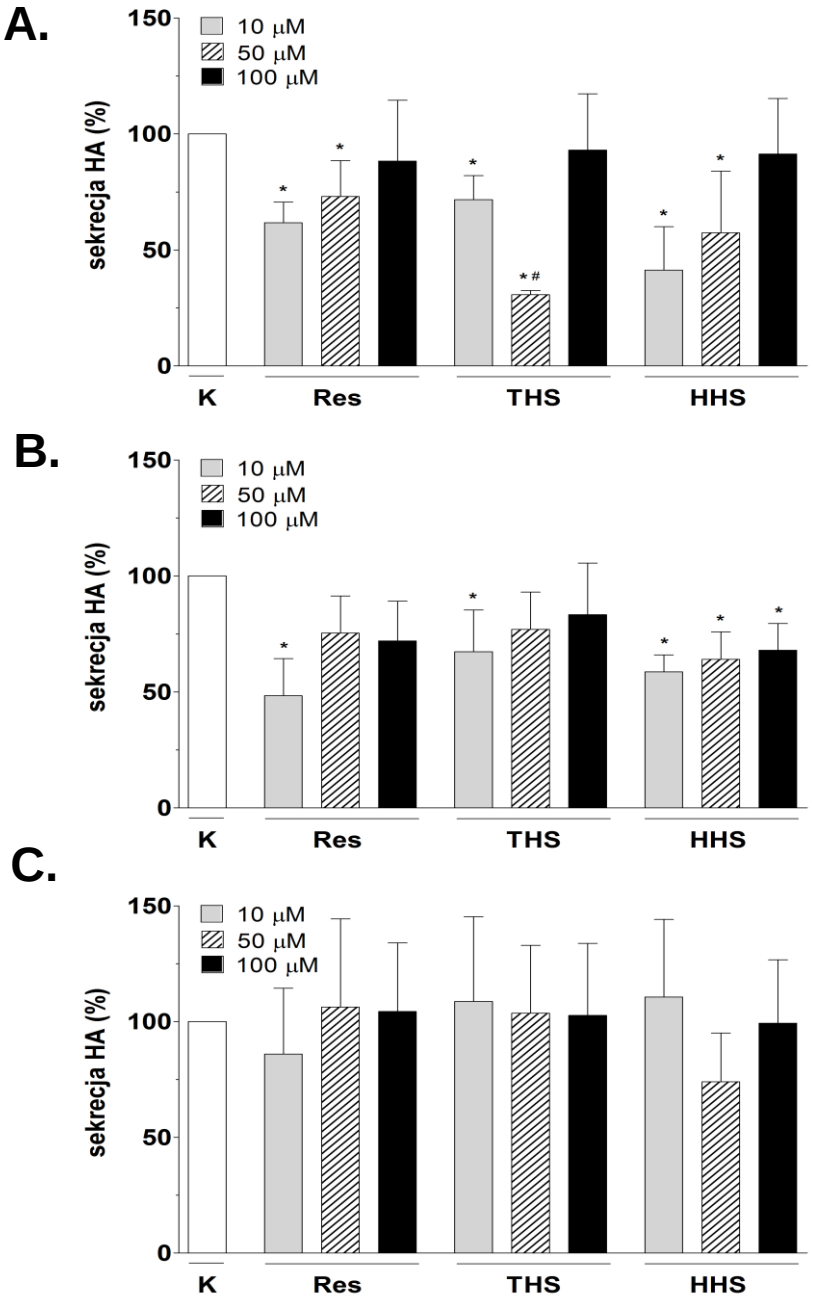
Rycina 39. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na produkcję kwasu hialuronowego (HA) przez komórki raka jajnika OVCAR-3 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 4 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.12.3. Komórki SKOV-3

Badania przeprowadzone na komórkach raka jajnika linii SKOV-3 wykazały, że w wyniku ekspozycji komórek na badane związki trwającej 24 godziny, wszystkie trzy stilbeny zmniejszają wydzielanie HA do medium kondycjonowanego. Resweratrol wykazywał takie działanie przy stężeniach 10 μM (obniżenie o 38 ± 9%) i 50 μM (obniżenie o 21 ± 14%). W tych samych stężeniach swą aktywność ujawnił 3,3',4,4'-THS, który przy niższym stężeniu zahamował wydzielanie HA o 29 ± 9%, a przy wyższym stężeniu o 26 ± 3%. Analogicznie stytuacja miała się w przypadku drugiego z analogów, 3,3',4,4',5,5'-HHS, który przy stężeniu 10 μM obniżał wydzielanie HA o 22 ± 12%, a przy stężeniu 50 μM o 43 ± 25% (**Rycina 40A**).

W wyniku ekspozycji przedłużonej do 48 godzin, resweratrol hamował wydzielanie HA tylko przy stężeniu 10 μM (obniżenie o 52 ± 16%). W tym samym stężeniu aktywny był także 3,3',4,4'-THS, który obniżył wydzielanie HA do środowiska hodowlanego o 33 ± 15%). Trzeci z badanych związków, 3,3',4,4',5,5'-HHS działał hamująco, w porównywalny sposób, przy każdym z użytych stężeń (obniżenie o 41 ± 7% dla 10 μM, o 36 ± 12 dla 50 μM i o 32 ± 12% dla 100 μM) (**Rycina 40B**).

Ocena stężenia HA w medium kondycjonowanym z hodowli komórek SKOV-3, poddawanych działaniu badanych stilbenów wykazała, że związki te nie wpływały na zmianę sekrecji HA po 72 godzinach ekspozycji (**Rycina 40C**).



Rycina 40. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na produkcję kwasu hialuronowego (HA) przez komórki raka jajnika SKOV-3 po 24 (A), 48 (B) i 72 (C) godzinach ekspozycji. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na 4 odrębnych hodowlach komórek nowotworowych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.13. Wpływ resweratrolu i jego pochodnych na angiogenezę zależną od LKMO

Celem tej grupy doświadczeń była analiza dwóch wykładników procesu angiogenezy, tj. proliferacji i migracji komórek śródbłonka naczyniowego (HUVEC) *in vitro*, w odpowiedzi na czynniki rozpuszczalne, wydzielone do medium kondycjonowanego przez LKMO poddawane działaniu związków badanych. Kontekst eksperymentalny tych badań poszerzono o proces replikacyjnego starzenia się LKMO.

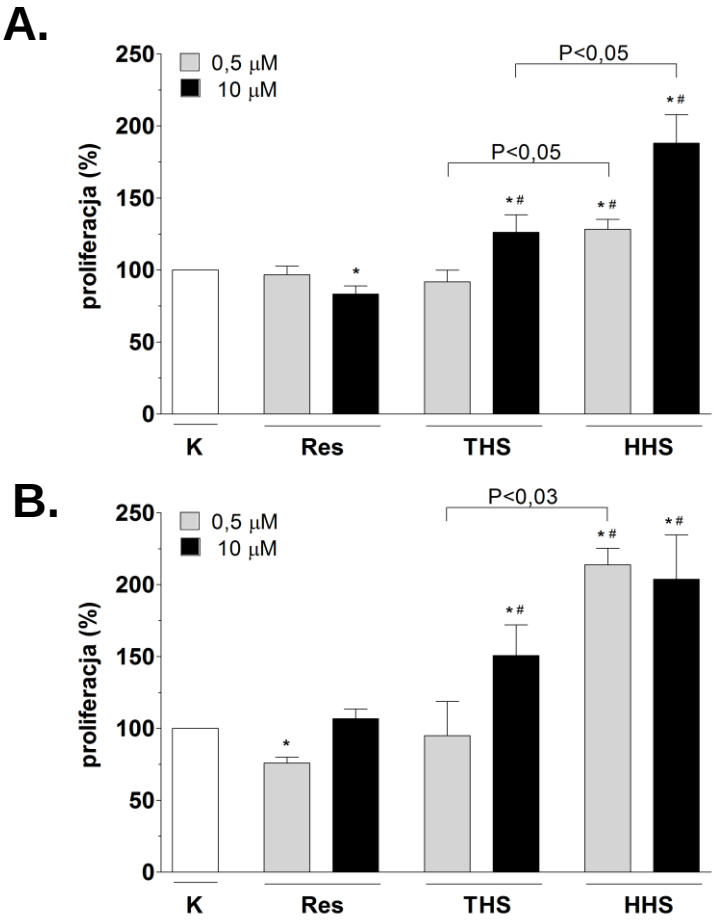
Stężenia stilbenów użyte w tych eksperymentach różniły się od tych, stosowanych w przypadku wcześniejszych doświadczeń na komórkach nowotworowych. Jako pierwsze wykorzystano stężenie 0,5 μM, przy którym — jak wykazały wcześniejsze badania — resweratrol opóźnia tempo starzenia się LKMO [189]. Drugim z użytych stężeń było 10 μM, które okazało się być najwyższym nietoksycznym stężeniem resweratrolu oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS w stosunku do LKMO [166;247]. Odmienny w tych badaniach był także czas ekspozycji komórek (LKMO) na stilbeny. Komórki określane jako "młode" były poddawane działaniu tych związków przez 14 dni, natomiast komórki "stare" eksponowane były na stilbeny przez cały okres ich aktywności proliferacyjnej, wynoszący przeciętnie 40 dni.

4.13.1. Proliferacja komórek śródbłonka naczyniowego

Badania wykazały, że ekspozycja komórek śródbłonka naczyniowego HUVEC na media wygenerowane przez młode hodowle LKMO eksponowane na resweratrol w stężeniu 10 μM powoduje obniżenie proliferacji komórek o 17 ± 6% w porównaniu z grupą kontrolną. Z kolei w przypadku komórek poddawanych działaniu mediów z hodowli LKMO eksponowanych na analogi resweratrolu dochodzi do znaczącego pobudzenia proliferacji. Stilben 3,3',4,4'-THS w stężeniu 10 μM powodował, w sposób pośredni (LKMO-zależny), wzrost aktywności podziałowej komórek śródbłonkowych o 26 ± 12%, natomiast 3,3',4,4',5,5'-HHS działał efektywnie przy obu użytych stężeniach, pobudzając proliferację komórek o 28 ± 7% (przy stężeniu 0,5 μM) oraz o 88 ± 20% (przy stężeniu 10 μM). Co ważne, efekty pobudzenia proliferacji wywierane przez 3,3',4,4',5,5'-HHS były istotnie statystycznie wyższe od tych, wynikających z działania 3,3',4,4'-THS, przy obu użytych stężeniach (**Rycina 40A**).

Analiza tego parametru z wykorzystaniem mediów kondycjonowanych wygenerowanych przez stare LKMO pokazała, że resweratrol ponownie wywiera działanie antyproliferacyjne względem komórek HUVEC (obniżenie aktywności podziałowej o 24 ± 4%), przy czym

czyni to przy niższym z użytych stężeń (0,5 μM). Syntetyczne analogi resweratrolu, podobnie jak w przypadku hodowli młodych, pobudzały zależną od LKMO proliferację hodowli HUVEC w stopniu porównywalnym do efektu wywieranego przez media z hodowli komórek młodych. Wzmocnieniu uległo działanie 3,3',4,4',5,5'-HHS zastosowanego w stężeniu 0,5 μM, które w tym układzie doświadczalnym hamowało proliferację komórek w stopniu porównywalnym z działaniem stężenia 10 μM. W odniesieniu do niższego ze stężeń związku, działanie 3,3',4,4',5,5'-HHS było znacząco silniejsze w porównaniu z 3,3',4,4'-THS (**Rycina 40B**).

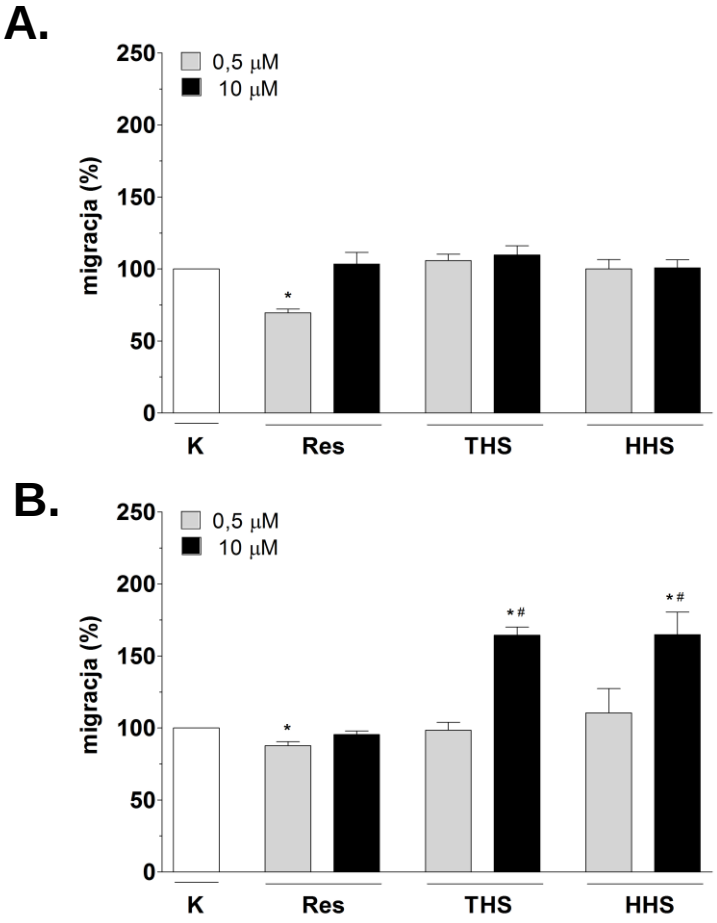


Rycina 40. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na zależną od młodych (A) i starych (B) LKMO proliferację komórek śródbłonka naczyniowego HUVEC. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach, z wykorzystaniem mediów pobranych z 9-12 hodowli LKMO, pochodzących od różnych dawców. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

4.13.2. Migracja komórek śródbłonka naczyniowego

Ocena migracji komórek śródbłonka naczyniowego HUVEC pod wpływem medium kondycjonowanego z hodowli młodych LKMO eksponowanych na stilbeny wykazała, że jedynym związkiem wpływającym na ten parametr jest resweratrol, ktróry użyty w stężeniu 0,5 µM hamuje proces migracji o 30 ± 3% (**Rycina 41A**).

Wyniki badania wykonanego z użyciem mediów ze starych LKMO wykazały, że resweratrol w stężeniu 0,5 µM hamuje migrację komórek HUVEC o 12 ± 3%. Jednocześnie 3,3',4,4'-THS użyty w stężeniu 10 µM nasilał ten proces o 64 ± 6%, a 3,3',4,4',5,'-HHS zwiększał migrację o 65 ± 16% w porównaniu z grupą kontrolną (**Rycina 41B**).



Rycina 41. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na zależną od młodych (A) i starych (B) LKMO migrację komórek śródbłonka naczyniowego HUVEC. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach, z wykorzystaniem mediów pobranych z 9-12 hodowli LKMO, pochodzących od różnych dawców. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

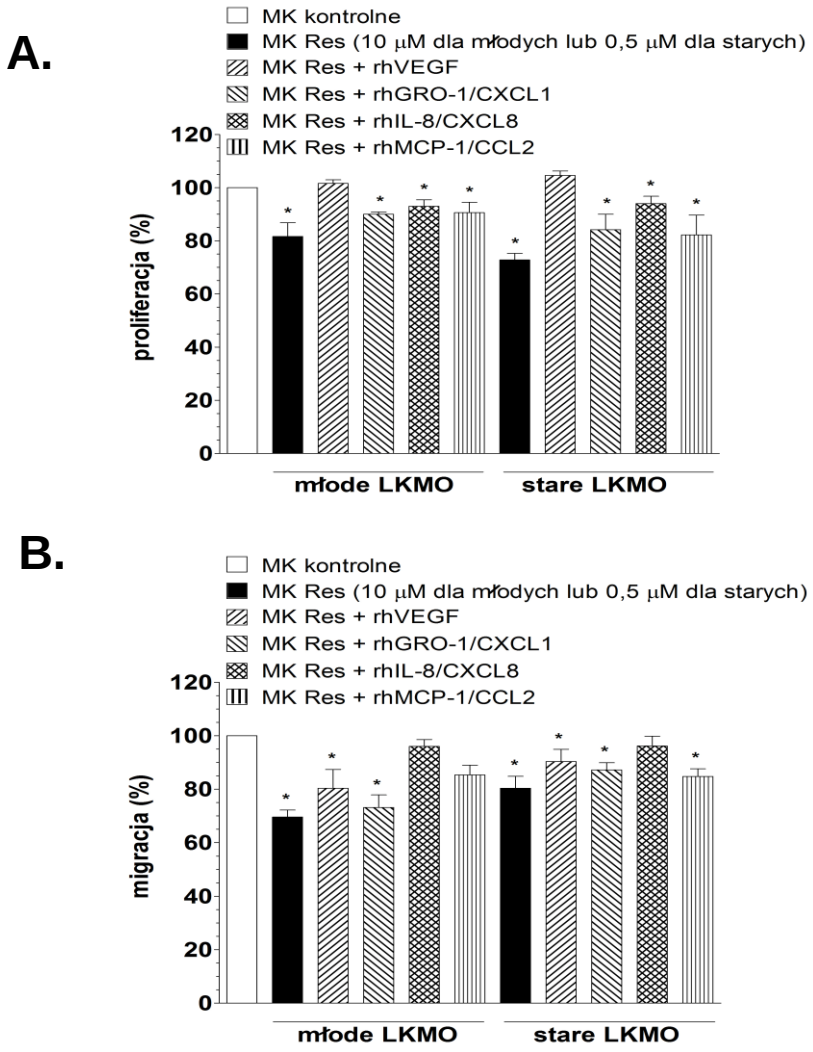
4.13.3. Identyfikacja mediatorów działania resweratrolu

Celem określenia mediatorów, odpowiedzialnych za antyproliferacyjny i antymigracyjny wpływ mediów kondycjonowanych, wygenerowanych przez LKMO poddawane działaniu resweratrolu przeprowadzono badania interwencyjne z wykorzystaniem egzogennych rekombinowanych form wybranych mediatorów angiogenezy, tj. VEGF, GRO-1/CXCL1, IL-8/CXCL8 i MCP-1/CCL2. Czynniki te dodawano do próbek medium kondycjonowanego w stężeniu odpowiadającym różnicy między stężeniem danego czynnika w medium kontrolnym oraz w medium pochodzącym z hodowli LKMO eksponowanej na resweratrol (na podstawie wyników uzyskanych w rozprawie doktorskiej [247]). Doświadczenia te wykazały, że tylko w przypadku dodania do medium egzogennej formy VEGF następuje przywrócenie proliferacji komórek do wartości charakteryzujących grupę kontrolną. Prawidłowość ta była obecna w doświadczeniach z wykorzystaniem mediów kondycjonowanych zarówno z hodowli młodych, jak i starych LKMO (**Rycina 42A**).

Oceniając w analogiczny sposób migrację komórek śródbłonkowych stwierdzono, że przywrócenie migracji do poziomu cechującego grupę kontrolną jest możliwe tylko po zastosowaniu egzogennej rekombinowanej formy IL-8/CXCL8. Podobnie jak w przypadku proliferacji, efekt ten występował zarówno w przypadku mediów kondycjonowanych z hodowli młodych, jak i starych LKMO (**Rycina 42B**).

4.13.4. Identyfikacja mediatorów działania analogów resweratrolu

W celu identyfikacji rozpuszczalnych mediatorów wzmożonej proliferacji i migracji komórek HUVEC pod wpływem syntetycznych stilbenów przeprowadzono doświadczenia, w których oba procesy oceniono w obecności mediów z dodatkiem specyficznych przeciwciał neutralizujących VEGF, GRO-1/CXCL1, IL-8/CXCL8 i MCP-1/CCL2. Badania te wykazały, że do zahamowania proliferacji komórek dochodzi w wyniku wzbogacenia medium z hodowli młodych i starych LKMO eksponowanych na 3,3',4,4'-THS w stężeniu 10 μM w przeciwciała neutralizujące VEGF i IL-8/CXCL8. W przypadku 3,3',4,4',5,5'-HHS stwierdzono, że w odniesieniu do mediów z młodych i starych LKMO poddawanych działaniu związku w stężeniu 0,5 μM, skuteczne jest zablokowanie VEGF, natomiast w odniesieniu do stężenia 10 μM, zarówno neutralizacja VEGF, jak i IL-8/CXCL8 (**Tabela 12**).



Rycina 42. Wpływ egzogennych rekombinowanych form mediatorów angiogenezy na proliferację (A) i migrację (B) komórek śródbłonka naczyniowego HUVEC w odpowiedzi na medium kondycjonowane (MK) z hodowli młodych i starych LKMO eksponowanych na resweratrol (Res). Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach, z wykorzystaniem mediów pobranych z 9-12 hodowli LKMO, pochodzących od różnych dawców. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie ($P<0,05$) w porównaniu z komórkami kontrolnymi.

Tabela 12. Wpływ przeciwciał neutralizujących skierowanych przeciwko czynnikom angiogennym na zależną od LKMO proliferację komórek śródbłonka naczyń. Wartości wyrażono jako % proliferacji komórek śródbłonkowych traktowanych medium kondycjonowanym z hodowli LKMO poddawanych działaniu stilbenów (i uznawanych jako 100%). W przypadku, gdy medium kondycjonowane nie wpływało na proliferację komórek śródbłonka naczyniowego, ocena wpływu przeciwciał neutralizujących nie była prowadzona (n.d. - nie dotyczy). Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach na 8 odrębnych hodowlach komórek śródbłonka naczyniowego. Symbolem * oznaczono istotne statystycznie (P<0,05) obniżenie proliferacji komórek śródbłonkowych.

PROLIFERACJA				
stilben + przeciwciało	**medium z młodych LKMO**		**medium ze starych LKMO**	
	0,5 μM	**10 μM**	**0,5 μM**	**10 μM**
3,3',4,4'-THS + anty-VEGF	n.d.	62 ± 2*	n.d.	54 ± 9*
3,3',4,4'-THS + anty-GRO-1/CXCL1	n.d.	102 ± 11	n.d.	98 ± 5
3,3',4,4'-THS + anty-IL-8/CXCL8	n.d.	82 ± 6*	n.d.	81 ± 5*
3,3',4,4'-THS + anty-MCP-1/CCL2	n.d.	94 ± 8	n.d.	103 ± 5
3,3',4,4',5,5'-HHS + anty-VEGF	84 ± 2*	58 ± 4*	76 ± 4*	65 ± 5*
3,3',4,4',5,5'-HHS + anty-GRO-1/CXCL1	92 ± 8	103 ± 5	89 ± 11	93 ± 6
3,3',4,4',5,5'-HHS + anty-IL-8/CXCL8	89 ± 6	72 ± 7*	89 ± 12	87 ± 3*
3,3',4,4',5,5'-HHS + anty-MCP-1/CCL2	94 ± 6	89 ± 6	92 ± 5	90 ± 10

W odniesieniu do zjawiska migracji badaniu poddano tylko komórki śródbłonkowe, podlegające działaniu mediów kondycjonowanych z hodowli starych LKMO, eksponowanych na stilbeny w stężeniu 10 μM, gdyż tylko w tym układzie ekesperymentalnym stwierdzono uprzednio wzrost efektywności migracji komórek. Badania wykorzystujące przeciwciała neutralizujące wykazały, że w przypadku 3,3',4,4'-THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS skuteczne zahamowanie migracji komórek HUVEC jest możliwe tylko poprzez unieczynnienie w medium kondycjonowanym IL-8/CXCL8 (**Tabela 13**).

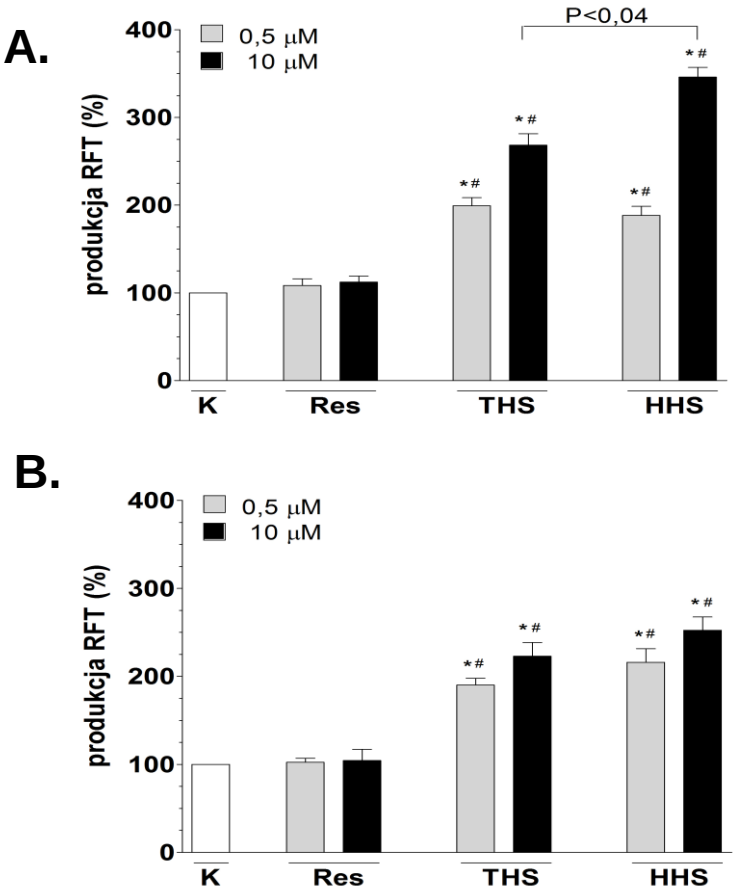
Tabela 13. Wpływ przeciwciał neutralizujących skierowanych przeciwko czynnikom angiogennym na zależną od LKMO migrację komórek śródbłonka naczyń. Wartości wyrażono jako % migracji komórek śródbłonkowych traktowanych medium kondycjonowanym z hodowli LKMO poddawanych działaniu stilbenów (i uznawanych jako 100%). W przypadku, gdy medium kondycjonowane nie wpływało na migrację komórek śródbłonka naczyniowego, ocena wpływu przeciwciał neutralizujących nie była prowadzona (n.d. - nie dotyczy). Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach na 8 odrębnych hodowlach komórek śródbłonka naczyniowego. Symbolem * oznaczono istotne statystycznie (P<0,05) obniżenie migracji komórek śródbłonkowych.

MIGRACJA				
stilben + przeciwciało	**medium z młodych LKMO**		**medium ze starych LKMO**	
	0,5 μM	**10 μM**	**0,5 μM**	**10 μM**
3,3',4,4'-THS + anty-VEGF	n.d.	n.d.	n.d.	93 ± 9
3,3',4,4'-THS + anty-GRO-1/CXCL1	n.d.	n.d.	n.d.	106 ± 15
3,3',4,4'-THS + anty-IL-8/CXCL8	n.d.	n.d.	n.d.	46 ± 7*
3,3',4,4'-THS + anty-MCP-1/CCL2	n.d.	n.d.	n.d.	101 ± 6
3,3',4,4',5,5'-HHS + anty-VEGF	n.d.	n.d.	n.d.	85 ± 8
3,3',4,4',5,5'-HHS + anty-GRO-1/CXCL1	n.d.	n.d.	n.d.	83 ± 14
3,3',4,4',5,5'-HHS + anty-IL-8/CXCL8	n.d.	n.d.	n.d.	65 ± 6*
3,3',4,4',5,5'-HHS + anty-MCP-1/CCL2	n.d.	n.d.	n.d.	92 ± 7

4.14. Wpływ resweratrolu i jego pochodnych na produkcję reaktywnych form tlenu przez LKMO

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że młode LKMO eksponowane przez 4 godziny na resweratrol (punkt czasowy wyselekcjonowany na podstawie wcześniejszych badań [189;247]) nie wykazywały zmian w produkcji RFT. Z kolei stilben 3,3',4,4'-THS wzmagał generowanie RFT przez młode LKMO o 99 ± 9% przy stężeniu 0,5 μM i o 169 ± 13% przy stężeniu 10 μM. Efekty wywierane przez 3,3',4,4',5,5'-HHS w stężeniu 0,5 μM były niemal identyczne z działaniem 3,3',4,4'-THS, natomiast działanie tego związku w stężeniu 10 μM było istotnie silniejsze (wzrost o 246 ± 11%) w porównaniu 3,3',4,4'-THS. Efekty wywierane przez obie pochodne resweratrolu, przy użyciu obu stężeń, były statystycznie silniejsze w porównaniu z resweratrolem (**Rycina 43A**).

Analizując generowanie RFT przez komórki stare stwierdzono, że resweratrol ponownie nie wpływa na zmianę produkcji RFT. Z kolei jego oba syntetyczne analogi, okazały się pobudzać produkcję RFT przez komórki stare w stopniu porównywalnym do efektów obserwowanych w odniesieniu do hodowli młodych. Także i w tym przypadku wykazano efektywność działania obu pochodnych, przy czym zatarciu uległy różnice między działaniem 3,3',4,4'-THS a 3,3',4,4',5,5'-HHS przy stężeniu 10 μM (**Rycina 43B**).



Rycina 43. Wpływ resweratrolu (Res), 3,3',4,4'-THS (THS) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (HHS) na produkcję RFT prze młode (A) i stare (B) LKMO. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach, z wykorzystaniem 6 hodowli LKMO, pochodzących od różnych dawców. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (P<0,05) w porównaniu z komórkami nie poddawanymi działaniu związków badanych (komórki kontrolne; **K**). Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na resweratrol.

5. DYSKUSJA

5.1. Koncepcja i realizacja badań

Aktualne badania, ukierunkowane na identyfikację nowych klas chemioterapeutyków, skutecznych w hamowaniu progresji raka jajnika koncentrują się głównie wokół możliwości ograniczania procesu neowaskularyzacji guza i/lub modulowania ścieżek sygnałowych, zaangażowanych w ten i inne elementy postępu choroby [119]. Z punktu widzenia współczesnej wiedzy o roli mikrośrodowiska tkankowego w rozwoju nowotworów i możliwości ich leczenia [255-257] można stwierdzić, że nieco niedocenianym elementem ekspansji komórek nowotworowych, w kontekście wykorzystania terapeutycznego, jest proces starzenia się komórek prawidłowych [258;259]. Jak wykazały badania przeprowadzone na modelach komórkowych i zwierzęcych, komórki stare, które gromadzą się w tkankach w miarę starzenia się organizmu [260], mogą aktywnie przyczyniać się do nasilenia rozwoju zmian nowotworowych [261;262]. W związku z tym, zasadnym wydaje się pytanie, czy alternatywnym sposobem ograniczenia postępu choroby nowotworowej może być stosowanie związków chemicznych, znanych ze swego działania przeciwstarzeniowego. Bezpośrednia odpowiedź na to pytanie jest jednak trudna, co wynika przede wszystkim z tego, iż pomimo dużego postępu wiedzy w zakresie molekularnych mechanizmów starzenia, dotychczasowe sukcesy w zakresie opóźnienia tempa tego procesu pod wpływem określonych substancji chemicznych dotyczyły niemal wyłącznie układów eksperymentalnych *in vitro* [246;263]. Wyjątkiem od tej reguły jest resweratrol, który prócz zwiększania możliwej do osiągnięcia przez komórki liczby podziałów (tzw. *limitu Hayflicka*) [189-191], okazał się także zwiększać średnią długość życia wielu organizmów modelowych [180-182]. Co nie mniej istotne, związek ten wykazuje także kilka innych działań, będących wysoce pożądanymi z punktu widzenia zmian zachodzących w starzejącym się organizmie, tj. działanie kardioprotekcyjne [136], neuroprotekcyjne [151] i przeciwzapalne [144]. Ostatnim, a zarazem kluczowym argumentem świadczącym o potencjale terapeutycznym resweratrolu jest jego zdolność do ograniczania postępu choroby nowotworowej, na praktycznie każdym z jej etapów [158]. Pomimo tych walorów, wykorzystanie resweratrolu w praktyce jest ograniczane przez jego niską biodostępność i szybki rozkład do mniej aktywnych metabolitów [196]. Ponadto, jak wykazały niektóre

badania, wyraźny przeciwnowotworowy wpływ resweratrolu obserwowany *in vitro* niekiedy nie idzie w parze z zahamowaniem progresji nowotworu w warunkach *in vivo* [264].

Fakty te, limitujące wartość terapeutyczną resweratrolu, otworzyły drogę do syntezy i badań aktywności biologicznej różnego typu jego pochodnych [198;219-221;264]. Jak się wkrótce okazało, szereg właściwości biologicznych tych związków był częstokroć dużo silniej wyrażony w porównaniu z ich naturalnym prekursorem [198;224]. W odniesieniu jednak do wiedzy, jaką na dziś dzień dysponujemy na temat resweratrolu, znajomość cech biologicznych i potencjału terapeutycznego jego pochodnych jest bardzo fragmentaryczna.

Niniejsza rozprawa wpisuje się w powyższy nurt badań, gdyż jest próbą kompleksowej oceny działania dwóch syntetycznych, dodatkowo hydroksylowanych analogów resweratrolu, tj. 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS, skierowanego przeciwko komórkom raka jajnika w modelu *in vitro*. Punktem wyjścia do wykorzystania tych właśnie związków była obserwacja, iż obecność dwóch grup hydroksylowych, odpowiednio w pozycji 4 i 4' pierścienia aromatycznego znacząco zwiększa antyproliferacyjne działanie stilbenów [224]. W dostępnej literaturze można jednak odnaleźć zaledwie kilka prac poświęconych tym analogom, a konkretnie osiem publikacji dotyczących aktywności 3,3',4,4',5,5'-HHS [166;198;218-222;265] i dwie na temat 3,3',4,4'-THS [166;266]. Żadna z tych prac nie porusza jednak kwestii wykorzystania któregoś z tych związków przeciwko komórkom raka jajnika, co z jednej strony czyni niniejsze badania pionierskimi, a z drugiej znacznie utrudnia interpretację uzyskanych wyników.

Pragnąc sprostać postawionym celom stworzono układ eksperymentalny, obejmujący ocenę wpływu 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS na kluczowe wykładniki inwazyjności komórek nowotworowych, wykorzystując jako modele komórkowe trzy komercyjnie dostępne linie komórek raka jajnika (A2780, OVCAR-3, SKOV-3), różniące się pod względem morfologii, dynamiki i charakteru wzrostu oraz reakcji na leki [229;231;232;236-241]. Zastosowanie odrębnych typów komórek rakowych pozwoliło określić, czy uzyskiwane efekty biologiczne mają charakter uniwersalny, czy też są związane ze specyfiką danej linii komórkowej. Jest to istotne także przez wzgląd na doniesienia, mówiące o dużej heterogenności różnego typu komórek raka jajnika, m.in. pod kątem ekspresji kluczowych mediatorów, zaangażowanych w progresję choroby [267].

Ważnym elementem badań było także porównanie efektów wywieranych przez oba syntetyczne stilbeny z działaniem resweratrolu. Aby doszczegółowić charakter reakcji komórek nowotworowych na badane związki przeprowadzono doświadczenia typu

"odpowiedź zależna od dawki" (ang. *dose-response*) i "przebieg reakcji w funkcji czasu" (ang. *time-course*), stosując w tym celu, odpowiednio, stężenia: 10, 50 i 100 μM oraz czasy ekspozycji: 24, 48 i 72 godziny.

Wybór stężeń związków został dokonany w sposób arbitralny, na podstawie obserwacji krzywych przeżywalności komórek, w ten sposób, aby stosowane dawki z jednej strony gwarantowały istotne obniżenie żywotności komórek w ustalonych interwałach czasowych, a z drugiej strony, aby nie była to cytotoksyczność tak znamienna, by wykluczała możliwość i celowość monitorowania pozostałych wykładników progresji komórek rakowych. Bardzo zbliżone zakresy stężeń stosowane były z powodzeniem w badaniach nad aktywnością analogów resweratrolu, w tym 3,3',4,4',5,5'-HHS przez innych badaczy [218;219].

Dotychczas prowadzone badania nad aktywnością stilbenów obejmowały różne czasy ekspozycji, począwszy od 24 godzin [221], poprzez eksperymenty 72-godzinne [219], kończąc na ekspozycjach ponad tygodniowych [225]. Dość często wykorzystywana była także ocena własciwości komórek poddawanych działaniu stilbenów w trzech interwałach dobowych, tj. po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji [218]. Te same punkty czasowe wykorzystano w niniejszym projekcie, jednak główną przesłanką do ich wyboru była kinetyka rozkładu badanych związków w medium hodowlanym, określona na potrzeby tych i wcześniejszych badań za pomocą metody HPLC [247]. W tym kontekście uwagę zwraca fakt, że resweratrol znacząco przewyższa swoje pochodne pod kątem stabilności, co widać właściwie w każdym z badanych punktów czasowych. W przypadku dwóch syntetycznych stilbenów, 72 godziny ekspozycji stanowiły wartość progową, korespondującą z niemalże całkowitą ich degradacją. Gdyby wynik ten traktować tylko w kategoriach reakcji chemicznej, można by uznać już na tym etapie, że przydatność terapeutyczna syntetycznych stilbenów jest nieporównywalnie mniejsza niż resweratrolu. Takie rozumowanie byłoby jednak zbyt uproszczone, o czym świadczą przeprowadzone w niniejszym projekcie badania wpływu tych związków na różnorakie wykładniki inwazyjności komórek nowotworowych. Jak wykazały bowiem przeprowadzone badania, analogi resweratrolu wielokrotnie charakteryzowały się silniejszym działaniem od swego prekursora, co może sugerować, że kluczowe z punktu widzenia farmakoterapii efekty biologiczne mogły zachodzić pod ich wpływem już w pierwszych godzinach eksperymentu.

5.2. Cytotoksyczność

Odnosząc się bezpośredno do wyników cytotoksyczności badanych stilbenów, ocenianej na podstawie przebiegu krzywych przeżywalności komórek nowotworowych i wyliczonych wartości IC_{50} można stwierdzić, że poddawane testom linie komórek raka jajnika w zasadniczy sposób różnią się między sobą wrażliwością na badane związki, przy czym najbardziej rzucającym się w oczy efektem była wyraźna oporność na wszystkie trzy stilbeny komórek linii OVCAR-3. Wartości IC_{50} uzyskane dla tej linii komórkowej w trzech badanych punktach czasowych przekraczały wszelkie, opisywane dotychczas, zakresy używanych stężeń stilbenów, co może sugerować, że w przypadku tej linii komórek nowotworowych właściwszym (od bezpośredniego niszczenia) punktem uchwytu dla testowanych związków może być modyfikacja określonych wykładników inwazyjności komórek, np. ich proliferacji, adhezji lub migracji.

Różnice w reakcji na działanie stilbenów pomiędzy badanymi liniami komórek rakowych będą wątkiem przewijającym się praktycznie przy każdym z ocenianych w tej rozprawie parametrów. Już w tym momencie warto zatem pokusić się o próbę wyjaśnienia natury tych różnic. Prawdopodobną przyczyną zróżnicowanego zachowania komórek nowotworowych, prócz dość oczywistych rozbieżności o charakterze molekularnym, może być odmienny charakter wzrostu kolonii. Przykładowo, komórki OVCAR-3 rosną przede wszystkim w formie wielokomórkowych konglomeratów, a zjawisko to trwa praktycznie nieprzerwanie aż do chwili osiągnięcia przez hodowlę fazy zlewności. Cecha ta odróżnia je od komórek linii A2780 i SKOV-3, które w wykładniczej fazie wzrostu proliferują bez tworzenia większych skupisk. W związku z tym można wysnuć przypuszczenie, iż charakterystyczne grupowanie się komórek OVCAR-3 może być przyczyną ich mniejszej wrażliwości na działanie badanych związków, która to cecha wynika z wzajemnej ochrony poszczególnych komórek, ewentualnie altruistycznej śmierci komórek leżących peryferyjnie [268]. Pewną analogią do tego zjawiska jest wzrost mikroorganizmów w formie biofilmu, który także stanowi formę ich zabezpieczenia przed niekorzystnymi warunkami środowiska zewnętrznego [269]. Nie bez znaczenia dla zaistnienia pewnych różnic między badanymi liniami komórek raka jajnika może być także tempo ich wzrostu (najwyższe dla komórek A2780, najniższe dla OVCAR-3), które przekłada się bezpośrednio na gęstość hodowli. Zróżnicowana gęstość komórek jest, z kolei, cechą, która może odpowiadać za wystąpienie określonych różnic w ich zachowaniu, w tym wrażliwości na działanie leków [270], potencjale onkogennym [271] lub poziomie produkcji RFT [272].

Analiza wpływu poszczególnych stilbenów na żywotność komórek raka jajnika wykazała, że związkiem działającym najskuteczniej, tj. wykazującym najwyższą cytotoksyczność w najniższym zakresie stężeń (na podstawie oceny wartości IC_{50}) był 3,3',4,4'-THS. Efekt ten był ewidentny w przypadku komórek A2780 i SKOV-3 w każdym z badanych punktów czasowych, a w przypadku komórek OVCAR-3 w dwóch pierwszych dobach ekspozycji. Wykazana przewaga aktywności 3,3',4,4'-THS nad resweratrolem nie jest zaskoczeniem, gdyż może ona wynikać z obecności drugiej grupy hydroksylowej w wysoce reaktywnej pozycji 4, wiązanej ze wzrostem siły działania stilbenów [161;198;224]. Dużo trudniej natomiast odnieść się do przewagi tego związku nad stilbenem 3,3',4,4',5,5'-HHS, który to analog prócz dodatkowego obsadzenia pozycji 4, posiada też dodatkowy podstawnik hydroksylowy w pozycji 5'. Na podstawie porównania struktury chemicznej obu związków można wyciągnąć wniosek, że to właśnie obecność grupy funkcyjnej w pozycji 5' mogłoby, paradoksalnie, osłabiać cytotoksyczne działanie tego związku. Gdyby jednak ta konkluzja była słuszna (jej weryfikacja wymaga dalszych badań zależności między strukturą a funkcją tego związku) stało by to w opozycji do wyników uzyskanych przez innych autorów [198]. W jeszcze innych badaniach, przeprowadzonych na komórkach glejaka astrocytarnego, stwierdzono, że dodatkowe grupy hydroksylowe wprowadzane do pozycji 3' lub 5' nie wpływają na potencjał cytotoksyczny analogów resweratrolu [273], co może sugerować, że nie tylko struktura chemiczna stilbenu decyduje o jego cytotoksyczności, a pewne znaczenie może mieć także specyfika poddawanych jego działaniu komórek.

Odnosząc uzyskane dla 3,3',4,4',5,5'-HHS wartości IC_{50} do danych literaturowych (dla drugiego analogu takowych brak) można stwierdzić, że aktywność cytotoksyczna związku w stosunku do komórek raka jajnika wydaje się być mniejsza w porównaniu z innymi typami komórek nowotworowych. Badania takie przeprowadzono m.in. na komórkach raka piersi, w przypadku których uzyskane wartości IC_{50} mieściły się w zakresie 90 do 127 μM, czyli były nawet o rząd wielkości niższe w porównaniu wartościami wyliczonymi dla raka jajnika. Tej różnicy nie umniejsza także fakt, że komórki raka piersi eksponowane były na badany stilben tylko przez 24 godziny [221]. Podobnie rzecz ma się w przypadku komórek czerniaka, dla których wartości IC_{50} zawierały się między 20 a 25 μM [218].

5.3. Apoptoza

Bezpośrednia cytotoksyczność stilbenów względem komórek nowotworowych jest wypadkową ich gwałtownej śmierci nekrotycznej i/lub indukcji szlaków sygnałowych prowadzących do zaprogramowanej, niekiedy nieco oddalonej w czasie śmierci apoptotycznej [274]. Przeprowadzone badania, wykorzystujące identyfikację komórek apoptotycznych na podstawie obecności oligonukleosomalnej fragmentacji DNA (tzw. komórek frakcji subG$_1$ [275]) wykazały, że udział programowanej śmierci komórek pod wpływem wszystkich związków badanych jest ściśle uzależniony od typu ocenianych komórek rakowych. Najmniejszy wpływ tego rodzaju śmierci odnotowano dla komórek linii SKOV-3, w przypadku których w pierwszych dwóch dobach ekspozycji apoptoza nie odgrywała nawet pomniejszej roli, natomiast w trzeciej dobie zaobserwowano nieznaczny wzrost odsetka komórek apoptotycznych w wyniku działania resweratrolu (efekt rzędu 5%) oraz 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS (efekt sięgający 10%). Co istotne, w przypadku resweratrolu śmierć apoptotyczną wykryto tylko wskutek działania tego związku w stężeniu 100 μM, natomiast w przypadku obu jego analogów, efekt ten był już widoczny także przy stężeniu 50 μM. Różnica ta może być oceniona na korzyść syntetycznych stilbenów ze względu na potencjalną toksyczność wysokich stężeń związków w stosunku do komórek prawidłowych. Efekt ten jest zgodny z wynikami wcześniejszych badań na komórkach białaczki promielocytarnej HL-60, w przypadku których 3,3',4,4',5,5'-HHS wywoływał apoptozę przy niższych stężeniach niż czynił to resweratrol [219]. Nieco inaczej pod względem indukcji apoptozy zachowały się komórki A2780, które wykazywały pewną fluktuację tego zjawiska w trzech dobach eksperymentu. Co ciekawe, w przypadku tych komórek apoptozy w żadnym z punktów czasowych nie wywoływał resweratrol, natomiast jego obie pochodne powodowały apoptozę rzędu 5-10%, głównie przy najwyższym z użytych stężeń. Najsilniejszą indukcję apoptozy (rzędu 10-20%) odnotowano w komórkach OVCAR-3 eksponowanych przede wszystkim na syntetyczne stilbeny, a pojawienie się tego efektu wymagało trzech dni ekspozycji. Zaobserwowany w toku doświadczeń brak zmian częstości apoptozy komórek pod wpływem resweratrolu nie jest zjawiskiem całkowicie nowym, gdyż podobny efekt opisano już wcześniej w komórkach raka piersi [223] oraz komórkach glejaka astrocytarnego [276]. Autorzy drugiej z przytoczonych prac sugerują, że właściwy mechanizm śmierci komórkowej, indukowanej pod wpływem resweratrolu może w dużej mierze zależeć od tempa i wydajności wewnątrzkomórkowego metabolizmu tego związku. W komórkach, w których jest on szybko rozkładany (np. w raku

wątrobowokomórkowym) następuje indukcja śmierci apoptotycznej, natomiast w tych, w których może on się kumulować w postaci niezmienionej, dochodzi przede wszystkim do ich śmierci nekrotycznej [276]. Uwaga ta wydaje się być także szczególnie istotna w kontekście wyższej wrażliwości komórek OVCAR-3 na śmierć apoptotyczną, przy obserwowanej wcześniej ich wyjątkowej oporności na cytotoksyczne (być może związane w ich przypadku głównie z nekrozą) działanie stilbenów. Jeśli byłoby tak w istocie, indukcja apoptozy pod wpływem 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS mogłaby stanowić ważny element postępowania terapeutycznego, skierowanego przeciwko tego typu komórkom. Ma to także dodatkowe znaczenie praktyczne, gdyż w przeciwieństwie do nekrozy, która przebiega wraz z reakcją zapalną (należy ją w tym przypadku utożsamiać z efektem ubocznym działania leków), apoptoza zachodzi bez komponenty zapalnej, ograniczając traumatyzację prawidłowej tkanki [277]. Należy jednak w tym kontekście podkreślić, że odnotowana w niniejszych badaniach apoptoza komórek raka jajnika, sięgająca w najlepszym wypadku około 20% (a zazwyczaj zdecydowanie niższa) nie ma tak imponującej skali, jak ta, odnotowana choćby w przypadku komórek białaczki promielocytarnej, kiedy to 3,3',4,4',5,5'-HHS, począwszy już od stężenia 25 μM, indukował apoptozę w niemalże całej populacji komórek [219]. Jako główny mechanizm, leżący u podstaw tak wydajnej aktywności proapoptotycznej tego związku autorzy pracy sugerują hamowanie przez niego aktywności reduktazy rybonukleotydowej, wynikiem czego jest obniżenie poziomu trójfosforanów deoksyrybonukleotydów [219]. Choć w niniejszym projekcie nie oceniano mechanizmów efektorowych apoptozy, można jednak przypuszczać, że podobnie jak w przypadku innych typów komórek nowotworowych, np. raka piersi, 3,3',4,4',5,5'-HHS indukuje apoptozę w mechanizmie angażującym aktywację kaspaz, obniżenie potencjału błony mitochondrialnej oraz wzrost aktywności białka supresorowego p53 [221].

5.4. Proliferacja i starzenie

Wywołanie śmierci komórek nowotworowych, nekrotycznej i/lub apoptotycznej, jest jednym z podstawowych zjawisk wykorzystywanych w klasycznej chemioterapii [278]. Innym, popularnym sposobem ograniczania progresji komórek rakowych jest modulowanie określonych procesów, związanych z ich inwazyjnością, szczególnie aktywności proliferacyjnej [279]. W niniejszej rozprawie zbadano wpływ resweratrolu i jego pochodnych na aktywność podziałową komórek raka jajnika, wykorzystując w tym celu

metodę fluorescencyjną, opartą o wyznakowanie komórek sondą CFDA SE. Podstawową obserwacją płynącą z przeprowadzonych badań było to, że wszystkie trzy badane związki wykazują działanie antyproliferacyjne względem komórek raka jajnika, przy czym — jak można było się tego spodziewać na podstawie analizy wcześniejszych parametrów — odnotowywane efekty były w pewnym stopniu zależne od typu komórek poddawanych ekspozycji. W przypadku komórek A2780 najefektywniejsze działanie wykazywał resweratrol, który w trzeciej dobie eksperymentu hamował proliferację komórek przy każdym z użytych stężeń, a efekt ten był zależny od dawki. Działanie resweratrolu rosło także wraz z czasem ekspozycji. W przypadku dwóch pozostałych linii komórkowych, tj. OVCAR-3 i SKOV-3, najwyższą aktywność antyproliferacyjną wykazywał 3,3',4,4'-THS, przy czym różnica w sile działania tego związku i 3,3',4,4',5,5'-HHS była raczej niewielka. Potwierdzeniem antyproliferacyjnego działania stilbenów była cytometryczna ocena odsetka komórek w fazie S cyklu komórkowego (aktywnie replikujacych swoje DNA), której wyniki w pełni korespondowały z danymi uzyskanymi metodą fluorescencyjną. Antyproliferacyjny efekt syntetycznych analogów resweratrolu, szczególnie 3,3',4,4',5,5'-HHS, względem komórek raka jajnika był zgodny z obserwacjami innych autorów, w tym badaniami przeprowadzonymi na komórkach raka jelita grubego [220]. Obniżenie odsetka komórek w fazie S cyklu mitotycznego, obserwowane pod wpływem syntetycznych analogów resweratrolu potwierdzało natomiast wyniki badań przeprowadzonych na komórkach raka piersi, w przypadku których taki sam efekt wywołał syntetyczny stilben posiadający (podobnie jak badane związki) dwie grupy hydroksylowe w pozycjach 4 i 4' [223].

Fakt zahamowania tempa proliferacji komórek nowotworowych pod wpływem badanych związków zrodził pytanie o mechanizm tego zjawiska. Odnosząc się do tego problemu podjęto próbę zweryfikowania hipotezy mówiącej, że ograniczenie aktywności podziałowej może być związane z indukcją procesu starzenia, czyli stanu związanego w trwałym wyjściem komórek z cyklu podziałowego [280]. Dodatkową przesłanką do podjęcia tego kierunku badań było stwierdzenie za pomocą metody cytometrycznej, iż zmniejszeniu frakcji komórek replikujących DNA w fazie S cyklu towarzyszy zazwyczaj jednoczesny wzrost odsetka komórek w fazie G_1, będący zjawiskiem typowym dla komórkowego starzenia [281]. Nasilone gromadzenie się komórek w fazie G_1 cyklu opisano już wcześniej jako cechę typową dla syntetycznych stilbenów, posiadających dwie grupy hydroksylowe w pozycjach 4 i 4', przy czym podobnie jak w niniejszych badaniach zjawisko to utożasamiano z zatrzymaniem aktywności podziałowej komórek [224].

Zainicjowanie procesu starzenia komórkowego, jako sposobu ograniczania proliferacji komórek nowotworowych jest koncepcją relatywnie młodą, gdyż jeszcze do niedawna sądzono, że starzenie się jest zjawiskiem dotyczącym wyłącznie komórek prawidłowych. W ostatnich latach pogląd na tę kwestię zmienił się jednak diametralnie, czego podstawą było wykazanie wzrostu ekspresji biochemicznych markerów starzenia w komórkach nowotworowych, poddawanych działaniu szeregu stosowanych rutynowo leków chemioterapeutycznych [282-284]. Ponieważ efekt ten nie jest jeszcze dostatecznie poznany, a dodatkowo nigdy nie był analizowany w odniesieniu do działania stilbenów, w niniejszej rozprawie oceniono wpływ resweratrolu i jego analogów na aktywność β-galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA-β-Gal), tj. enzymu, będącego najpopularniejszym markerem komórek starych [260]. W tym celu wykorzystano metodę fluorescencyjną, która pozwala na określenie zmian aktywności SA-β-Gal w całej populacji, zamiast w pojedynczych komórkach [250]. Za takim wyborem metody przemawiała z jednej strony możliwość skwantyfikowania wyników, a z drugiej to, że wcześniejsze badania śmierci komórkowej i proliferacji także odbywały się na poziomie całych hodowli komórkowych. Przeprowadzone badania pokazały, że antyproliferacyjny efekt stilbenów może być, rzeczywiście, w dużej mierze powodowany aktywacją programu starzenia w komórkach nowotworowych. Przykładem tej współzależności są m.in. komórki raka jajnika A2780, w przypadku których zależne od dawki obniżenie potencjału proliferacyjnego pod wpływem resweratrolu, odnotowane w trzeciej dobie eksperymentu, korespondowało z zależnym od dawki wzrostem aktywności SA-β-Gal w tym samym punkcie czasowym. Tę samą prawidłowość odnotowano dla komórek OVCAR-3 i SKOV-3, w przypadku których najsilniejsze działanie antyproliferacyjne, cechujące 3,3',4,4'-THS, zachodziło z jednoczesnym wzrostem aktywności SA-β-Gal.

Za prawdopodobną przyczynę indukcji starzenia komórek nowotworowych pod wpływem 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS można uznać aktywność RFT, których działaniu przypisuje się także cytostatyczne i proapoptotyczne efekty działania analogów resweratrolu [198;221]. Jak wykazały niniejsze badania, obie syntetyczne pochodne resweratrolu zwiększały produkcję RFT przez komórki raka jajnika, przy czym w komórkach A2780 działanie obu związków miało zbliżoną siłę, w przypadku komórek OVCAR-3 silniejszą indukcję RFT powodował 3,3',4,4',5,5'-HHS, natomiast w przypadku komórek SKOV-3, silniej działającym związkiem był 3,3',4,4'-THS. Nasilenie stresu oksydacyjnego pod

wpływem syntetycznych stilbenów jest prawdopodobnie związane z ich budową chemiczną, a konkretnie obecnością dodatkowych grup hydroksylowych w pozycji *orto*-. Jak wykazały doświadczenia na modelu mikroskomalnym, pochodne *orto*- mają zdolność formowania cytotoksycznch semichinonów, a przez to stymulowania dodatkowej konsumpcji tlenu. Zachodzi to prawdopodobnie w cyklu oksydoredukcyjnym kosztem równoważników redukcyjnych, przenoszonych przez cytochrom b5, i prowadzi do formowania RFT [198]. Związki te, a w szczególności 3,3',4,4',5,5'-HHS mogą także wzmagać stres oksydacyjny poprzez hamowanie aktywności czynników antyoksydacyjnych, w tym dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i glutationu zredukowanego [221]. Co ważne, sam resweratrol jest, przynajmniej teoretycznie, pozbawiony tych cech, co jednak wydaje się potwierdzać tylko w przypadku komórek A2780, w których obniżył on produkcję RFT, podobnie jak czynił to w przypadku wielu innych typów komórek i modeli doświadczalnych [285;286]. Niespodziewanie jednak, w przypadku linii OVCAR-3 i SKOV-3 także resweratrol zwiększał produkcję RFT, choć nie była to skala zjawiska tak wysoka, jak w przypadku jego syntetycznych *orto*-analogów. Można w tym kontekście domniemywać, że prooksydacyjny wpływ resweratrolu może być zjawiskiem komórkowo-specyficznym, zbliżonym w swej naturze to opisanego wcześniej wzbudzenia RFT w komórkach śródbłonka naczyniowego, starzejących się w sposób przedwczesny pod wpływem tego związku [287]. Nie sposób pominąć także faktu, że w przypadku niektórych typów komórek nowotworowych, np. komórek białaczkowych, resweratrol użyty w stężeniach do 50 μM w znaczący sposób nasilał generowanie RFT, co przekładało się w rezultacie na zahamowanie ich żywotności [288].

5.5. Adhezja

Choć to indukcja komórkowej śmierci oraz zahamowanie proliferacji są najczęściej badanymi wykładnikami inwazyjności komórek nowotworowych w kontekście testowania kandydatów na leki, kluczowym procesem dla progresji komórek złośliwych w nowej dla nich lokalizacji jest proces adhezji [289;290]. W przypadku niniejszego projektu, postanowiono ocenić wpływ stilbenów na adhezję komórek raka jajnika do monowarstwy utworzonej przez LKMO. Taki układ eksperymentalny stanowił swoistą imitację warunków zachodzących w jamie otrzewnej podczas jej kolonizacji przez komórki nowotworowe. Ocena tego parametru dostarczyła jednak bardzo niejednoznacznych wyników, które w dużym stopniu wydają się stawiać pod znakiem zapytania zasadność stosowania badanych

analogów resweratrolu w terapii przeciwnowotworowej. Spośród trzech badanych związków, tylko resweratrol wykazywał bowiem zdolność do ograniczania adhezji komórek nowotworowych do LKMO. Co prawda, efekt ten cechował się pewnymi fluktuacjami w zależności od badanej linii komórkowej, użytego stężenia i długości ekspozycji, to jednak generalnie przeważało antyadhezyjne działanie tego związku. W tym zakresie uzyskany wynik jest zgodny z wcześniejszymi badaniami innych zespołów, które dowiodły podobnego działania resweratrolu w stosunku do komórek raka piersi [291], raka płuc [292] i włókniakomięsaka [293].

Z kolei analogi resweratrolu, praktycznie w każdym z wykorzystanych układów eksperymentalnych, wykazywały działanie promujące adhezję komórek rakowych do LKMO, co jest rzecz jasna efektem niepożądanym. Tylko w jednej sytuacji, tj. w stosunku do komórek A2780, po 72 godzinach ekspozycji na 3,3',4,4',5,5'-HHS w stężeniach 50 i 100 μM odnotowano dość istotne obniżenie ich wiązania się do LKMO. Ten odosobniony przypadek nie zmienia jednak faktu, że w kontekście całości oceny zjawiska adhezji komórek nowotworowych, oba syntetyczne stilbeny okazały się promować ten element postępu choroby. Jest wysoce prawdopodobne, że sytuacja ta wynika z pobudzenia przez te związki — być może w mechanizmie zależnym od RFT [254] — ekspresji jednego lub większej liczby mediatorów odpowiedzialnych za adhezję tego typu komórek nowotworowych.

W tym kontekście przeprowadzono ocenę wpływu stilbenów na ekspresję integryn α5β1, tj. przezbłonowych receptorów, których interakcja z białkami ECM na powierzchni LKMO jest zaangażowana w zjawisko adhezji [90;93]. Badania wykazały, że w przypadku komórek A2780 i SKOV-3 oraz OVCAR-3 (lecz tylko w dwóch pierwszych punktach czasowych) resweratrol wykazuje zdolność obniżania komórkowej ekspresji integryn, co może tłumaczyć jego hamujący wpływ na zjawisko adhezji komórek do LKMO. Z kolei dwa syntetyczne analogi resweratrolu okazały się działać pobudzająco na produkcję integryn, przy czym 3,3',4,4'-THS wykazywał ten efekt w każdej z badanych linii komórkowych, natomiast 3,3',4,4',5,5'-HHS tylko w komórkach OVCAR-3 i SKOV-3. Pewne, choć dość subtelne różnice, które odnotowano w reakcji poszczególnych linii komórkowych na stilbeny, pod kątem zmian produkcji integryn α5β1 (w kontekście opisanych zmian adhezji) mogą wynikać z dwóch rzeczy, tj. z różnej wyjściowej ekspresji integryn na odpowiednich typach komórek rakowych [254], jak również z tego, że prócz oddziaływań integryny-ECM,

niebagatelne znaczenie dla adhezji komórek raka jajnika do LKMO mają też oddziaływania innych mediatorów, szczególnie cząstek CD44 z kwasem hialuronowym [85;86].

5.6. Migracja

Innym, ważnym elementem progresji komórek nowotworowych jest proces migracji, rozumiany jako zdolność do penetrowania przez nie warstw biologicznych (np. innych komórek lub elementów ECM), zazwyczaj pod wpływem wytworzonego gradientu chemotatycznego [294]. W niniejszych badaniach oceniono wpływ stilbenów na migrację komórek raka jajnika przez błony poliwęglanowe, pod wpływem medium kondycjonowanego wygenerowanego przez te komórki. Innymi słowy, oceniono efekt autokrynny, w którym komórki nowotworowe modulują swoje własne zdolności migracyjne poprzez rozpuszczalne czynniki wydzielone do środowiska [103].

Doświadczenia przeprowadzone w tym zakresie dowiodły bodajże największych różnic między poszczególnymi liniami komórek rakowych pod kątem ich reakcji na stilbeny, spośród wszystkich ocenianych do tej pory parametrów. Ponownie pokazały one także często przeciwstawne efekty wywierane przez określone związki. Jedyną linią komórkową, w stosunku do której stilbeny, w zgodny i porównywalny sposób spowodowały zahamowanie migracji były komórki SKOV-3. W komórkach OVCAR-3, antymigracyjnie (lecz tylko po 72 godzinach ekspozycji) działał resweratrol, natomiast jego dwie syntetyczne pochodne zdecydowanie pobudzały tę cechę komórek nowotworowych. Z kolei w stosunku do komórek A2780, resweratrol zasadniczo nie zmieniał ich właściwości migracyjnych (prócz stężenia 100 μM po 48 godzinach ekspozycji), stilben 3,3',4,4'-THS nasilał migrację w stopniu zależnym od dawki w każdym z ocenianych punktów czasowych, natomiast stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS po początkowym pobudzeniu migracji, w drugiej i trzeciej dobie eksperymentu wywierał coraz to większe działanie hamujące. Na podstawie tych badań można wysnuć wniosek, że spośród trzech badanych związków, największy potencjał do hamowania migracji komórek raka jajnika (prócz OVCAR-3) posiada 3,3',4,4',5,5'-HHS. Cechę tę dostrzeżono już wcześniej w odniesieniu do komórek czerniaka linii M24met, w przypadku których związek ten, użyty w stężeniu 25 μM przez 48 godzin, hamował migrację *in vitro* w mechanizmie zależnym od szlaku białka p53 i paksyliny, i co ważne, wywierane przez niego efekty były silniejsze w porównaniu z resweratrolem [218]. Silniejsze od resweratrolu działanie antymigracyjne wywierał także syntetyczny 4,4'-dihydroxy-*trans*-

stilben, który podobnie jak badane w niniejszej rozprawie związki posiadał w swej strukturze dwie grupy hydroksylowe w pozycjach 4 i 4' [223].

W trakcie niniejszych badań podjęto próbę identyfikacji rozpuszczalnego mediatora, od zmian produkcji którego mogły zależeć uzyskane wcześniej wyniki migracji komórek. W tym kontekście skoncentrowano się na ocenie sekrecji do środowiska (medium kondycjonowanego) przez komórki nowotworowe kwasu hialuronowego (HA), którego rozpuszczalna forma, jak wykazały wcześniejsze badania [100], może promować zjawisko migracji. Ocena stężenia HA w medium z hodowli komórek nowotworowych wykazała, że tylko w przypadku linii SKOV-3 wszystkie trzy związki badane w sposób zgodny hamowały wydzielanie HA, co biorąc pod uwagę zaangażowanie tego związku we właściwości migracyjne komórek może wyjaśniać powód ograniczenia tego zjawiska w przypadku tej linii komórek nowotworowych. Zmiany produkcji HA przez komórki A2780 i OVCAR-3, poddawane działaniu stilbenów były natomiast dużo bardziej złożone. W komórkach OVCAR-3 resweratrol okazał się hamować wydzielanie HA, podczas gdy obie jego pochodne (szczególnie 3,3',4,4',5,5'-HHS) sekrecję HA do środowiska w głównej mierze pobudzały. I w tym przypadku jednak, choć dwukierunkowe, zmiany stężenia HA w medium kondycjonowanym korespondowały ze zmianami migracji komórek OVCAR-3, ponownie sugerując rolę HA jako mediatora tego zjawiska. Mając jednak na względzie, iż w przypadku komórek OVCAR-3 syntetyczne stilbeny wywierały efekt niepożądany, pobudzając zjawisko migracji (prawdopodobnie poprzez nasilenie produkcji HA), stanowiło to kolejny przykład na szczególną komórkową-specyficzność działania tych związków, także pod kątem modulowania przez nie fenotypu sekrecyjnego komórek. Przykładem jeszcze innego rodzaju odpowiedzi, mianowicie silnej fluktuacji w wydzielaniu HA, w funkcji czasu była linia A2780, w przypadku której wszystkie trzy badane związki w pierwszej dobie ekspozycji pobudzały sekrecję HA, w drugiej ją hamowały (prócz stężeń 100 μM działających pobudzająco), a w trzeciej ponownie zgodnie nasilały. W tym przypadku nie sposób oprzeć się wrażeniu, że zaobserwowane zmiany sekrecji HA do medium raczej nie stanowią podstawy zmian migracji tego typu komórek pod wpływem działania stilbenów, sugerując pełnienie kluczowej roli w regulacji tego procesu przez inne rozpuszczalne mediatory, np. fibronektynę [97].

5.7. Angiogeneza

Ostatnim z analizowanych w niniejszej rozprawie elementów, związanych z progresją komórek nowotworowych, choć nie dotyczącym bezpośrednio ich zachowania, jest proces angiogenezy. Proces ten rozumiany jest jako wzmożona produkcja nowych naczyń krwionośnych lub zwiększona przepuszczalność naczyń już istniejących, których głównym elementem jest proliferacja i migracja oraz tworzenie struktur tubularnych przez komórki śródbłonka naczyniowego [295;296]. Odpowiednie unaczynienie guza jest warunkiem koniecznym do sprostania wysokiemu popytowi komórek transformowanych na tlen i substancje odżywcze, co z kolei przekłada się na możliwość przekroczenia przez masę guzową krytycznej wartości 1-2 mm i jej dalszą ekspansję [297].

Istotą tej części projektu była ocena wpływu badanych stilbenów na proliferację i migrację komórek śródbłonka naczyniowego HUVEC. Stworzony układ eksperymentalny nie obejmował jednak bezpośredniego działania stilbenów na komórki HUVEC, lecz dotyczył ich wpływu pośredniego, odbywającego się poprzez modyfikacje właściwości wydzielniczych LKMO. Tego typu badania, wykorzystujące wpływ określonych mediów kondycjonowanych na właściwości komórek śródbłonkowych był stosowany już wcześniej [298;299], a główną przesłanką do posłużenia się tą metodą była możliwość oceny wzajemnych oddziaływań pomiędzy różnymi typami komórek. Kontekst eksperymentalny poszerzono dodatkowo o proces starzenia się LKMO, gdyż jak wykazały wcześniejsze badania, prowadzone zarówno na LKMO [249], jak i na innych typach komórek somatycznych [300], zjawisko to wiąże się ze zwiększoną sekrecją szeregu mediatorów angiogenezy, co w odniesieniu do LKMO może mieć duże znaczenie dla dynamiki wewnątrzotrzewnowej progresji komórek rakowych. Należy wspomnieć, że omawiany aspekt inwazyjności nowotworu jest kontynuacją wczesniej prowadzonych badań, które odbywały się z wykorzystaniem linii komórek śródbłonkowych HMEC-1 i wykazały odmienny wpływ resweratrolu (hamujący) i jego analogów (pobudzający) na proliferację tej grupy komórek [247]. Jako potencjalną przyczynę zaobserwowanych zmian zasugerowano (bez pogłębionej analizy, w tym badań interwencyjnych) wpływ resweratrolu oraz jego pochodnych na, odpowiednio, obniżenie i podwyższenie produkcji przez LKMO głównych mediatorów angiogenezy, tj. VEGF oraz CXCL8/IL-8 [247]. W ramach niniejszego projektu wznowiono ten wątek badawczy, czyniąc to z trzech powodów. Pierwszym z nich była zmiana modelu komórkowego na pierwotne komórki linii HUVEC, co wynikało po części z faktu, że komórki HMEC-1 to nie do końca reprezentatywna linia unieśmiertelniona [301], a

po części z tego, że są to komórki pochodzące z mikrokrążenia. Nie bez znaczenia pozostawało także i to, że różne typy komórek śródbłonka naczyniowego znane są z dużej heterogenności pod względem ich zachowania angiogennego [302;303]. Drugim powodem podjęcia tematu była chęć jednoczesnej oceny proliferacji i migracji komórek (wcześniej oceniono tylko proliferację), a trzecim - przeprowadzenie testów interwencyjnych, celem jednoznaczenego zidentyfikowania czynników odpowiedzialnych za zmianę aktywności angiogennej komórek śródbłonkowych.

Badania przeprowadzone na komórkach HUVEC wykazały, że resweratrol hamuje, natomiast 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS pobudzają proliferację komórek, przy czym szczególnie silne działanie pobudzające wykazywał drugi z wymienionych analogów. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi badaniami na linii HMEC-1 [247], jednak mają w sobie tę nowość, iż pokazują zgodną reakcję na badane stilbeny komórek śródbłonkowych mikro- i makronaczyń, ujawniając tym samym uniwersalną naturę tego zjawiska. W odniesieniu do zjawiska migracji stwierdzono hamujące działanie resweratrolu w stosunku do komórek śródbłonkowych eksponowanych na medium kondycjonowane z młodych LKMO i brak wpływu na ten proces syntetycznych stilbenów. Z kolei analizując efekt wywierany przez media wygenerowane przez stare LKMO zaobserwowano utrzymanie się antymigracyjnego wpływu resweratrolu oraz pobudzenie migracji komórek w odpowiedzi na jego syntetyczne analogi, co w tym drugim przypadku można przypisywać wspomnianej wcześniej nasilonej sekrecji mediatorów angiogenezy przez stare LKMO [249].

Poszukując mediatora odpowiedzialnego za hamujące proliferację i migrację komórek HUVEC działanie resweratrolu użyto rekombinowanych form kluczowych czynników angiogennych, w tym VEGF, GRO-1/CXCL1, IL-8/CXCL8 i MCP-1/CCL2, i stwierdzono, że ograniczanie przez resweratrol proliferacji komórek śródbłonkowych jest związane z hamowaniem przez niego sekrecji VEGF, natomiast jego działanie antymigracyjne jest związane z hamowaniem wydzielania chemokiny IL-8/CXCL8. Obserwacje dotyczące mediatorów antyangiogennego działania resweratrolu są zgodne z wczesniejszymi danymi literaturowymi, wskazującymi, że związek ten hamuje produkcję VEGF i IL-8/CXCL8 przez różnego typu komórki, w tym fibroblasty [304], komórki mięśni gładkich [305] i komórki nabłonkowe [165]. Uzyskane wyniki potwierdzają także obserwacje uzyskane w hodowli mieszanej 3D komórek czerniaka z komórkami śródbłonka naczyniowego, gdzie wykazano, że antyangiogenne działanie resweratrolu może być wynikiem obniżonej produkcji VEGF

przez komórki nowotworowe [167]. Jeszcze inne badania dowiodły, że neutralizacja VEGF zwiększa antyngiogenne działanie resweratrolu względem komórek HUVEC [163]. Pod kątem mechanistycznym, działanie resweratrolu może być związane z aktywacją kinazy 3β syntazy glikogenu (GSK3β), prowadzącą do zahamowania szlaku sygnałowego β-kateniny, zaangażowanego w produkcję VEGF [292].

W odrębnej grupie doświadczeń podjęto próbę identyfikacji mediatorów pobudzającego proliferację i migrację komórek śródbłonkowych działania analogów resweratrolu. Tym razem zastosowano strategię interwencyjną, opierającą się o zahamowanie efektu poprzez wykorzystanie specyficznych przeciwciał neutralizujących. Badania te wykazały, że mediatorami nasilonej proliferacji komórek śródbłonkowych pod wpływem syntetycznych stilbenów są VEGF i IL-8/CXCL8, natomiast mediatorem zwiększonej migracji jest IL-8/CXCL8. Sprawcza rola pobudzenia sekrecji mediatorów angiogenezy, produkowanych przez LKMO jest zgodna w wcześniejszymi badaniami na komórkach HUVEC i HMEC-1, których ekspozycja na egzogenny VEGF nasiliła ich proliferację [299;303], natomiast neutralizacja IL-8/CXCL8 zahamowała migrację wywołaną przez medium kondycjonowane pochodzenia nowotworowego [298].

W niniejszych badaniach podjęto próbę określenia przyczyny zwiększonej produkcji VEGF i IL-8/CXCL8 przez LKMO pod wpływem syntetycznych analogów resweratrolu, koncentrując uwagę na produkcji RFT przez komórki. Jak wykazały wcześniejsze badania [306;307], RFT mogą pobudzać produkcję VEGF i IL-8/CXCL8, który to efekt odnotowano także w przypadku LKMO [308]. Przeprowadzone badania wydają się potwierdzać zasadność powyższego scenariusza, gdyż stwierdzono, że 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS zwiększają generowanie RFT przez młode i stare LKMO, przy czym w odniesieniu do komórek młodych silniejszy efekt odnotowano w odniesieniu do 3,3',4,4',5,5'-HHS.

5.8. Podsumowanie

Reasumując przeprowadzone badania można stwierdzić, że stilbeny, zarówno resweratrol, jak i jego dwa syntetyczne analogi są związkami mogącymi ograniczać określone elementy progresji komórek raka jajnika *in vitro*. Szczegółowa analiza uzyskanych wyników dowiodła jednak, że w tak zaprojektowanym modelu doświadczalnym wiele poruszonych kwestii wymaga dalszego doprecyzowania i/lub rewizji. Pierwszym z tych aspektów jest zauważalna współzależność między strukturą chemiczną związków (dotyczy to głównie pochodnych resweratrolu) a ich aktywnością biologiczną, która na podstawie analizy uzyskanych

wyników nie zawsze znajduje odpowiednie uzasadnienie w wiedzy chemicznej, jaką na tę chwilę dysponujemy. Dotyczy to przede wszystkim znaczenia liczby i umiejscowienia dodatkowych grup hydroksylowych, które ewidentnie wpływają na siłę wywieranych efektów biologicznych. Odrębną kwestią jest trwałość chemiczna związków, która jak wskazano już wcześniej, nie zawsze idzie w parze z ich aktywnością biologiczną. Ma to szczególne znaczenie dla syntetycznych stilbenów, które mimo zdecydowanie mniejszej trwałości niż resweratrol, wielokrotnie wywierały silniejsze od niego efekty biologiczne. Kluczowe w tym kontekście wydają się być zidentyfikowanie i ocena aktywności metabolitów testowanych analogów resweratrolu, których działaniu można, przynajmniej teoretycznie, przypisać część odnotowanych efektów. Widać to najlepiej w trzeciej dobie ekspozycji, kiedy to zawartość 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS w medium hodowlanym oscylowała w granicach 1% wartości wyjściowej.

Intrygującym zjawiskiem jest także ujawniona przeciwstawność niektórych efektów biologicznych, zachodzących pod wpływem resweratrolu i jego pochodnych. I w tym przypadku kluczowymi wydają się być dalsze, pogłębione badania strukturanych i czynnościowych różnic między naturalnym stilbenem i jego zmodyfikowanymi, syntetycznymi analogami. Pomimo przekonujących wyników szeregu przeprowadzonych testów, przydatność terapeutyczna resweratrolu i jego pochodnych powinna być zweryfikowana także w oparciu o model zwierzęcy, który jest w stanie wskazać ich realną wartość chemioterapeutyczną w złożonym układzie biologicznym *in vivo*. Jest to szczególnie ważne ze względu na fakt, że analogi resweratrolu okazały się ograniczać tylko określone wykładniki progresji komórek raka jajnika (np. proliferację), promując jednocześnie inne jej składowe (np. adhezję i migrację). Jednocześnie dało się zauważyć, że właściwie tylko resweratrol, choć wcale nie cechował się w każdym z ocenianych przypadków największą siłą działania, a niekiedy zachowywał się w sposób neutralny (nie wpływał na dany parametr), był związkiem działającym niemal każdorazowo w sposób pożądany, tj. hamując progresję komórek nowotworowych. Posługując się takim kryterium oceny terapeutycznej przydatności związków, będących kandydatami na leki, można wysnuć tezę, że badane w niniejszej rozprawie pochodne resweratrolu nie spełniają pokładanych w nich oczekiwań. Trudno bowiem sobie wyobrazić świadome stosowanie związku, który choć w minimalnym stopniu może nasilać postęp choroby. Z drugiej strony, jesli podejść do tego problemu w sposób mniej purystyczny, można przyjąć, że przeprowadzone badania są dobrym punktem

wyjścia do dalszych poszukiwań i analiz kolejnych syntetycznych, dodatkowo hydroksylowanych pochodnych resweratrolu, powstałych na strukturalnej bazie ocenianych tutaj związków. Pochodne te powinny jednak gwarantować zachowanie korzystnych terapeutycznie efektów 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS, przy jednoczesnym wykluczeniu rozpoznanych w niniejszej rozprawie efektów niepożądanych.

6. WNIOSKI

1. Pomimo, iż 3,3',4,4'-tetrahydroksy-*trans*-stilben i 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy-*trans*-stilben cechują się wysoką cytotoksycznością w stosunku do komórek raka jajnika, jak również w jednolity sposób indukują ich apoptozę i hamują proliferację, odnotowany jednocześnie ich pobudzający wpływ na właściwości adhezyjne i migracyjne komórek nowotworowych wyklucza możliwość wykorzystania tych analogów resweratrolu w chemioterapii tego typu nowotworu.

2. Czynnikiem limitującym terapeutyczne wykorzystanie 3,3',4,4'-tetrahydroksy-*trans*-stilbenu i 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy-*trans*-stilbenu w chorobie nowotworowej jajnika, szczególnie w kontekście ich stosowania dootrzewnowego, jest także pobudzający wpływ tych związków na zależną od komórek mezotelialnych proliferację i migrację komórek śródbłonka naczyniowego.

3. Spośród badanych stilbenów tylko resweratrol w jednolity sposób hamował wszystkie wykładniki progresji komórek nowotworowych, co wskazuje, że spośród trzech ocenianych związków tylko on może być rozpatrywany w kontekście wykorzystywania w chemioterapii raka jajnika.

4. Efekty biologiczne wywierane przez resweratrol, 3,3',4,4'-tetrahydroksy-*trans*-stilben i 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy-*trans*-stilben nie mają charakteru uniwersalnego, gdyż reakcja komórek raka jajnika na te związki jest w dużej mierze uzależniona od użytej do badań linii komórkowej.

5. Uzyskanie dla 3,3',4,4'-tetrahydroksy-*trans*-stilbenu i 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy-*trans*-stilbenu pożądanych efektów biologicznych w postaci indukcji śmierci komórek nowotworowych i zahamowania ich proliferacji uzasadnia dalsze badania nad zależnościami między strukturą i aktywnością syntetycznych pochodnych resweratrolu, których celem powinno być ustalenie struktury odpowiedzialnej za efekty pożądane oraz dalsza modyfikacja tych związków, celem wyeliminowania przyczyn występowania efektów niekorzystnych z punktu widzenia terapeutycznego.

Część wyników badań ujętych w niniejszej rozprawie doktorskiej została opublikowana w pracy: "*Resveratrol and its synthetic derivatives exert opposite effects on mesothelial cell-dependent angiogenesis via modulating secretion of VEGF and IL-8/CXCL8*", autorstwa: Mikuła-Pietrasik J., **Kuczmarska A**., Kucińska M., Murias M., Wierzchowski M., Winckiewicz M., Staniszewski R., Bręborowicz A., Książek K., opublikowanej w periodyku *Angiogenesis* (2012, 15(3):361-76).

Ponadto, wyniki tych badań zostały zaprezentowane w formie prezentacji zatytułowanej: "*Antagonistic effects of resveratrol and its synthetic analogues on mesothelial cell-dependent angiogenic behaviour of endothelial cells in vitro*", która została predstawiona w formie plakatu podczas 47 Kongresu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, który odbył się w Poznaniu w dniach 11-14 września 2012 roku. Doniesienie to zostało opublikowane w czasopiśmie *Acta Biochimica Polonica* (autorzy: **Kuczmarska A**., Mikuła-Pietrasik J., Książek K. Vol. 59, 3, p. 12., 2012).

7. PIŚMIENNICTWO

1. Prognoza ludności na lata 2008-2035(2009). 2013. GUS, http://www.stat.gov.pl/gus.

2. Tuchowska Paulina, Worach-Kardas Halina, and Marcinkowski Jerzy T. The most frequent malignant tumors in Poland - the main risk factors and opportunieties to optimize prevetive measures. Probl Hig Epidemiol , 166-171. 6-16-2013.

3. Wojciechowska U., Didkowska J, and Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2010 roku. 13-21. 2012.

4. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. Nat Rev Drug Discov 2006; 5: 493-506

5. Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK. Resveratrol: French paradox revisited. Front Pharmacol 2012; 3: 141

6. Fulda S. Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer. Drug Discov Today 2010; 15: 757-65

7. Piver B, Fer M, Vitrac X *et al.* Involvement of cytochrome P450 1A2 in the biotransformation of trans-resveratrol in human liver microsomes. Biochem Pharmacol 2004; 68: 773-82

8. De GC, Lichtman SM. Care of elderly women with ovarian cancer. Geriatr Nurs 2004; 25: 329-35

9. Rader JS, Neuman RJ, Brady J *et al.* Cancer among first-degree relatives of probands with invasive and borderline ovarian cancer. Obstet Gynecol 1998; 92: 589-95

10. Ben-Aharon I, Shalgi R. What lies behind chemotherapy-induced ovarian toxicity? Reproduction 2012; 144: 153-63

11. Fung-Kee-Fung M, Provencher D, Rosen B *et al.* Intraperitoneal chemotherapy for patients with advanced ovarian cancer: a review of the evidence and standards for the delivery of care. Gynecol Oncol 2007; 105: 747-56

12. Goff BA, Mandel L, Muntz HG, Melancon CH. Ovarian carcinoma diagnosis. Cancer 2000; 89: 2068-75

13. Cho KR, Shih I. Ovarian cancer. Annu Rev Pathol 2009; 4: 287-313

14. Kristensen GB, Trope C. Epithelial ovarian carcinoma. Lancet 1997; 349: 113-17

15. Hunn J, Rodriguez GC. Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. Clin Obstet Gynecol 2012; 55: 3-23

16. Audisio RA. The surgical risk of elderly patients with cancer. Surg Oncol 2004; 13: 169-73

17. Papamichael D. Challenges in treating older cancer patients: colon cancer. Ann Oncol 2008; 19 Suppl 7: vii104-vii108

18. Audisio RA, Bozzetti F, Gennari R *et al.* The surgical management of elderly cancer patients; recommendations of the SIOG surgical task force. Eur J Cancer 2004; 40: 926-38

19. Bouanene H, Harrabi I, Ferchichi S, Ben LH, Miled A. Factors predictive of elevated serum CA125 levels in patients with epithelial ovarian cancer. Bull Cancer 2007; 94: E18-E22

20. Ben-Ami I, Vaknin Z, Schneider D, Halperin R. Perioperative morbidity and mortality of gynecological oncologic surgery in elderly women. Int J Gynecol Cancer 2006; 16: 452-57

21. Hightower RD, Nguyen HN, Averette HE, Hoskins W, Harrison T, Steren A. National survey of ovarian carcinoma. IV: Patterns of care and related survival for older patients. Cancer 1994; 73: 377-83

22. Pieta B, Chmaj-Wierzchowska K, Opala T. Past obstetric history and risk of ovarian cancer. Ann Agric Environ Med 2012; 19: 385-88

23. Franceschi S, La VC, Booth M *et al.* Pooled analysis of 3 European case-control studies of ovarian cancer: II. Age at menarche and at menopause. Int J Cancer 1991; 49: 57-60

24. Bristow RE, Karlan BY. Ovulation induction, infertility, and ovarian cancer risk. Fertil Steril 1996; 66: 499-507

25. Rossing MA, Daling JR, Weiss NS, Moore DE, Self SG. Ovarian tumors in a cohort of infertile women. N Engl J Med 1994; 331: 771-76

26. Trabert B, Wentzensen N, Yang HP *et al.* Ovarian cancer and menopausal hormone therapy in the NIH-AARP diet and health study. Br J Cancer 2012; 107: 1181-87

27. Braem MG, Onland-Moret NC, van den Brandt PA *et al.* Reproductive and hormonal factors in association with ovarian cancer in the Netherlands cohort study. Am J Epidemiol 2010; 172: 1181-89

28. Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, Jacob EJ, Thun MJ. Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women. JAMA 2001; 285: 1460-1465

29. Lacey JV, Jr., Mink PJ, Lubin JH *et al.* Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer. JAMA 2002; 288: 334-41

30. Purdie DM, Bain CJ, Siskind V, Webb PM, Green AC. Ovulation and risk of epithelial ovarian cancer. Int J Cancer 2003; 104: 228-32

31. Mosgaard BJ, Lidegaard O, Kjaer SK, Schou G, Andersen AN. Infertility, fertility drugs, and invasive ovarian cancer: a case-control study. Fertil Steril 1997; 67: 1005-12

32. Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? Lancet 1971; 2: 163

33. Key TJ. Hormones and cancer in humans. Mutat Res 1995; 333: 59-67

34. Royar J, Becher H, Chang-Claude J. Low-dose oral contraceptives: protective effect on ovarian cancer risk. Int J Cancer 2001; 95: 370-374

35. Narod SA, Risch H, Moslehi R *et al.* Oral contraceptives and the risk of hereditary ovarian cancer. Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group. N Engl J Med 1998; 339: 424-28

36. Walker GR, Schlesselman JJ, Ness RB. Family history of cancer, oral contraceptive use, and ovarian cancer risk. Am J Obstet Gynecol 2002; 186: 8-14

37. Ness RB. Endometriosis and ovarian cancer: thoughts on shared pathophysiology. Am J Obstet Gynecol 2003; 189: 280-294

38. Schildkraut JM, Schwingl PJ, Bastos E, Evanoff A, Hughes C. Epithelial ovarian cancer risk among women with polycystic ovary syndrome. Obstet Gynecol 1996; 88: 554-59

39. Bewtra C, Watson P, Conway T, Read-Hippee C, Lynch HT. Hereditary ovarian cancer: a clinicopathological study. Int J Gynecol Pathol 1992; 11: 180-187

40. Lynch HT, Casey MJ, Snyder CL *et al.* Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. Mol Oncol 2009; 3: 97-137

41. Colombo N, Van GT, Parma G *et al.* Ovarian cancer. Crit Rev Oncol Hematol 2006; 60: 159-79

42. Harris R, Whittemore AS, Itnyre J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. III. Epithelial tumors of low malignant potential in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. Am J Epidemiol 1992; 136: 1204-11

43. Fairfield KM, Willett WC, Rosner BA, Manson JE, Speizer FE, Hankinson SE. Obesity, weight gain, and ovarian cancer. Obstet Gynecol 2002; 100: 288-96

44. Zhang M, Lee AH, Binns CW. Physical activity and epithelial ovarian cancer risk: a case-control study in China. Int J Cancer 2003; 105: 838-43

45. Cozen W, Peters R, Reichardt JK *et al.* Galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT) genotype and phenotype, galactose consumption, and the risk of borderline and invasive ovarian cancer (United States). Cancer Causes Control 2002; 13: 113-20

46. Huncharek M, Kupelnick B. Dietary fat intake and risk of epithelial ovarian cancer: a meta-analysis of 6,689 subjects from 8 observational studies. Nutr Cancer 2001; 40: 87-91

47. Konishi I, Kuroda H, Mandai M. Review: gonadotropins and development of ovarian cancer. Oncology 1999; 57 Suppl 2: 45-48

48. Bosetti C, Negri E, Franceschi S *et al*. Olive oil, seed oils and other added fats in relation to ovarian cancer (Italy). Cancer Causes Control 2002; 13: 465-70

49. Zenzes MT. Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. Hum Reprod Update 2000; 6: 122-31

50. Zhang Y, Coogan PF, Palmer JR, Strom BL, Rosenberg L. Cigarette smoking and increased risk of mucinous epithelial ovarian cancer. Am J Epidemiol 2004; 159: 133-39

51. Li XM, Ganmaa D, Sato A. The experience of Japan as a clue to the etiology of breast and ovarian cancers: relationship between death from both malignancies and dietary practices. Med Hypotheses 2003; 60: 268-75

52. Riman T, Dickman PW, Nilsson S, Nordlinder H, Magnusson CM, Persson IR. Some life-style factors and the risk of invasive epithelial ovarian cancer in Swedish women. Eur J Epidemiol 2004; 19: 1011-19

53. Shields T, Gridley G, Moradi T, Adami J, Plato N, Dosemeci M. Occupational exposures and the risk of ovarian cancer in Sweden. Am J Ind Med 2002; 42: 200-213

54. Cook LS, Kamb ML, Weiss NS. Perineal powder exposure and the risk of ovarian cancer. Am J Epidemiol 1997; 145: 459-65

55. Sarojini S, Tamir A, Lim H *et al.* Early detection biomarkers for ovarian cancer. J Oncol 2012; 2012: 709049

56. Jelovac D, Armstrong DK. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. CA Cancer J Clin 2011; 61: 183-203

57. Bręborowicz G: *Położnictwo i ginekologia tom 1-2*. Warszawa, PZWL, 2010

58. Odicino F, Pecorelli S, Zigliani L, Creasman WT. History of the FIGO cancer staging system. Int J Gynaecol Obstet 2008; 101: 205-10

59. Weiss NS, Homonchuk T, Young JL, Jr. Incidence of the histologic types of ovarian cancer: the U.S. Third National Cancer Survey, 1969-1971. Gynecol Oncol 1977; 5: 161-67

60. Kurman RJ, Shih I. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. Am J Surg Pathol 2010; 34: 433-43

61. Hamilton TC. Ovarian cancer, Part I: Biology. Curr Probl Cancer 1992; 16: 1-57

62. Nowak-Markwitz E, Jankowska A, Spaczynski M. [Gonadotropins and ovarian cancer]. Ginekol Pol 2005; 76: 153-62

63. Nowak-Markwitz E, Spaczynski M. [Ovarian cancer--modern approach to its origin and histogenesis]. Ginekol Pol 2012; 83: 454-57

64. Jager W, Wildt L, Lang N. Some observations on the effect of a GnRH analog in ovarian cancer. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1989; 32: 137-48

65. Cheng W, Liu J, Yoshida H, Rosen D, Naora H. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. Nat Med 2005; 11: 531-37

66. Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: does the emperor have no clothes? Gynecol Oncol 1999; 72: 437-42

67. Colgan TJ, Murphy J, Cole DE, Narod S, Rosen B. Occult carcinoma in prophylactic oophorectomy specimens: prevalence and association with BRCA germline mutation status. Am J Surg Pathol 2001; 25: 1283-89

68. Narod SA, Sun P, Ghadirian P *et al.* Tubal ligation and risk of ovarian cancer in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations: a case-control study. Lancet 2001; 357: 1467-70

69. Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP, Kenemans P, Verheijen RH. Tubal ligation and risk of ovarian cancer. Lancet 2001; 358: 844

70. Finch A, Shaw P, Rosen B, Murphy J, Narod SA, Colgan TJ. Clinical and pathologic findings of prophylactic salpingo-oophorectomies in 159 BRCA1 and BRCA2 carriers. Gynecol Oncol 2006; 100: 58-64

71. Medeiros F, Muto MG, Lee Y *et al.* The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. Am J Surg Pathol 2006; 30: 230-236

72. Lee Y, Miron A, Drapkin R *et al.* A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. J Pathol 2007; 211: 26-35

73. Ortiz BH, Ailawadi M, Colitti C *et al.* Second primary or recurrence? Comparative patterns of p53 and K-ras mutations suggest that serous borderline ovarian tumors and subsequent serous carcinomas are unrelated tumors. Cancer Res 2001; 61: 7264-67

74. Sharma A, Gentry-Maharaj A, Burnell M *et al.* Assessing the malignant potential of ovarian inclusion cysts in postmenopausal women within the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a prospective cohort study. BJOG 2012; 119: 207-19

75. Dinulescu DM, Ince TA, Quade BJ, Shafer SA, Crowley D, Jacks T. Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer. Nat Med 2005; 11: 63-70

76. Romero I, Bast RC, Jr. Minireview: human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy. Endocrinology 2012; 153: 1593-602

77. Amadori D, Sansoni E, Amadori A. Ovarian cancer: natural history and metastatic pattern. Front Biosci 1997; 2: g8-10

78. Gardner MJ, Jones LM, Catterall JB, Turner GA. Expression of cell adhesion molecules on ovarian tumour cell lines and mesothelial cells, in relation to ovarian cancer metastasis. Cancer Lett 1995; 91: 229-34

79. Iwanicki MP, Davidowitz RA, Ng MR *et al.* Ovarian cancer spheroids use myosin-generated force to clear the mesothelium. Cancer Discov 2011; 1: 144-57

80. Kenny HA, Nieman KM, Mitra AK, Lengyel E. The first line of intra-abdominal metastatic attack: breaching the mesothelial cell layer. Cancer Discov 2011; 1: 100-102

81. Witz CA, Monotoya-Rodriguez IA, Schenken RS. Whole explants of peritoneum and endometrium: a novel model of the early endometriosis lesion. Fertil Steril 1999; 71: 56-60

82. Niedbala MJ, Crickard K, Bernacki RJ. Interactions of human ovarian tumor cells with human mesothelial cells grown on extracellular matrix. An in vitro model system for studying tumor cell adhesion and invasion. Exp Cell Res 1985; 160: 499-513

83. Heath RM, Jayne DG, O'Leary R, Morrison EE, Guillou PJ. Tumour-induced apoptosis in human mesothelial cells: a mechanism of peritoneal invasion by Fas Ligand/Fas interaction. Br J Cancer 2004; 90: 1437-42

84. Kenny HA, Krausz T, Yamada SD, Lengyel E. Use of a novel 3D culture model to elucidate the role of mesothelial cells, fibroblasts and extra-cellular matrices on adhesion and invasion of ovarian cancer cells to the omentum. Int J Cancer 2007; 121: 1463-72

85. Cannistra SA, Kansas GS, Niloff J, DeFranzo B, Kim Y, Ottensmeier C. Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro is partly mediated by CD44H. Cancer Res 1993; 53: 3830-3838

86. Gardner MJ, Catterall JB, Jones LM, Turner GA. Human ovarian tumour cells can bind hyaluronic acid via membrane CD44: a possible step in peritoneal metastasis. Clin Exp Metastasis 1996; 14: 325-34

87. Strobel T, Swanson L, Cannistra SA. In vivo inhibition of CD44 limits intra-abdominal spread of a human ovarian cancer xenograft in nude mice: a novel role for CD44 in the process of peritoneal implantation. Cancer Res 1997; 57: 1228-32

88. Bourguignon LY, Zhu H, Shao L, Chen YW. CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration. J Biol Chem 2001; 276: 7327-36

89. Cannistra SA, Ottensmeier C, Niloff J, Orta B, DiCarlo J. Expression and function of beta 1 and alpha v beta 3 integrins in ovarian cancer. Gynecol Oncol 1995; 58: 216-25

90. Lessan K, Aguiar DJ, Oegema T, Siebenson L, Skubitz AP. CD44 and beta1 integrin mediate ovarian carcinoma cell adhesion to peritoneal mesothelial cells. Am J Pathol 1999; 154: 1525-37

91. Kanazashi SI, Sharma CP, Arnaout MA. Integrin-ligand interactions: scratching the surface. Curr Opin Hematol 1997; 4: 67-74

92. Heyman L, Kellouche S, Fernandes J, Dutoit S, Poulain L, Carreiras F. Vitronectin and its receptors partly mediate adhesion of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. Tumour Biol 2008; 29: 231-44

93. Tozer EC, Hughes PE, Loftus JC. Ligand binding and affinity modulation of integrins. Biochem Cell Biol 1996; 74: 785-98

94. Kenny HA, Kaur S, Coussens LM, Lengyel E. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. J Clin Invest 2008; 118: 1367-79

95. Rump A, Morikawa Y, Tanaka M *et al.* Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. J Biol Chem 2004; 279: 9190-9198

96. Stoeck A, Schlich S, Issa Y *et al.* L1 on ovarian carcinoma cells is a binding partner for Neuropilin-1 on mesothelial cells. Cancer Lett 2006; 239: 212-26

97. Rieppi M, Vergani V, Gatto C *et al.* Mesothelial cells induce the motility of human ovarian carcinoma cells. Int J Cancer 1999; 80: 303-7

98. Shibata K, Kikkawa F, Nawa A, Tamakoshi K, Suganuma N, Tomoda Y. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in human ovarian cancer cells cultured with conditioned medium from human peritoneal tissue. Clin Exp Metastasis 1997; 15: 612-19

99. Ren J, Xiao YJ, Singh LS *et al.* Lysophosphatidic acid is constitutively produced by human peritoneal mesothelial cells and enhances adhesion, migration, and invasion of ovarian cancer cells. Cancer Res 2006; 66: 3006-14

100. Carpenter PM, Dao AV. The role of hyaluronan in mesothelium-induced motility of ovarian carcinoma cells. Anticancer Res 2003; 23: 3985-90

101. Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Ino K, Nawa A, Kikkawa F. Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. Int J Cancer 2008; 122: 91-99

102. Porcile C, Bajetto A, Barbieri F *et al.* Stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12) stimulates ovarian cancer cell growth through the EGF receptor transactivation. Exp Cell Res 2005; 308: 241-53

103. Sengupta S, Xiao YJ, Xu Y. A novel laminin-induced LPA autocrine loop in the migration of ovarian cancer cells. FASEB J 2003; 17: 1570-1572

104. Xu J, Lai YJ, Lin WC, Lin FT. TRIP6 enhances lysophosphatidic acid-induced cell migration by interacting with the lysophosphatidic acid 2 receptor. J Biol Chem 2004; 279: 10459-68

105. Hirashima Y, Kobayashi H, Suzuki M, Tanaka Y, Kanayama N, Terao T. Transforming growth factor-beta1 produced by ovarian cancer cell line HRA stimulates attachment and invasion through an up-regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 in human peritoneal mesothelial cells. J Biol Chem 2003; 278: 26793-802

106. Stadlmann S, Amberger A, Pollheimer J *et al.* Ovarian carcinoma cells and IL-1beta-activated human peritoneal mesothelial cells are possible sources of vascular endothelial growth factor in inflammatory and malignant peritoneal effusions. Gynecol Oncol 2005; 97: 784-89

107. Sako A, Kitayama J, Yamaguchi H *et al.* Vascular endothelial growth factor synthesis by human omental mesothelial cells is augmented by fibroblast growth factor-2: possible role of mesothelial cell on the development of peritoneal metastasis. J Surg Res 2003; 115: 113-20

108. Gerber SA, Rybalko VY, Bigelow CE *et al.* Preferential attachment of peritoneal tumor metastases to omental immune aggregates and possible role of a unique vascular microenvironment in metastatic survival and growth. Am J Pathol 2006; 169: 1739-52

109. Spaczyńki, M., Nowak-Markwitz, E, and Kędzia, W. Praktyczna ginekolgia onkologiczna.Podręcznik dla lekarzy. 2012.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)

110. Bristow E, Tomacruz R, Armstrong D., et al. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era; a meta-analysis. J Clin Oncol 2002; 1248-59

111. Eisenhauer EL, bu-Rustum NR, Sonoda Y, Aghajanian C, Barakat RR, Chi DS. The effect of maximal surgical cytoreduction on sensitivity to platinum-taxane

chemotherapy and subsequent survival in patients with advanced ovarian cancer. Gynecol Oncol 2008; 108: 276-81

112. Young RC, Walton LA, Ellenberg SS *et al.* Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer. Results of two prospective randomized trials. N Engl J Med 1990; 322: 1021-27

113. Markman M, Bundy BN, Alberts DS *et al.* Phase III trial of standard-dose intravenous cisplatin plus paclitaxel versus moderately high-dose carboplatin followed by intravenous paclitaxel and intraperitoneal cisplatin in small-volume stage III ovarian carcinoma: an intergroup study of the Gynecologic Oncology Group, Southwestern Oncology Group, and Eastern Cooperative Oncology Group. J Clin Oncol 2001; 19: 1001-7

114. Alberts DS, Liu PY, Hannigan EV *et al.* Intraperitoneal cisplatin plus intravenous cyclophosphamide versus intravenous cisplatin plus intravenous cyclophosphamide for stage III ovarian cancer. N Engl J Med 1996; 335: 1950-1955

115. Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L *et al.* Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. N Engl J Med 2006; 354: 34-43

116. Bast RC, Jr. Biomarkers for ovarian cancer: new technologies and targets to address persistently unmet needs. Cancer Biomark 2010; 8: 161-66

117. Cannistra SA, Matulonis UA, Penson RT *et al.* Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer. J Clin Oncol 2007; 25: 5180-5186

118. Matulonis UA, Berlin S, Ivy P *et al.* Cediranib, an oral inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor kinases, is an active drug in recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer. J Clin Oncol 2009; 27: 5601-6

119. Campos SM, Ghosh S. A current review of targeted therapeutics for ovarian cancer. J Oncol 2010; 2010: 149362

120. Roupe KA, Remsberg CM, Yanez JA, Davies NM. Pharmacometrics of stilbenes: seguing towards the clinic. Curr Clin Pharmacol 2006; 1: 81-101

121. Roberti M, Pizzirani D, Simoni D *et al.* Synthesis and biological evaluation of resveratrol and analogues as apoptosis-inducing agents. J Med Chem 2003; 46: 3546-54

122. Waffo-Teguo P, Hawthorne ME, Cuendet M *et al.* Potential cancer-chemopreventive activities of wine stilbenoids and flavans extracted from grape (Vitis vinifera) cell cultures. Nutr Cancer 2001; 40: 173-79

123. Bavaresco L, Fregoni C, Cantu E, Trevisan M. Stilbene compounds: from the grapevine to wine. Drugs Exp Clin Res 1999; 25: 57-63

124. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. Anticancer Res 2004; 24: 2783-840

125. Pervaiz S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. FASEB J 2003; 17: 1975-85

126. Kopp P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? Eur J Endocrinol 1998; 138: 619-20

127. Gu X, Chu Q, O'Dwyer M, Zeece M. Analysis of resveratrol in wine by capillary electrophoresis. J Chromatogr A 2000; 881: 471-81

128. Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol addiction: to die or not to die. Mol Nutr Food Res 2009; 53: 115-28

129. Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S. Effects of stilbene components of the roots of Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc. on lipid metabolism. Chem Pharm Bull (Tokyo) 1982; 30: 1766-70

130. Fremont L. Biological effects of resveratrol. Life Sci 2000; 66: 663-73

131. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. J Agric Food Chem 2002; 50: 3337-40

132. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T. Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? Mutat Res 2008; 658: 68-94

133. Medina-Bolivar F, Condori J, Rimando AM *et al.* Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. Phytochemistry 2007; 68: 1992-2003

134. Espin JC, Garcia-Conesa MT, Tomas-Barberan FA. Nutraceuticals: facts and fiction. Phytochemistry 2007; 68: 2986-3008

135. Orallo F, Alvarez E, Camina M, Leiro JM, Gomez E, Fernandez P. The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. Mol Pharmacol 2002; 61: 294-302

136. Hao HD, He LR. Mechanisms of cardiovascular protection by resveratrol. J Med Food 2004; 7: 290-298

137. Renaud S, de LM. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. Lancet 1992; 339: 1523-26

138. Buryanovskyy L, Fu Y, Boyd M *et al.* Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with resveratrol. Biochemistry 2004; 43: 11417-26

139. Bertelli A, Falchi M, Lo SR, Morelli R. EPR evaluation of the antiradical activity of wines containing high concentrations of resveratrol. Drugs Exp Clin Res 2004; 30: 111-15

140. Olas B. Resweratrol jako dobroczyńca w profilaktyce chorób układu krążenia. Kosmos Problemy nauk biologicznych 2013; 55: 277-85

141. Cao Z, Li Y. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. Eur J Pharmacol 2004; 489: 39-48

142. Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. Cardiovasc Res 2000; 47: 549-55

143. Fukao H, Ijiri Y, Miura M *et al.* Effect of trans-resveratrol on the thrombogenicity and atherogenicity in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. Blood Coagul Fibrinolysis 2004; 15: 441-46

144. Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE *et al.* Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004; 287: L774-L783

145. Zhong M, Cheng GF, Wang WJ, Guo Y, Zhu XY, Zhang JT. Inhibitory effect of resveratrol on interleukin 6 release by stimulated peritoneal macrophages of mice. Phytomedicine 1999; 6: 79-84

146. Cullen JP, Morrow D, Jin Y *et al.* Resveratrol, a polyphenolic phytostilbene, inhibits endothelial monocyte chemotactic protein-1 synthesis and secretion. J Vasc Res 2007; 44: 75-84

147. Ferrero ME, Bertelli AE, Fulgenzi A *et al.* Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. Am J Clin Nutr 1998; 68: 1208-14

148. Hassan-Khabbar S, Vamy M, Cottart CH *et al.* Protective effect of post-ischemic treatment with trans-resveratrol on cytokine production and neutrophil recruitment by rat liver. Biochimie 2010; 92: 405-10

149. Docherty JJ, Smith JS, Fu MM, Stoner T, Booth T. Effect of topically applied resveratrol on cutaneous herpes simplex virus infections in hairless mice. Antiviral Res 2004; 61: 19-26

150. Evers DL, Wang X, Huong SM, Huang DY, Huang ES. 3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene (resveratrol) inhibits human cytomegalovirus replication and virus-induced cellular signaling. Antiviral Res 2004; 63: 85-95

151. Han YS, Zheng WH, Bastianetto S, Chabot JG, Quirion R. Neuroprotective effects of resveratrol against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. Br J Pharmacol 2004; 141: 997-1005

152. Huang TC, Lu KT, Wo YY, Wu YJ, Yang YL. Resveratrol protects rats from Abeta-induced neurotoxicity by the reduction of iNOS expression and lipid peroxidation. PLoS One 2011; 6: e29102

153. Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, Wolf G, Horn TF. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. Nitric Oxide 2003; 9: 64-76

154. Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Seifritz E, Wirz-Justice A, Muller-Spahn F. Red wine ingredient resveratrol protects from beta-amyloid neurotoxicity. Gerontology 2003; 49: 380-383

155. Lofrumento DD, Nicolardi G, Cianciulli A *et al.* Neuroprotective effects of resveratrol in an MPTP mouse model of Parkinson's-like disease: Possible role of SOCS-1 in reducing pro-inflammatory responses. Innate Immun 2013;

156. Lu KT, Ko MC, Chen BY *et al.* Neuroprotective effects of resveratrol on MPTP-induced neuron loss mediated by free radical scavenging. J Agric Food Chem 2008; 56: 6910-6913

157. Jin F, Wu Q, Lu YF, Gong QH, Shi JS. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. Eur J Pharmacol 2008; 600: 78-82

158. Jang M, Cai L, Udeani GO *et al.* Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science 1997; 275: 218-20

159. Berge G, Ovrebo S, Botnen IV *et al.* Resveratrol inhibits benzo[a]pyrene-DNA adduct formation in human bronchial epithelial cells. Br J Cancer 2004; 91: 333-38

160. Tsan MF, White JE, Maheshwari JG, Chikkappa G. Anti-leukemia effect of resveratrol. Leuk Lymphoma 2002; 43: 983-87

161. Stivala LA, Savio M, Carafoli F *et al.* Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. J Biol Chem 2001; 276: 22586-94

162. Kimura Y, Sumiyoshi M, Baba K. Antitumor activities of synthetic and natural stilbenes through antiangiogenic action. Cancer Sci 2008; 99: 2083-96

163. Srivastava RK, Unterman TG, Shankar S. FOXO transcription factors and VEGF neutralizing antibody enhance antiangiogenic effects of resveratrol. Mol Cell Biochem 2010; 337: 201-12

164. Garvin S, Ollinger K, Dabrosin C. Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. Cancer Lett 2006; 231: 113-22

165. Gauliard B, Grieve D, Wilson R *et al.* The effects of dietary phenolic compounds on cytokine and antioxidant production by A549 cells. J Med Food 2008; 11: 382-84

166. Mikula-Pietrasik J, Kuczmarska A, Kucinska M *et al.* Resveratrol and its synthetic derivatives exert opposite effects on mesothelial cell-dependent angiogenesis via modulating secretion of VEGF and IL-8/CXCL8. Angiogenesis 2012; 15: 361-76

167. Trapp V, Parmakhtiar B, Papazian V, Willmott L, Fruehauf JP. Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. Angiogenesis 2010; 13: 305-15

168. Fulda S, Debatin KM. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. Oncogene 2004; 23: 6702-11

169. Kubota T, Uemura Y, Kobayashi M, Taguchi H. Combined effects of resveratrol and paclitaxel on lung cancer cells. Anticancer Res 2003; 23: 4039-46

170. Laux MT, Aregullin M, Berry JP, Flanders JA, Rodriguez E. Identification of a p53-dependent pathway in the induction of apoptosis of human breast cancer cells by the natural product, resveratrol. J Altern Complement Med 2004; 10: 235-39

171. Zdrojweicz Z, Belowska-Bień K. Resweratrol - działanie i znaczenie kliniczne. Adv Clin Exp Med 2005; 5: 1051-56

172. Liontas A, Yeger H. Curcumin and resveratrol induce apoptosis and nuclear translocation and activation of p53 in human neuroblastoma. Anticancer Res 2004; 24: 987-98

173. Wang Q, Li H, Wang XW, Wu DC, Chen XY, Liu J. Resveratrol promotes differentiation and induces Fas-independent apoptosis of human medulloblastoma cells. Neurosci Lett 2003; 351: 83-86

174. Roman V, Billard C, Kern C *et al.* Analysis of resveratrol-induced apoptosis in human B-cell chronic leukaemia. Br J Haematol 2002; 117: 842-51

175. Jazirehi AR, Bonavida B. Resveratrol modifies the expression of apoptotic regulatory proteins and sensitizes non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. Mol Cancer Ther 2004; 3: 71-84

176. Opipari AW, Jr., Tan L, Boitano AE, Sorenson DR, Aurora A, Liu JR. Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. Cancer Res 2004; 64: 696-703

177. Gao S, Liu GZ, Wang Z. Modulation of androgen receptor-dependent transcription by resveratrol and genistein in prostate cancer cells. Prostate 2004; 59: 214-25

178. Wolter F, Stein J. Resveratrol enhances the differentiation induced by butyrate in caco-2 colon cancer cells. J Nutr 2002; 132: 2082-86

179. Niles RM, McFarland M, Weimer MB, Redkar A, Fu YM, Meadows GG. Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. Cancer Lett 2003; 190: 157-63

180. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY *et al.* Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan. Nature 2003; 425: 191-96

181. Zarse K, Schmeisser S, Birringer M, Falk E, Schmoll D, Ristow M. Differential effects of resveratrol and SRT1720 on lifespan of adult Caenorhabditis elegans. Horm Metab Res 2010; 42: 837-39

182. Wood JG, Rogina B, Lavu S *et al.* Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. Nature 2004; 430: 686-89

183. Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. Curr Biol 2006; 16: 296-300

184. Valenzano DR, Cellerino A. Resveratrol and the pharmacology of aging: a new vertebrate model to validate an old molecule. Cell Cycle 2006; 5: 1027-32

185. Chen L, Widom J. Molecular basis of transcriptional silencing in budding yeast. Biochem Cell Biol 2004; 82: 413-18

186. Tennen RI, Chua KF. Chromatin regulation and genome maintenance by mammalian SIRT6. Trends Biochem Sci 2011; 36: 39-46

187. Baur JA, Pearson KJ, Price NL *et al.* Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature 2006; 444: 337-42

188. Sasaki T, Maier B, Bartke A, Scrable H. Progressive loss of SIRT1 with cell cycle withdrawal. Aging Cell 2006; 5: 413-22

189. Mikula-Pietrasik J, Kuczmarska A, Rubis B *et al.* Resveratrol delays replicative senescence of human mesothelial cells via mobilization of antioxidative and DNA repair mechanisms. Free Radic Biol Med 2012; 52: 2234-45

190. Dai Z, Li Y, Quarles LD *et al.* Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. Phytomedicine 2007; 14: 806-14

191. Giovannelli L, Pitozzi V, Jacomelli M *et al.* Protective effects of resveratrol against senescence-associated changes in cultured human fibroblasts. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2011; 66: 9-18

192. Demidenko ZN, Blagosklonny MV. Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. Cell Cycle 2008; 7: 3355-61

193. Demidenko ZN, Zubova SG, Bukreeva EI, Pospelov VA, Pospelova TV, Blagosklonny MV. Rapamycin decelerates cellular senescence. Cell Cycle 2009; 8: 1888-95

194. Holian O, Walter RJ. Resveratrol inhibits the proliferation of normal human keratinocytes in vitro. J Cell Biochem Suppl 2001; Suppl 36: 55-62

195. Hsieh TC, Juan G, Darzynkiewicz Z, Wu JM. Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21(WAF1/CIP1), and suppresses

cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2. Cancer Res 1999; 59: 2596-601

196. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Jr., Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. Drug Metab Dispos 2004; 32: 1377-82

197. Murias M, Handler N, Erker T *et al.* Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure-activity relationship. Bioorg Med Chem 2004; 12: 5571-78

198. Murias M, Jager W, Handler N *et al.* Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship. Biochem Pharmacol 2005; 69: 903-12

199. Lee SK, Nam KA, Hoe YH *et al.* Synthesis and evaluation of cytotoxicity of stilbene analogues. Arch Pharm Res 2003; 26: 253-57

200. Rimando AM, Kalt W, Magee JB, Dewey J, Ballington JR. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in vaccinium berries. J Agric Food Chem 2004; 52: 4713-19

201. Mikstacka R, Rimando AM, Ignatowicz E. Antioxidant effect of trans-resveratrol, pterostilbene, quercetin and their combinations in human erythrocytes in vitro. Plant Foods Hum Nutr 2010; 65: 57-63

202. Remsberg CM, Yanez JA, Ohgami Y, Vega-Villa KR, Rimando AM, Davies NM. Pharmacometrics of pterostilbene: preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity. Phytother Res 2008; 22: 169-79

203. Cichocki M, Paluszczak J, Szaefer H, Piechowiak A, Rimando AM, Baer-Dubowska W. Pterostilbene is equally potent as resveratrol in inhibiting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activated NFkappaB, AP-1, COX-2, and iNOS in mouse epidermis. Mol Nutr Food Res 2008; 52 Suppl 1: S62-S70

204. Pan MH, Chang YH, Badmaev V, Nagabhushanam K, Ho CT. Pterostilbene induces apoptosis and cell cycle arrest in human gastric carcinoma cells. J Agric Food Chem 2007; 55: 7777-85

205. Pan MH, Gao JH, Lai CS *et al.* Antitumor activity of 3,5,4'-trimethoxystilbene in COLO 205 cells and xenografts in SCID mice. Mol Carcinog 2008; 47: 184-96

206. Alex D, Leong EC, Zhang ZJ *et al.* Resveratrol derivative, trans-3,5,4'-trimethoxystilbene, exerts antiangiogenic and vascular-disrupting effects in zebrafish through the downregulation of VEGFR2 and cell-cycle modulation. J Cell Biochem 2010; 109: 339-46

207. Pan MH, Lin CL, Tsai JH, Ho CT, Chen WJ. 3,5,3',4',5'-pentamethoxystilbene (MR-5), a synthetically methoxylated analogue of resveratrol, inhibits growth and induces

G1 cell cycle arrest of human breast carcinoma MCF-7 cells. J Agric Food Chem 2010; 58: 226-34

208. Sale S, Verschoyle RD, Boocock D *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: 736-44

209. Horvath Z, Marihart-Fazekas S, Saiko P *et al.* Novel resveratrol derivatives induce apoptosis and cause cell cycle arrest in prostate cancer cell lines. Anticancer Res 2007; 27: 3459-64

210. Piotrowska H, Myszkowski K, Ziolkowska A *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: 53-60

211. Piotrowska H, Kucinska M, Murias M. Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol. Mutat Res 2012; 750: 60-82

212. Kogut M, Lowry VK, Farnell M. Selective pharmacological inhibitors reveal the role of Syk tyrosine kinase, phospholipase C, phosphatidylinositol-3'-kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase in Fc receptor-mediated signaling of chicken heterophil degranulation. Int Immunopharmacol 2002; 2: 963-73

213. Luskova P, Draber P. Modulation of the Fcepsilon receptor I signaling by tyrosine kinase inhibitors: search for therapeutic targets of inflammatory and allergy diseases. Curr Pharm Des 2004; 10: 1727-37

214. Ulanova M, Puttagunta L, Marcet-Palacios M *et al.* Syk tyrosine kinase participates in beta1-integrin signaling and inflammatory responses in airway epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005; 288: L497-L507

215. Waffo TP, Fauconneau B, Deffieux G, Huguet F, Vercauteren J, Merillon JM. Isolation, identification, and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from vitis vinifera cell cultures. J Nat Prod 1998; 61: 655-57

216. Wieder T, Prokop A, Bagci B *et al.* Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblasts. Leukemia 2001; 15: 1735-42

217. Kimura Y, Baba K, Okuda H. Inhibitory effects of active substances isolated from Cassia garrettiana heartwood on tumor growth and lung metastasis in Lewis lung carcinoma-bearing mice (Part 2). Anticancer Res 2000; 20: 2923-30

218. Paulitschke V, Schicher N, Szekeres T *et al.* 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxystilbene impairs melanoma progression in a metastatic mouse model. J Invest Dermatol 2010; 130: 1668-79

219. Saiko P, Horvath Z, Murias M *et al.* Antitumor effects of 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxystilbene in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 2006; 25: 1013-17

220. Saiko P, Pemberger M, Horvath Z *et al.* Novel resveratrol analogs induce apoptosis and cause cell cycle arrest in HT29 human colon cancer cells: inhibition of ribonucleotide reductase activity. Oncol Rep 2008; 19: 1621-26

221. Murias M, Luczak MW, Niepsuj A *et al.* Cytotoxic activity of 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxystilbene against breast cancer cells is mediated by induction of p53 and downregulation of mitochondrial superoxide dismutase. Toxicol In Vitro 2008; 22: 1361-70

222. Horvath Z, Murias M, Saiko P *et al.* Cytotoxic and biochemical effects of 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxystilbene, a novel resveratrol analog in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. Exp Hematol 2006; 34: 1377-84

223. Maccario C, Savio M, Ferraro D *et al.* The resveratrol analog 4,4'-dihydroxy-trans-stilbene suppresses transformation in normal mouse fibroblasts and inhibits proliferation and invasion of human breast cancer cells. Carcinogenesis 2012; 33: 2172-80

224. Savio M, Coppa T, Bianchi L *et al.* The resveratrol analogue 4,4'-dihydroxy-trans-stilbene inhibits cell proliferation with higher efficiency but different mechanism from resveratrol. Int J Biochem Cell Biol 2009; 41: 2493-502

225. Lu J, Ho CH, Ghai G, Chen KY. Resveratrol analog, 3,4,5,4'-tetrahydroxystilbene, differentially induces pro-apoptotic p53/Bax gene expression and inhibits the growth of transformed cells but not their normal counterparts. Carcinogenesis 2001; 22: 321-28

226. Azzena U, Dettori Z, Idini MV, Pisano L, Sechi G. Regioselective reductive demethoxylation of 3,4,5-trimethoxystilbenes. Tetrahedron 2003; 59: 7961-66

227. Das J, Pany S, Majhi A. Chemical modifications of resveratrol for improved protein kinase C alpha activity. Bioorg Med Chem 2011; 19: 5321-33

228. Murias M, Miksits M, Aust S *et al.* Metabolism of resveratrol in breast cancer cell lines: impact of sulfotransferase 1A1 expression on cell growth inhibition. Cancer Lett 2008; 261: 172-82

229. Burbridge MF, Kraus-Berthier L, Naze M, Pierre A, Atassi G, Guilbaud N. Biological and pharmacological characterisation of three models of human ovarian carcinoma established in nude mice: use of the CA125 tumour marker to predict antitumour activity. Int J Oncol 1999; 15: 1155-62

230. Prislei S, Mariani M, Raspaglio G *et al.* RON and cisplatin resistance in ovarian cancer cell lines. Oncol Res 2010; 19: 13-22

231. Hamilton TC, Young RC, McKoy WM *et al.* Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. Cancer Res 1983; 43: 5379-89

232. Egawa-Takata T, Endo H, Fujita M *et al.* Early reduction of glucose uptake after cisplatin treatment is a marker of cisplatin sensitivity in ovarian cancer. Cancer Sci 2010; 101: 2171-78

233. Rogalska A, Gajek A, Szwed M, Jozwiak Z, Marczak A. The role of reactive oxygen species in WP 631-induced death of human ovarian cancer cells: a comparison with the effect of doxorubicin. Toxicol In Vitro 2011; 25: 1712-20

234. Behrens BC, Hamilton TC, Masuda H *et al.* Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. Cancer Res 1987; 47: 414-18

235. Yu W, Shun MC, Anderson K, Chen H, Sanders BG, Kline K. alpha-TEA inhibits survival and enhances death pathways in cisplatin sensitive and resistant human ovarian cancer cells. Apoptosis 2006; 11: 1813-23

236. Bruynzeel AM, bou El Hassan MA, Torun E, Bast A, van der Vijgh W, Kruyt FA. Caspase-dependent and -independent suppression of apoptosis by monoHER in Doxorubicin treated cells. Br J Cancer 2007; 96: 450-456

237. Bast A, Kaiserova H, den Hartog GJ, Haenen GR, van der Vijgh WJ. Protectors against doxorubicin-induced cardiotoxicity: flavonoids. Cell Biol Toxicol 2007; 23: 39-47

238. Wei X, Dombkowski D, Meirelles K *et al.* Mullerian inhibiting substance preferentially inhibits stem/progenitors in human ovarian cancer cell lines compared with chemotherapeutics. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 18874-79

239. Hamilton TC, Young RC, Ozols RF. Experimental model systems of ovarian cancer: applications to the design and evaluation of new treatment approaches. Semin Oncol 1984; 11: 285-98

240. Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. J Natl Cancer Inst 1977; 58: 209-14

241. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. J Natl Cancer Inst 1977; 59: 221-26

242. Van Bronswijk H, Verburgh HA, Bos HJ. Cytotoxic effect of commercial continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) fluids and bacterial exoproducts on human mesothelial cells in vitro. Perit Dial Int 1989; 9: 197-202

243. Hjelle JT, Golinska BT, Waters DC, Steidley KR, McCarroll DR, Dobbie JW. Isolation and propagation in vitro of peritoneal mesothelial cells. Perit Dial Int 1989; 9: 341-47

244. Hirano H, Kizaki T, Sashikata T, Maeda T, Yoshii Y, Mori H. Synovial sarcoma arising from the pleura: a case report with ultrastructural and immunohistological studies. Med Electron Microsc 2002; 35: 102-8

245. Ksiazek K, Piwocka K, Brzezinska A *et al.* Early loss of proliferative potential of human peritoneal mesothelial cells in culture: the role of p16INK4a-mediated premature senescence. J Appl Physiol 2006; 100: 988-95

246. Ksiazek K, Mikula-Pietrasik J, Jorres A, Witowski J. Oxidative stress-mediated early senescence contributes to the short replicative life span of human peritoneal mesothelial cells. Free Radic Biol Med 2008; 45: 460-467

247. Mikula-Pietrasik, J. Wpływ stilbenów (resweratrolu i jego analogów) na molekularne i czynnościowe wykładniki starzenia się ludzkich komórek mezotelium otrzewnowego in vitro. Rozprawa doktorska. 1-133. 2011. Katedra i Zakład Patofizjologii, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu.
Ref Type: Thesis/Dissertation

248. Gawlik T. Metody wykrywania apoptozy. Diagn Lab 2000; 36: 353-61

249. Ksiazek K, Jorres A, Witowski J. Senescence induces a proangiogenic switch in human peritoneal mesothelial cells. Rejuvenation Res 2008; 11: 681-83

250. Gary RK, Kindell SM. Quantitative assay of senescence-associated beta-galactosidase activity in mammalian cell extracts. Anal Biochem 2005; 343: 329-34

251. Książek K., Breborowicz A, Jorres A, Witowski J. Oxidative stress contributes to accelerated development of the senescent phenotype in human peritoneal mesothelial cells exposed to high glucose. Free Radic Biol Med 2007; 42: 636-41

252. Mizukami Y, Jo WS, Duerr EM *et al.* Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells. Nat Med 2005; 11: 992-97

253. Shibata T, Imaizumi T, Matsumiya T *et al.* Effect of MG132, a proteasome inhibitor, on the expression of growth related oncogene protein-alpha in human umbilical vein endothelial cells. Cytokine 2003; 24: 67-73

254. Ksiazek K, Mikula-Pietrasik J, Korybalska K, Dworacki G, Jorres A, Witowski J. Senescent peritoneal mesothelial cells promote ovarian cancer cell adhesion: the role of oxidative stress-induced fibronectin. Am J Pathol 2009; 174: 1230-1240

255. Johansson A, Ganss R. Remodeling of tumor stroma and response to therapy. Cancers (Basel) 2012; 4: 340-353

256. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. Nature 2013; 501: 346-54

257. Catalano V, Turdo A, Di FS, Dieli F, Todaro M, Stassi G. Tumor and its microenvironment: A synergistic interplay. Semin Cancer Biol 2013;

258. Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, Desprez PY. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. Cancer Metastasis Rev 2010; 29: 273-83

259. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. Annu Rev Pathol 2010; 5: 99-118

260. Dimri GP, Lee X, Basile G *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92: 9363-67

261. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 12072-77

262. Krtolica A, Campisi J. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. Int J Biochem Cell Biol 2002; 34: 1401-14

263. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92: 4337-41

264. Stakleff KS, Sloan T, Blanco D, Marcanthony S, Booth TD, Bishayee A. Resveratrol exerts differential effects in vitro and in vivo against ovarian cancer cells. Asian Pac J Cancer Prev 2012; 13: 1333-40

265. Ovesna Z, Kozics K, Bader Y *et al.* Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxy-trans-stilbene in three leukemia cell lines. Oncol Rep 2006; 16: 617-24

266. Cheng JC, Fang JG, Chen WF, Zhou B, Yang L, Liu ZL. Structure-activity relationship studies of resveratrol and its analogues by the reaction kinetics of low density lipoprotein peroxidation. Bioorg Chem 2006; 34: 142-57

267. Cannistra SA, DeFranzo B, Niloff J, Ottensmeir C. Functional heterogeneity of CD44 molecules in ovarian cancer cell lines. Clin Cancer Res 1995; 1: 333-42

268. Carmona-Fontaine C, Xavier JB. Altruistic cell death and collective drug resistance. Mol Syst Biol 2012; 8: 627

269. von Rosenvinge EC, O'May GA, Macfarlane S, Macfarlane GT, Shirtliff ME. Microbial biofilms and gastrointestinal diseases. Pathog Dis 2013; 67: 25-38

270. Muller C, Laval F, Soues S, Birck C, Charcosset JY. High cell density-dependent resistance and P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in mitoxantrone-selected Chinese hamster cells. Biochem Pharmacol 1992; 43: 2091-102

271. Wang W, Huang J, Wang X *et al.* PTPN14 is required for the density-dependent control of YAP1. Genes Dev 2012; 26: 1959-71

272. Zanchetta LM, Kirk D, Lyng F, Walsh J, Murphy JE. Cell-density-dependent changes in mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species production in human skin cells post sunlight exposure. Photodermatol Photoimmunol Photomed 2010; 26: 311-17

273. Ruweler M, Gulden M, Maser E, Murias M, Seibert H. Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant activities of resveratrol and analogues in C6 astroglioma cells in vitro. Chem Biol Interact 2009; 182: 128-35

274. Demoy M, Minko T, Kopeckova P, Kopecek J. Time- and concentration-dependent apoptosis and necrosis induced by free and HPMA copolymer-bound doxorubicin in human ovarian carcinoma cells. J Control Release 2000; 69: 185-96

275. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Nat Protoc 2006; 1: 1458-61

276. Michels G, Watjen W, Weber N *et al.* Resveratrol induces apoptotic cell death in rat H4IIE hepatoma cells but necrosis in C6 glioma cells. Toxicology 2006; 225: 173-82

277. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 2007; 35: 495-516

278. Ricci MS, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. Oncologist 2006; 11: 342-57

279. Chan KS, Koh CG, Li HY. Mitosis-targeted anti-cancer therapies: where they stand. Cell Death Dis 2012; 3: e411

280. Campisi J. Replicative senescence: an old lives' tale? Cell 1996; 84: 497-500

281. Wagner M, Hampel B, Bernhard D, Hala M, Zwerschke W, Jansen-Durr P. Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis. Exp Gerontol 2001; 36: 1327-47

282. Zhang Y, Gao Y, Zhang G *et al.* DNMT3a plays a role in switches between doxorubicin-induced senescence and apoptosis of colorectal cancer cells. Int J Cancer 2011; 128: 551-61

283. Dabrowska M, Mosieniak G, Skierski J, Sikora E, Rode W. Methotrexate-induced senescence in human adenocarcinoma cells is accompanied by induction of p21(waf1/cip1) expression and lack of polyploidy. Cancer Lett 2009; 284: 95-101

284. Sliwinska MA, Mosieniak G, Wolanin K *et al.* Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells. Mech Ageing Dev 2009; 130: 24-32

285. Cai YJ, Fang JG, Ma LP, Yang L, Liu ZL. Inhibition of free radical-induced peroxidation of rat liver microsomes by resveratrol and its analogues. Biochim Biophys Acta 2003; 1637: 31-38

286. Tadolini B, Juliano C, Piu L, Franconi F, Cabrini L. Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. Free Radic Res 2000; 33: 105-14

287. Schilder YD, Heiss EH, Schachner D *et al.* NADPH oxidases 1 and 4 mediate cellular senescence induced by resveratrol in human endothelial cells. Free Radic Biol Med 2009; 46: 1598-606

288. Low IC, Chen ZX, Pervaiz S. Bcl-2 modulates resveratrol-induced ROS production by regulating mitochondrial respiration in tumor cells. Antioxid Redox Signal 2010; 13: 807-19

289. Birchmeier W. Cell adhesion and signal transduction in cancer. Conference on cadherins, catenins and cancer. EMBO Rep 2005; 6: 413-17

290. Painter KJ, Armstrong NJ, Sherratt JA. The impact of adhesion on cellular invasion processes in cancer and development. J Theor Biol 2010; 264: 1057-67

291. Lee HS, Ha AW, Kim WK. Effect of resveratrol on the metastasis of 4T1 mouse breast cancer cells in vitro and in vivo. Nutr Res Pract 2012; 6: 294-300

292. Wang H, Zhou H, Zou Y *et al.* Resveratrol modulates angiogenesis through the GSK3beta/beta-catenin/TCF-dependent pathway in human endothelial cells. Biochem Pharmacol 2010; 80: 1386-95

293. Park JS, Kim KM, Kim MH *et al.* Resveratrol inhibits tumor cell adhesion to endothelial cells by blocking ICAM-1 expression. Anticancer Res 2009; 29: 355-62

294. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. Nat Rev Cancer 2003; 3: 362-74

295. Bian XW, Chen JH, Jiang XF, Bai JS, Wang QL, Zhang X. Angiogenesis as an immunopharmacologic target in inflammation and cancer. Int Immunopharmacol 2004; 4: 1537-47

296. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. Curr Mol Med 2003; 3: 643-51

297. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst 1990; 82: 4-6

298. Bijnsdorp IV, Capriotti F, Kruyt FA *et al.* Thymidine phosphorylase in cancer cells stimulates human endothelial cell migration and invasion by the secretion of angiogenic factors. Br J Cancer 2011; 104: 1185-92

299. Marchetti M, Vignoli A, Russo L *et al.* Endothelial capillary tube formation and cell proliferation induced by tumor cells are affected by low molecular weight heparins and unfractionated heparin. Thromb Res 2008; 121: 637-45

300. Coppe JP, Kauser K, Campisi J, Beausejour CM. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. J Biol Chem 2006; 281: 29568-74

301. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA *et al.* HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. J Invest Dermatol 1992; 99: 683-90

302. Boisen L, Drasbek KR, Pedersen AS, Kristensen P. Evaluation of endothelial cell culture as a model system of vascular ageing. Exp Gerontol 2010; 45: 779-87

303. Nanobashvili j, Jozkowicz A, Neumayer C *et al.* Comparison of angiogenic potential of human microvascular endothelial cells and human umbilical vein endothelial cells. Eur Surg 2003; 35: 214-18

304. Nunez MJ, Novio S, Balboa J, Seoane J, Suarez JA, Freire-Garabal M. Effects of resveratrol on expression of vascular endothelial growth factor in human gingival fibroblasts stimulated by periodontal pathogens. Acta Odontol Scand 2010; 68: 239-47

305. Knobloch J, Sibbing B, Jungck D *et al.* Resveratrol impairs the release of steroid-resistant inflammatory cytokines from human airway smooth muscle cells in chronic obstructive pulmonary disease. J Pharmacol Exp Ther 2010; 335: 788-98

306. Ivison SM, Wang C, Himmel ME *et al.* Oxidative stress enhances IL-8 and inhibits CCL20 production from intestinal epithelial cells in response to bacterial flagellin. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2010; 299: G733-G741

307. Kosmidou I, Xagorari A, Roussos C, Papapetropoulos A. Reactive oxygen species stimulate VEGF production from C(2)C(12) skeletal myotubes through a PI3K/Akt pathway. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 280: L585-L592

308. Witowski J, Ksiazek K, Jorres A. Glucose-induced mesothelial cell senescence and peritoneal neoangiogenesis and fibrosis. Perit Dial Int 2008; 28 Suppl 5: S34-S37

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy pt.: „**Wpływ syntetycznych pochodnych resweratrolu, 3,3',4,4'-tetrahydroksy-trans-stilbenu i 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy-trans-stilbenu, na wykładniki inwazyjności komórek raka jajnika w modelu in vitro**". Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem tytułu doktora nauk medycznych, 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 nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko **Angelika Kuczmarska**

Data, podpis.....