PRO XN

Dossier naukowe

Innowacyjna linia kosmetyków profesjonalnych oparta
o najsilniejszy antyoksydant, **Ksantohumol**

KSANTOHUMOL

Szerokie spektrum działania

Prace poglądowe

Aspekty biologiczne i technologiczne

Ksantohumol i inne prenyloflawonoidy szyszek chmielu – aspekty biologiczne i technologiczne

Jadwiga Gołąbczak, Edyta Gendaszewska-Darmach Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

1. Wstęp

Szyszki chmielu zawierają ważne dla piwowarstwa olejki eteryczne oraz gorzkie a- i b-kwasy, a także w mniejszych ilościach unikatowe prenylowane flawonoidy. Te trzy grupy związków są ze sobą biosyntetycznie powiązane, ich wspólnym prekursorem jest difosforan dimetyloallilu (DMAPP). Chmielowe prenyloflawonoidy występują w szyszkach głównie w postaci ksantohumolu (2',4',4-trihydroksy-6'-metoksy-3-(3-metylo-but-2-en-1-yl)chalkon). Ksantohumol charakteryzuje się szerokim spektrum aktywności biologicznej. Jest on silnym przeciwutleniaczem i zapobiega chorobie niedokrwiennej serca. Wykazuje także działanie przeciwgrzybicze, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe i przeciwmalaryczne. Szczególnie interesujące są antynowotworowe właściwości ksantohumolu, opisane po raz pierwszy przez naukowców z Oregon State University (Corvallis, USA) i podsumowane takim stwierdzeniem: "Xanthohumol is one of the more significant compo- unds for cancer chemoprevention that we have studied". W najnowszych danych potwierdzono ochronną rolę ksantohumolu, a także innych chmielowych flawonoidów na etapie inicjacji, promocji i progresji guza, opisano także molekularne podstawy mechanizmów działania tych fitozwiązków(…)

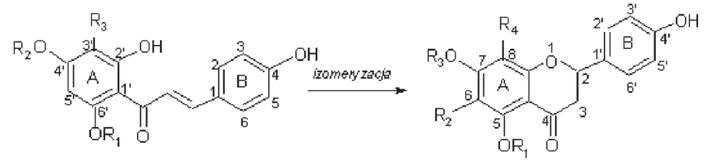
2. Charakterystyka prenyloflawonoidów chmielu

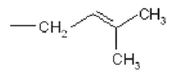
W szyszkach chmielu występują trzy ważne grupy wtórnych metabolitów: olejki eteryczne, gorzkie kwasy i prenyloflawonoidy (prenylochalkony i prenyloflawanony). Zainteresowanie badaczy skupiało się do niedawna na dwóch pierwszych (…) grupach tych metabolitów. Dopiero na podstawie wyników prac, wskazujących na potencjalne antynowotworowe właściwości chmielowych chalkonów i ich izomerów, naukowcy zwrócili uwagę na te związki.

(…) Prenylowane chalkony obejmują grupę kilkunastu pokrewnych związków i stanowią minimum 95% sumarycznej ilości chmielowych prenyloflawonoidów, szacowanej na 0,2-1,5% s.m. (rys. 1). Najważniejszym pod względem masowego udziału i aktywności biologicznej chalkonem jest ksantohumol(2',4,4'-trihydroksy-6'-me-toksy-3'-prenylochalkon). W strukturach utlenionych form ksantohumolu mogą występować niecykliczne grupy prenylowe lub podstawniki cykliczne, zawierające atom tlenu w pozycji C-4' b1dŸ C-6' pierścienia A. Innymi prenylochalkonami są: demetyloksantohumol (2',4,4',6'-tetrahydroksy-3'-prenylochalkon), a także ksantogalenol (2',6',4-trihydroksy-4'-metoksy-3'- prenylochalkon), zidentyfikowany w niektórych odmianach chmie-

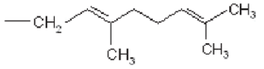
lu, rosnących w Ameryce Północnej i Azji Wschodniej. Przykładem geranylochalkonu jest 3'-geranylochalkonaryngenina (2',4,4',6'-te- trahydroksy-3'-geranylochalkon).

W cząsteczkach większości chalkonów jest obecna przynajmniej jedna wolna grupa 2'- lub 6'-hydroksylowa. Z tego względu chalkony łatwo ulegają izomeryzacji do odpowiednich flawonów w wyniku wewnątrzcząsteczkowej reakcji addycji Michaela. Szybkość tej reakcji zwiększą się wraz ze wzrostem temperatury i pH środowiska. W grupie izomerów chalkonów dominują flawony, zawierające grupy prenylowe w jednej lub obydwu pozycjach 6 i 8 (rys. 1). Ksantohumol (1) dysponuje jedną, zaś demetyloksantohumol (2), 3'-geranylochalkonaryngenina (4), a także ksantogalenol (3) dwiema grupami hydroksylowymi, które mogą uczestniczyć w reakcji cyklizacji pierścienia. Z tego powodu w reakcji cyklizacji ksantohumolu powstaje jeden izomer (5), a w analogicznych reakcjach pozostałych prenylochalkonów tworzą się dwie formy izomeryczne (odpowiednio





izoprenyl (3"-metylo-2"-butenyl)



geranyl (3",7"-dimetylo-2",6"-oktadienyl)

Prenylowany chalkon				Prenylowany flawanon				
L.p.	R_1	R_2	R_3	***L.p***	R_1	R_2	R_3	R_4
1. ksantohumol	CH_3	H	izoprenyl	***5***. izoksantohumol	CH_3	H	H	izoprenyl
2. demetylo-ksantohumol	H	H	izoprenyl	***6***. 6-prenylonaryngenina	H	izoprenyl	H	H
				7. 8-prenylonaryngenina	H	H	H	izoprenyl
3. ksantogalelol	H	CH_3	izoprenyl	***8***. 7-O-metylo-6-prenylonaryngenina	H	izoprenyl	CH_3	H
				9. 7-O-metylo-8-prenylonaryngenina	H	H	CH_3	izoprenyl
4. 3'- geranylo-chalkonaryngenina	H	H	geranyl	***10***. 6-geranylonaryngenina	H	geranyl	H	H
				11. 8-geranylonaryngenina	H	H	H	geranyl

Rys. 1. Chemiczne struktury prenyloflawonoidów szyszek chmielu [3,41].

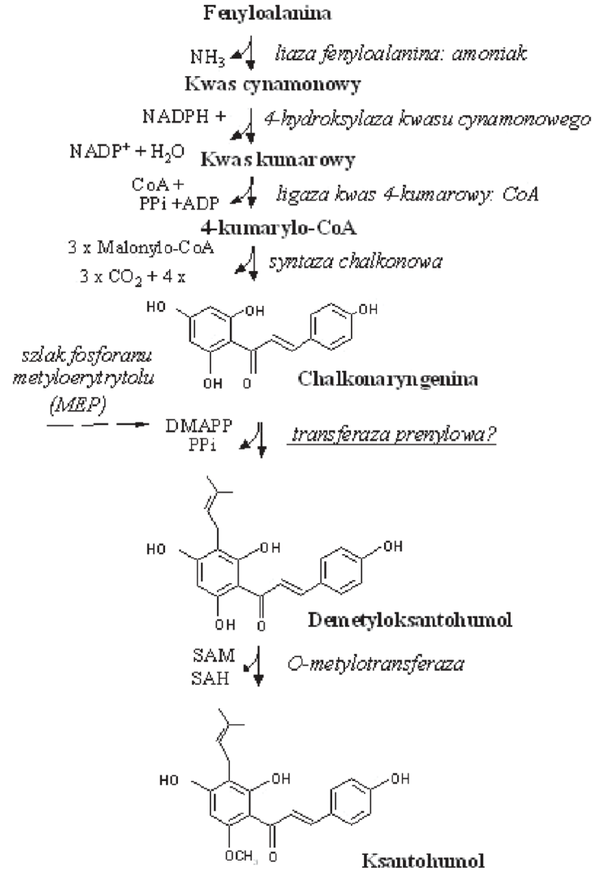
6 i 7, 8 i 9 oraz 10 i 11). Prenylochalkony, podobnie jak gorzkie kwasy, ulegają izomeryzacji na etapie warzenia brzeczki i występują w piwie niemal wyłącznie w postaci flawonów. Piwo zawiera 0,2-2 mg/l flawonów i jest uznawane za jedno z ważniejszych źródeł flawonoidów w ludzkiej diecie.

Ksantohumol stanowi 80-90% sumarycznej puli prenyloflawonoidów, jego ilość w suchej masie szyszek waha się w granicach 0,1-1%, w zależności od odmiany chmielu. W nielicznych danych literaturowych, dotyczących polskich odmian chmielu wskazuje się, że zawierają one od 0,5 (Izabela, Marynka) do 0,8% s. m. (Zula) ksantohumolu i pod tym względem należą do przodujących w Europie.

Zawartość w chmielu kolejnego prenylochalkonu, demetyloksantohumolu, jest znacznie mniejsza aniżeli ksantohumolu i mieści się w granicach 0,05-0,3%. Demetyloksantohumol uznawany jest za prekursora większości flawonoidów szyszek chmielu. W wyniku jego chemicznej izomeryzacji powstaje mieszanina złożona z ekwiwalentnych ilości racematów najważniejszych estrogenów chmielu: 6- i 8-prenylonaryngeniny (6 i 7). Izomeryzacja demetyloksantohumolu, tzw. konwersja Nastainczyka, może także zachodzić spontanicznie, podczas magazynowania szyszek chmielu.

3. Biosynteza ksantohumolu

Chmielowe prenyloflawonoidy, gorzkie kwasy oraz olejki eteryczne są ze sobą biosyntetycznie powiązane i nagromadzają się w lupulinie. Synteza mono- i seskwi- terpenów wymaga obecności pirofosforanów allilu o dłuższych łańcuchach, utworzonych z difosforanu dimetyloallilu (DMAPP) oraz difosforanu izopentenylu (IPP) (rys. 2). IPP jest syntetyzowany głównie w szlaku 2-C-metylo-4-fosforan D-erytritolu (MEP, ang. 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphate), funkcjonującym w plastydach oraz, w mniejszym stopniu, w cytozolowym szlaku kwasu mewalonowego. Utworzony IPP jest przekształcany do allilowego izomeru DMAPP przez izomerazę IPP (EC 5.3.3.2).



4. Biologiczna aktywność ksantohumolu

4.1. Aktywność antyoksydacyjna

Ksantohumol aktywnie neutralizuje wolne rodniki i zapobiega rozwojowi miażdżycy tętnic i chorób nowotworowych. Ksantohumol okazał się dziewięcio- i trzykrotne silniejszym zmiataczem rodników hydroksylowych i nadtlenkowych niż wzorcowy Trolox (kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylo-chroman-2-karboksylowy). Ksantohumol, w przeciwieństwie do izoksantohumolu i 8-prenylonaryngeniny, wykazywał także antyoksydacyjnż aktywność względem anionorodników ponadtlenkowych, generowanych przez oksydazę ksantynową, nie hamując przy tym bezpośrednio aktywności tego enzymu. Ponadto związek ten (IC_{50}= 2,6 mM) hamował powstawanie anionorodników ponadtlenkowych w systemie różnicujących się do granulocytów białaczkowych komórek HL-60, po ich stymulacji przez PMA (12-O-tetradeka-noilo-forbolo-13-octan,12-mirystyniano-13-octan forbolu).

W badaniach in vitro, prowadzonych przez Mirande i wsp. oraz Rodrigueza i wsp. udowodniono ochronne, antyoksydacyjne działanie prenylowanych chalkonów chmielu, zwłaszcza ksantohumolu i demetyloksantohumolu, względem lipoprotein o niskiej gęstości (LDL).

Ksantohumol zmniejszał peroksydacje lipidów o ponad 70% po 5 godzinach inkubacji, w porównaniu z układem kontrolnym.

Chalkony o większej liczbie grup prenylowych oraz prenyloflawanony wykazywały pod tym względem wyraźnie mniejszą aktywność, zaś nieprenylowane flawonoidy stymulowały utlenienie LDL.

4.2. Aktywność antydrobnoustrojowa i przeciwwirusowa

W badaniach Mizobuchi i Sato wykazano, że ksantohumol oraz prenyloflawanony: 6- i 8-prenylonaryngenina w stężeniu 3-12,5 μg/ml hamowały rozwój pleśni Trichophyton mentagrophytes oraz T. rubrum. Związki te, a także izoksantohumol wykazywały umiarkowane inhibujące działanie względem pleśni Mucor rouxianus oraz były nieaktywne względem drożdży Candida albicans, pleśni Fusarium oxysporum oraz bakterii Escherichia coli. Kontrolna naryngenina wykazywała natomiast minimalną aktywność antydrobnoustrojową. Autorzy na podstawie uzyskanych wyników sugerują, że obecność hydrofobowej grupy prenylowej sprzyja transportowi flawonoidów przez membranę cytoplazmatyczną lub też ułatwia wiązanie się tych związków z aktywnymi centrami enzymów.

Ksantohumol w stężeniach minimalnych (MIC, ang. *Minimum Inhibitory Concentration*), wynoszących 1-3 μg/ml, hamował wzrost bakterii Gram-dodatnich Staphylococcus aureus, Staphylococcus pyogenes oraz Staphylococcus epidermidis, powodujących zakażenia ropne skóry oraz zakażenia układowe o etiologii gronkowcowej (zapalenie płuc, posocznica). Wykazywał on także silne bakteriobójcze działanie względem dwóch innych, Gram-dodatnich patogenów skóry: Propionibacterium acnes oraz Kocura rhizophila. Jego minimalne stężenia bójcze (MBC, ang. *Minimum Bactericidal Concentration*) wynosiły odpowiednio 3 oraz 10 μg/ml. Ksantohumol hamował ponadto rozwój komórek *Streptococcus mutans* (MIC 12,5 μg/ml), powodujących próchnicę zębów, a także wykazywał działanie przeciwmalaryczne.

Ksantohumol w dawkach odpowiadających IC50: 0,82, 1,28 oraz 0,5 μg/ml hamował procesy indukowane przez wirus HIV-1: efekt cytopatyczny (tworzenie wielojądrowych komórek-syncytium), produkcje wirusowego antygenu p24 oraz odwrotnej transkryptazy w limfocytach C8166. Ten prenylochalkon (EC50 20,74 μg/ml) przeciwdziałał także replikacji HIV-1 w peryferyjnych jednojądrzastych komórkach krwi, natomiast nie hamował wnikania wirusa do komórek.

4.3. Aktywność antynowotworowa

4.3.1. Faza inicjacji nowotworzenia

Działanie ochronne ksantohumolu przed indukcję procesu nowotworzenia przejawia się nie tylko jego właściwościami antyoksydacyjnymi, ale także zdolnością do modulacji aktywności i/lub ekspresji enzymów detoksyfikujących ksenobiotyki. Stwierdzono, że ksantohumol hamuje aktywności enzymów I fazy odtruwania: monooksygenaz cytochromu P-450 (CYP). Henderson i wsp. stwierdzili, że ksantohumol w stężeniu 10 μM niemal całkowicie hamował aktywność O-deetylazy -7-etoksy- rezorufiny (EROD) związanej z CYP1A1 oraz CYP1B1. Gerhäuser i wsp. ustalili natomiast, że ksantohumol i izoksantohumol hamowały aktywność CYP1A w stężeniach IC50 odpowiednio 0,022 i 0,3 μM.

Wykazano także, że ksantohumol i sześć innych prenyloflawonoidów zwiększały ekspresje enzymu fazy II – reduktazy chinonowej (dehydrogenazy NAD(P)H (chinon); EC 1.6.5.2) w hodowli komórek wątrobiaka myszy Hepa 1c1c7. Ksantohumol hamował metaboliczną aktywacje 2-ami- no-3-metyloimidazo[4,5-f]chinoliny, co oznacza, że jest on potencjalnym czynnikiem chemoprewencyjnym względem rakotwórczych, heterocyklicznych amin aktywowanych przez CYP1A2.

4.3.2. Faza promocji nowotworzenia

Zwiększona synteza prostaglandyn przez cyklooksygenazy i nadmierna produkcja tlenku azotu przez indukowaną syntezę tlenku azotu (iNOS) przyczyniają się do rozwoju stanu zapalnego, a także onkogenezy.

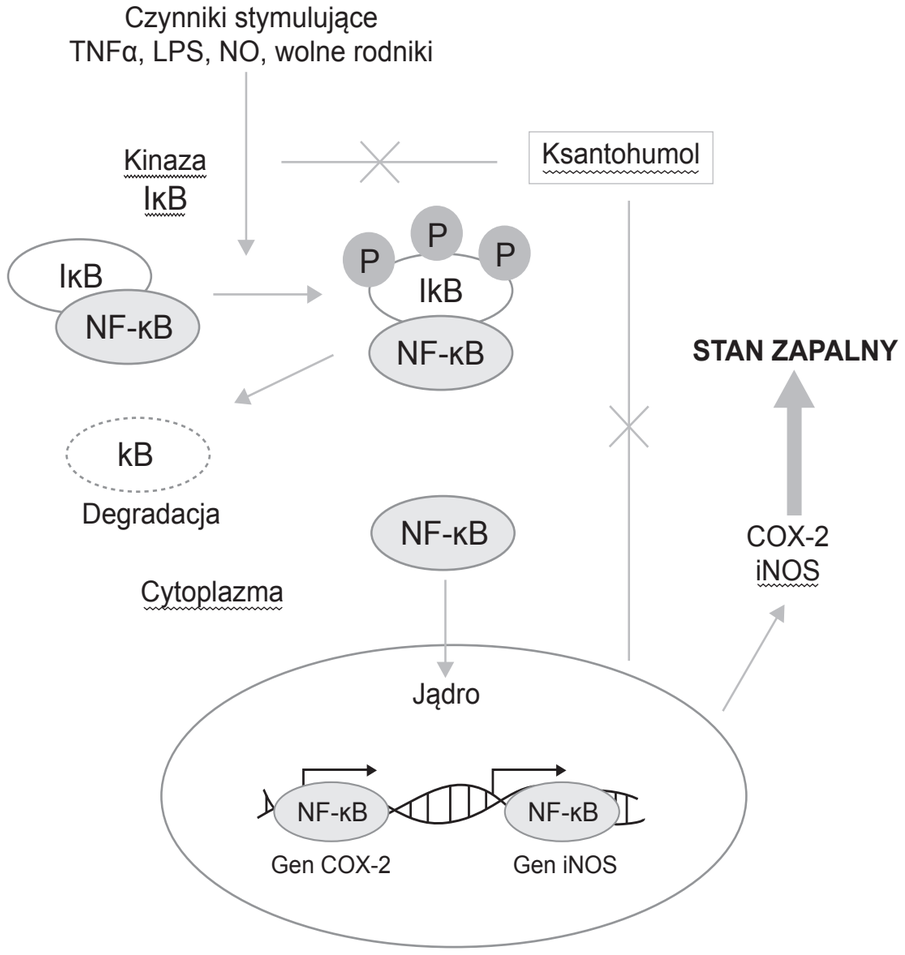
Ksantohumol, a także mieszanina prenylowanych flawonoidów (m. in. ksantohumol i dihydroksantohumol) zawarta w ekstrakcie szyszek chmielu wykazywała działanie przeciwzapalne hamując aktywność konstytutywnej cyklooksygenazy 1 (COX-1) i indukowanej cyklooksygenazy 2 (COX-2), a także obniżając ekspresje iNOS (rys. 3). Inhibujące COX-1 i COX-2 dawki ksantohumolu równoważne IC50 wynosiły odpowiednio 16,6 oraz 41,5 μM.

Wyniki te potwierdzono badaniami, dotyczącymi wpływu ksantohumolu na indukcje mediatorów rozwoju stanu zapalnego w komórkach mysich makrofagów RAW264.7, po ich stymulacji LPS (lipopolisacharyd patogennych bakterii G-). Ksantohumol redukował ekspresje receptorów LPS i w efekcie ograniczał aktywacje czynnika transkrypcyjnego NF-κB, co z kolei przyczyniało się do zahamowania produkcji prozapalnych cytokin oraz tlenku azotu przez makrofagi RAW264.7. Jest to zrozumiałe, zważywszy fakt, że NF-κB w jądrze aktywuje ekspresje całego spektrum genów odpowiedzialnych za rozwój stanu zapalnego (w tym produkcja wielu cytokin, syntazy tlenku azotu i cyklooksygenazy 2).

4.3.3. Faza progresji nowotworzenia

Mechanizm protekcyjnego działania ksantohumolu na etapie progresji procesu nowotworzenia jest wielokierunkowy. Obejmuje on m. in. inhibicje syntezy DNA, blokowanie cyklu komórkowego, różnicowanie komórkowe i aktywacje apoptozy.

Miranda i wsp. stwierdzili, że prenylowane flawonoidy chmielu hamują proliferacje komórek raka piersi MCF-7, komórek raka okrężnicy HT-29 oraz komórek raka jajnika A-2780, nie wpływając na wzrost prawidłowych hepatocytów. W badaniach tych najsilniejsze właściwości antyproliferacyjne wykazywał ksantohumol, zwłaszcza względem komórek A-2780 (EC50 = 0,52 μM). Antyproliferacyjny



Rys. 3. Przeciwzapalne działanie ksantohumolu na różnych etapach aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB; TNFα – czynnik martwicy n owotworu typu α; IκB – białka inhibitorowe czynnika jądrowego κB.

mechanizm działania ksantohumolu polegał zarówno na hamowaniu syntezy DNA (inhibicji aktywności polimerazy DNA α in vitro oraz inkorporacji tymidyny w cząsteczkę nowo syntetyzowanego DNA), jak również na zatrzymaniu cyklu komórkowego w fazie S.

Antyproliferacyjne i proapoptotyczne działanie ksantohumolu, a także, w mniejszym stopniu, izoksantohumolu i 8-prenylonaryngeniny względem komórek raka piersi linii Sk-Br-3 potwierdzono w badaniach Monteiro i wsp. Na podstawie wyników tych badań wykazano ponadto hamujący wpływ chmielowych prenyloflawonoidów na aktywność aromatazy P450 (niespecyficzna monooksygenaza; EC 1.14.14.1), odpowiedzialnej za konwersje androgenów w estrogeny. Co więcej, obecny w środowisku reakcyjnym estrogen, 17-B-estradiol, znosił hamującą aktywność flawonoidów. Te obserwacje sugerują możliwość uruchamiania przez flawonoidy innego, przeciwdziałającego rozwojowi raka piersi mechanizmu, jakim jest blokowanie syntezy estrogenu.

Ksantohumol powodował również zahamowanie proliferacji komórek raka okrężnicy linii HCT-116 poprzez wywoływanie procesu apoptozy. Właściwości pro- apoptotyczne tego związku stwierdzono również w badaniach nad limfocytami pobranymi od pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytarną, a także nad komórkami raka prostaty linii BPH-1, DU 145 i PC3. Ustalone dla ksantohumolu stężenia IC50, hamujące rozwój komórek DU 145 oraz PC3 wynosiły odpowiednio 12,3 i 13,2 μM.

Innym mechanizmem, za pośrednictwem którego ksantohumol, a także 8-preny-lonaringenina hamują proliferacje komórek nowotworowych jest indukowanie końcowego zróżnicowania komórek poprzez zahamowanie cyklu podziału komórki w fazie G.. Efekt ten został potwierdzony in vivo poprzez udokumentowane zahamowanie naciekania komórek nowotworowych u myszy (IC50 = 0,02 μM).
Jedną ze strategii terapii chorób nowotworowych jest hamowanie procesu angiogenezy. Ostatnio coraz częściej poszukuje się antyangiogennych fitozwiązków, przydatnych nie tylko w leczeniu, ale i w prewencji nowotworzenia (angioprewencja). Do takich związków należą bez wątpienia ksantohumol i inne prenyloflawonoidy chmielu. Stwierdzono, że ksantohumol ogranicza produkcje endogennych prostaglandyn, które inicjują ważny dla wzrostu guza proces tworzenia się nowych naczyń krwionośnych (angiogenezy). Limituje on także powstawanie tlenku azotu (p. 3.2). Wiadomo, że nadmierne i wydłużone w czasie generowanie NO aktywuje produkcje czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), który jest znanym induktorem angiogenezy. Ze względu na fakt, że warunkiem zarówno fizjologicznej jak i patologicznej angiogenezy jest proliferacja oraz migracja komórek śródbłonka naczyń, stały się one jednym z celów terapii przeciwnowotworowej. Stwierdzono in vitro, że ksantohumol w stężeniu < 10 μM wykazywał właściwości antyangiogenne powodując zahamowanie proliferacji i migracji tych komórek, jak również zdolności do tworzenia struktur kapilarnych. Co więcej, w warunkach in vivo powodował on zahamowanie wzrostu guza (mięsak Kaposiego) u myszy(…)

Profil farmakologiczny ksantohumolua

Profil farmakologiczny ksantohumolu, prenylowanego flawonoidu chmielu a (*Humulus lupulus*)

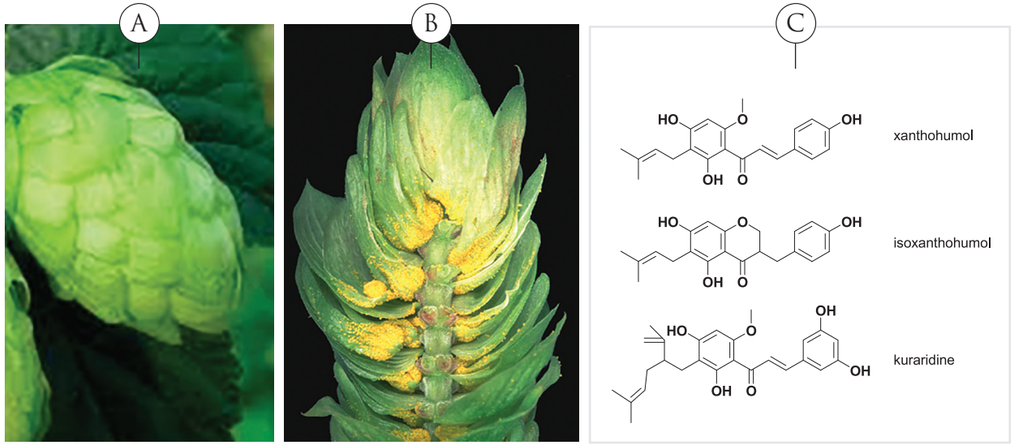
Ming Liu, Poul Erik Hansen , Genzhu Wang, Lin Qiu, Jianjun Dong, Hua Yin, Zhonghua Qian, Mei Yang i Jinlai Miao

1. Streszczenie

Żeńskie kwiatostany chmielu (*Humulus lupulus L.*), dobrze znany w przemyśle piwowarskim środek do chmielenia goryczkowego, są od dawna wykorzystywane w lekach medycyny tradycyjnej. Ksantohumol (XN) jest jedną z substancji bioaktywnych przyczyniających się do stosowania tych kwiatostanów w celach leczniczych. Wśród artykułów spożywczych głównym źródłem XN jest piwo, przy czym badane jest naturalne występowanie tego składnika. W ostatnich latach XN cieszył się dużym zainteresowaniem ze względu na jego działanie biologiczne. W niniejszej pracy przeglądowej opisano farmakologiczne aspekty XN i podsumowano najbardziej interesujące wyniki uzyskane w badaniach przedklinicznych poświęconych temu związkowi, w tym aktywność farmakologiczną, farmakokinetykę i bezpieczeństwo XN. Ponadto omówiono potencjalne wykorzystanie XN jako dodatku do żywności z uwzględnieniem licznych obszarów pozytywnego działania biologicznego tego związku.

2. Wprowadzenie

Kwiaty chmielu (*Humulus lupulus L.*) (rycina 1A, B) są szeroko stosowane na całym świecie jako surowiec w przemyśle piwowarskim w celu konserwacji piwa i nadawania mu charakterystycznego zapachu i smaku. Poza zastosowaniem w przemyśle piwowarskim chmiel od dłuższego czasu jest wykorzystywany do różnych celów medycznych. Prenylowane flawonoidy są jedną z substancji bioaktywnych przyczyniających się do jego stosowania w celach leczniczych. Prenylowanym flawonoidem najpowszechniej występującym w chmielu jest ksantohumol (XN, rycina 1C). W przyrodzie XN występuje powszechnie w roślinie chmielu, a jego ilość wynosi od 0,1 do 1% (sucha masa) w kwiatostanach żeńskich. XN wydzielany jest głównie jako składnik żywicy chmielu. Znajduje się również we włoskach na spodniej stronie młodych liści. Konwencjonalną metodą izolowania XN była wieloetapowa chromatografia na żelu krzemionkowym z wykorzystaniem różnych rozpuszczalników,



Rycina 1. Żeńskie kwiatostany chmielu (A); żywica chmielowa pokrywająca przylistki (B); budowa ksantohumolu, izoksantohumolu i kurarydyny (C).

podczas gdy ostatnio opracowany sposób wydajnego izolowania i oczyszczania XN z ekstraktu z chmielu opiera się na szybkiej chromatografii przeciwprądowej. Ustalonym prekursorem jest izolowanie XN metodą syntezy chemicznej z wykorzystaniem floroacetofenonu (2,'4',6'-trihydroksyacetofenon). Proces ten jest jednak skomplikowany, a całkowita ilość pozyskiwanego związku jest stosunkowo niewielka. Ekstrakcja, izolowanie i oczyszczanie z kwiatostanów żeńskich pozostaje więc główną metodą otrzymywania XN.

Budowa XN została opisana po raz pierwszy przez Verzele w 1957 roku, jednak dopiero w ostatniej dekadzie XN został odkryty na nowo, przy czym szczególnym punktem koncentracji badaczy było szerokie spektrum aktywności biologicznej tego związku, obejmujące aktywność przeciwnowotworową, przeciwcukrzycową, przeciwbakteryjną, przeciwzapalną i tak dalej. Dużo uwagi poświęca się również aktywności farmakologicznej XN w obszarze żywności funkcjonalnej i obszarze farmaceutycznym. Obszarem koncentracji niniejszej pracy przeglądowej jest aktywność biologiczna, farmakokinetyka, bezpieczeństwo i potencjalne zastosowanie XN w farmacji, z uwagi na fakt, że możliwe korzyści ze stosowania XN u ludzi zostały poruszone w jedynie nielicznych pracach.

3. Aktywność biologiczna, farmakokinetyka i bezpieczeństwo XN

2.1. Wpływ na zespół metaboliczny i zaburzenia powiązane

Zespół metaboliczny jest grupą czynników ryzyka obejmujących hiperglikemię, nadmiar tkanki tłuszczowej brzusznej, nieprawidłowy poziom cholesterolu i wysokie ciśnienie krwi.

Poparte dowodami naukowymi interwencje lecznicze na bazie roślin są praktyczną odpowiedzią na epidemię zespołu metabolicznego. Badania eksperymentalne wykazały, że XN może zmniejszać oddziaływanie szeregu czynników zespołu metabolicznego, jak opisano poniżej.

2.1.1. Aktywność przeciwotyłościowa

Badania donoszą, że XN hamuje adipogenezę lub zwiększa apoptozę komórek, dlatego związek ten może być wykorzystywany w zapobieganiu otyłości. W komórkach 3T3-L1 zarówno oczyszczony XN jak i ekstrakt z chmielu bogaty w XN hamuje różnicowanie preadypocytów zmniejszając ilość głównych białek markerowych adipocytów, takich receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (PPAR) Y, białka wiążące sekwencję wzmacniającą (ang. enhancer) CCAAT (C/EBP) α oraz białko wiążące kwasy tłuszczowe (aP2).

Ponadto XN indukuje również apoptozę dojrzałych adipocytów poprzez szlak mitochondrialny. Aktywność różnicująca i apoptyczna XN względem adipocytów jest większa, gdy związek ten jest stosowany w połączeniu z gugulsteronami i honokiolem. XN wpływa nie tylko na adipocyty, ale również na bioenergetykę komórek mięśniowych. XN może łagodzić przebieg zespołu metabolicznego, przynajmniej częściowo, indukując proces rozprzęgania mitochondrialnego i odpowiedź na stres. Najnowsze badania donoszą, że u szczurów, u których zastosowano dietę wysokotłuszczową wzbogaconą ekstraktem z chmielu, XN hamuje wzrost masy ciała, masy wątroby i stężenia triacylogliceroli w osoczu i wątrobie. Mechanizmy te mają związek z regulacją metabolizmu kwasów tłuszczowych w wątrobie i inhibicją wchłaniania tłuszczu w jelitach. Co ciekawe, wykazano, że α-mangostyna o strukturze podobnej do XN hamuje wewnątrzkomórkową syntazę kwasów tłuszczowych. XN zapobiega wzrostowi masy ciała w wyniku nadmiernego spożycia żywności i składników pokarmowych, jednak potwierdzenie tego zapobiegawczego działania wymaga przeprowadzenia dalszych badań klinicznych, a odpowiedzialne za nie mechanizmy molekularne pozostają nieodkryte.

2.1.2. Aktywność hipoglikemiczna

Nowym i szybko rozwijającym się trendem są podejścia żywieniowe wykorzystujące fitoskładniki odżywcze w celu profilaktyki lub leczenia cukrzycy typu 2 (DMT2). Pojawiają się doniesienia, według których XN zwiększa metabolizm glukozy w osoczu. Wysoka dawka XN (16,9 mg/kg) miała korzystny wpływ na masę ciała i metabolizm glukozy u otyłych szczurów samców. Sugeruje to, że XN posiada obiecujące właściwości, które można wykorzystać stosując związek jako środek terapeutyczny w leczeniu otyłości oraz zaburzeń metabolizmu glukozy i zespołu metabolicznego. Stężenie glukozy w osoczu oraz trójglicerydów w osoczu i wątrobie w mysim modelu кк-Ay uległo obniżeniu u myszy, którym podawano XN. U myszy, którym podawano XN, odnotowano również zmniejszony pobór wody, obniżoną masę białej tkanki tłuszczowej i zwiększone stężenie adiponektyny w osoczu.

To badanie wskazuje, że XN zwiększa metabolizm glukozy i łagodzi przebieg cukrzycy u myszy кк-Ay. Mechanizmy te prawdopodobnie mają związek z pełnieniem przez XN funkcji liganda wobec receptora farnezoidowego X, co jest pozytywnie skorelowane z akumulacją lipidów i reguluje ekspresję genów „z prądem" (ang. *downstream*). Ponadto badania wykazały, że spożywanie XN przez zwierzęta z cukrzycą konsekwentnie zmniejsza stan zapalny i stres oksydacyjny, umożliwiając kontrolę neowaskularyzacji i ułatwiając utrudnione w przypadku cukrzycy gojenie ran. Zahamowanie wychwytu glukozy w komórkach jelita, jak również inhibicja α-glukozydazy może także przyczyniać się do aktywności hipoglikemicznej XN. XN zawiera grupę akceptorową Michaela, która może oddziaływać kowalencyjnie z białkami. Inhibicja α-glukozydazy prawdopodobnie powodowana jest przez addycję Michaela reszt cysteiny do α,B-nienasyconej grupy ketonowej XN. Ponieważ reakcje Michaela są odwracalne, uwalnianie XN powoduje odzyskanie czynności enzymu w eksperymencie dializy, a zatem tłumaczy tryb odwracalnej inhibicji. Ponadto IX (patrz rycina 1), produkt spontanicznej cyklizacji XN nie posiadający właściwości elektrofilowych i bez zdolności do addycji Michaela, nie wykazuje ewidentnego efektu inhibicji α-glukozydazy. Kuraryдyna natomiast, której szkielet jest podobny do szkieletu XN i zawiera a,B-nienasyconą grupę ketonową, wykazuje o wiele silniejsze działanie inhibicyjne wobec α-glukozydazy. W związku z powyższym α-glukozydaza jest jednym z możliwych celów, przeciwko którym skierowany jest XN. Wszystkie te ustalenia wskazują, że XN wykazuje potencjalne korzyści w leczeniu otyłości i cukrzycy.

2.1.3. Aktywność przeciwhiperlipidemiczna

W modelu komórek HepG2 XN hamuje syntezę trójglicerydów (TG) w błonie mikrosomalnej i transfer nowo zsyntetyzowanych TG do światła mikrosomalnego. Ponadto XN powoduje dawkozależny spadek wydzielanej apolipoproteiny B (apo B) w warunkach zarówno podstawowych, jak i bogatych w lipidy, a spadek ten związany jest ze zwiększonym rozpadem apo B w komórkach. Wyniki te wskazują na potencjalne zastosowanie tego związku w leczeniu hipertriglicerydemii. Badania wykazały również, że XN jest inhibitorem acylotransferazy diacyloglicerolu, która bierze udział w syntezie trójglicerydów.

Wysoki poziom cholesterolu HDL – lipoprotein wysokiej gęstości – jest skorelowany z niskim ryzykiem miażdżycy tętnic. Zahamowanie czynności białka transportującego estry cholesterolu (CETP), które katalizuje transport cholesterolu pomiędzy lipoproteinami, prowadzi do podwyższenia poziomu cholesterolu HDL. CETP jest spodziewanym następnym celem antyaterogennym. Według ostatnich doniesień XN wykazuje silne działanie inhibicyjne wobec CETP w mieszanym trybie inhibicji niekompetycyjnej, a badanie analizujące zależność między strukturą a aktywnością wykazało, że struktura chalkonu i grupa prenylowa są niezbędne do aktywności inhibicyjnej tego związku. Potencjał inhibicyjny XN wobec endogennej aktywności CETP został potwierdzony w badaniach in vivo. Poprzez inhibicję CETP i stymulację sekrecji apolipoproteiny E (apo E) XN zapobiega gromadzeniu się cholesterolu w obszarach aterogennych, przyczyniając się do metabolizmu cholesterolu HDL u transgenicznych myszy z genem CETP, którym XN podawano ad libitum przez 18 tygodni. U myszy z niedoborem apo E (apo E–/–) karmionych dietą typu zachodniego XN ma również korzystny wpływ na tworzenie blaszek miażdżycowych [35]. Mechanizmy te mają związek z ich pozytywnym wpływem na poziom cholesterolu w osoczu, stężenie białka chemotaktycznego dla monocytów 1 (MCP-1) i metabolizm lipidów w wątrobie poprzez kinazę białkową aktywowaną przez AMP (AMPK).

Utlenianie lipoprotein o małej gęstości (LDL) uznawane jest za czynnik odgrywający ważną rolę w procesie powstawania miażdżycy tętnic. Będący chalkonem XN posiada również zdolność do wychwytywania nadtlenków. XN wykazuje dużą aktywność antyoksydacyjną, hamując proces utleniania LDL. W połączeniu z α-tokoferolem XN całkowicie hamuje utlenianie frakcji LDL cholesterolu indukowane jonami miedzi. Według tych wyników XN chroni przed utlenianiem się cholesterolu frakcji LDL u ludzi.

XN moduluje metabolizm lipidów, a zatem zapobiega chorobom układu sercowo-naczyniowego, takim jak miażdżyca tętnic. Związek ten nie tylko wykazuje bezpośrednią aktywność antyoksydacyjną, ale również uruchamia komórkowe mechanizmy obronne przed stresem oksydacyjnym wywołanym przez substancje chemiczne lub zabieg chirurgiczny.

2.2. Aktywność biologiczna związana z nowotworami

Nowotwór jest nieprawidłowym i niemożliwym do kontrolowania namnażaniem komórek lub tkanek. Wśród środków hamujących przebieg etapów karcynogenezy: inicjację, promocję i progresję nowotworów, znajduje się szerokie spektrum chemoprewencyjnych kandydatów do wykorzystania w leczeniu nowotworów. Wyniki doświadczalne pozyskane w ciągu ostatnich lat w licznych badaniach naukowych wykazują, że XN może zapobiegać powstawaniu nowotworów i leczyć te istniejące. Zidentyfikowano mechanizmy działania przeciwnowotworowego, w tym działanie chemoprewencyjne poprzez hamowanie inicjacji i rozwoju karcynogenezy oraz działanie lecznicze poprzez hamowanie proliferacji, indukcję apoptozy i hamowanie migracji i angiogenezy.

2.2.1. Działanie chemoprewencyjne w przypadku nowotworów

XN wykazuje działanie antymutagenne, przeciwdziałając powstawaniu mutacji powodowanych przez mutagen pokarmowy 2-amino-3-metyloimidazo[4,5-f]chinolinę (IQ). W badaniu z wykorzystaniem testu Salmonella/testu do oznaczania zawartości w mikrosomach i komórek ludzkiego nowotworu wątroby HepG2 XN zapobiega uszkodzeniom DNA powodowanym przez IQ. Mechanizmy te prawdopodobnie mają związek z hamowaniem aktywacji metabolicznej IQ przez ludzki cytochrom P450 1A2 (CYP1A2) i wiązaniem metabolitów IQ z DNA i białkami. XN chroni DNA nie tylko przed genotoksycznością wywoływaną przez IQ, ale również przed stresem oksydacyjnym powodowanym przez benzo(a)piren (BaP) i uszkodzeniami DNA w komórkach HepG2 i w świeżej tkance wątroby. W komórkach HepG2 XN powoduje znaczne zmniejszenie liczebności pęknięć nici DNA powodowanych przez wodoronadtlenek tert-butylu (induktor reaktywnych form tlenu), wskazując, że działanie ochronne tego związku realizowane jest poprzez indukcję komórkowych mechanizmów obronnych przed stresem oksydacyjnym. W innym badaniu wykazano, że XN znacznie zmniejsza pęknięcia pojedynczych nici DNA indukowane przez menadion w komórce Hepa1c1c7 i wykazuje dobrą aktywność chemoprewencyjną poprzez indukcję reduktazy chinonowej. Mechanizm indukcji aktywności reduktazy chinonowej przez XN oparty jest na alkilowaniu białka Keap1 (ang. *Kelch-like ECH associated protein 1*). Keap1 powoduje sekwestrację jądrowego czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (ang. *nuclear factor E2-related factor 2*) w cytoplazmie, regulując ekspresję reduktazy chinonowej. Analiza właściwości przeciwnowotworowych na etapach inicjacji, promocji i progresji w ramach karcynogenezy wykazała, że XN jest silnym środkiem chemoprewencyjnym. Mimo iż mechanizm ochronnego działania XN nie został jeszcze w pełni wyjaśniony, zgromadzone dotychczas wyniki nie tylko wskazują na przeciwgenotoksyczne działanie XN wobec wielu mutagenów, ale również dostarczają dowodów potwierdzających potencjał tego związku w zapobieganiu nowotworom.

2.2.2. Aktywność antyangiogenna

Tworzenie nowych naczyń w procesie waskularyzacji warunkuje rozwój nowotworu i powstawanie przerzutów. Inhibicja angiogenezy nowotworu jest zatem obiecującą strategią leczenia i profilaktyki nowotworów. Jeden z głównych mechanizmów przeciwnowotworowego działania XN polega na oddziaływaniu tego związku na komórki śródbłonka i naczynia krwionośne oraz na jego aktywności inhibicyjnej wobec angiogenezy nowotworu.

XN podawany myszom w wodzie pitnej hamuje wzrost nowotworu naczyniowego in vivo poprzez inhibicję angiogenezy nowotworu. W modelu mysiego ksenoprzeszczepu ludzkiego raka piersi MX-1 podskórne podawanie XN (w dawce 1 mg/g masy ciała) przez 14 dni myszom SCID znacznie – o 30% – zmniejsza neowaskularyzację powodowaną przez nowotwór. Mechanizmy hamowania angiogenezy przez XN są związane z blokadą zarówno jądrowego czynnika transkrypcyjnego κB (NFκB) jak i szlaków Akt w komórkach śródbłonka. XN zakłóca kilka etapów procesu angiogennego, w tym hamuje inwazję komórek śródbłonka i migrację, rozwój i tworzenie struktur rurkowatych w komórkach HUVEC i komórkach HMEC-1. Identyczną aktywność zaobserwowano także w komórkach mięśni gładkich aorty płodów ludzkich. XN wykazuje jednak działanie przeciwne, jeżeli komórki HUVEC były hodowane razem z komórkami mięśni gładkich aorty płodów ludzkich, prowadząc do wzrostu liczby struktur przewodopodobnych (ang. *cord structures*) i nie wykazując działania inhibicyjnego w dojrzałych naczyniach, co wskazuje, że XN oddziałuje głównie na naczynia angiogenne, lecz nie stabilne. Poza tym oprócz bezpośredniego oddziaływania na komórki naczyń XN hamuje również wytwarzanie czynników angiogennych w komórkach raka trzustki i blokuje angiogenezę w przebiegu raka trzustki, np. czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) i interleukinę 8 (IL-8). Inhibicja wytwarzania czynników angiogennych uznawana jest za proces następujący poprzez inhibicję NFκB.

Silna aktywność antyangiogenna XN wskazuje, że związek ten może być przydatny nie tylko z powodu jego potencjalnego zastosowania związanego z angiogenezą nowotworów, lecz także ze względu na możliwość jego wykorzystania w leczeniu innych chorób związanych z procesem angiogenezy, na przykład endometriozy, oraz jako środka wspomagającego gojenie ran.

2.2.3. Aktywność proapoptotyczna i aktywność modulacyjna wobec autofagii

Zasadniczo zarówno apoptoza jak i autofagia są szlakami supresorowymi nowotworu. Apoptoza uniemożliwia przeżycie komórek nowotworowych, podczas gdy autofagia sprzyja rozpadowi cząsteczek onkogennych, a zatem zapobiega rozwojowi nowotworu. Niemniej jednak w warunkach stresowych autofagia przyczynia się do większego przeżycia komórek nowotworowych. W związku z powyższym apoptoza indukowana lekami lub modulacja autofagii może być skuteczną strategią leczenia nowotworów.

Wielu badaczy wykazało, że XN cechuje aktywność przeciwnowotworowa polegająca na hamowaniu proliferacji i indukowaniu apoptozy komórek nowotworowych. XN indukuje apoptozę licznych typów komórek nowotworowych, w tym komórek ludzkiego raka gruczołu krokowego, białaczki, raka jajnika, raka wątrobowokomórkowego, raka piersi czy ludzkiego glejaka wielopostaciowego. Przykładowo XN wykazał silną aktywność przeciwnowotworową w przypadku raka piersi w badaniach na linii komórkowej MCF-7 i w przypadku raka gruczołu krokowego w badaniach na linii komórkowej HT-29, a także inhibicję silniejszą niż w grupie kontrolnej pozytywnej, w której zastosowano cisplatynę. Budowa szkieletu flawonoidów i modyfikacja grupy prenylowej może wpływać na aktywność przeciwnowotworową, lecz różni się w zależności od linii komórkowej, wskazując na występowanie wielu mechanizmów lub celów oddziaływania. Apoptoza indukowana przez XN jest związana głównie z regulacją w górę antyapoptotycznych białek, regulacją w dół proapoptotycznych białek i aktywacją prokaspaz, przy czym wydaje się, że XN aktywuje zarówno receptor śmierci, jak i mitochondrialne szlaki apoptozy. Ponadto istnieją doniesienia, według których odpowiedź w postaci stresu oksydacyjnego i odpowiedź w postaci stresu retikulum endoplazmatycznego również biorą udział w apoptozie indukowanej przez XN. Co więcej, fosforylacja kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym 1/2 (ERκ1/2) i szlaku Raf-1 (ang. Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-1), może być także aktywowana przez XN w komórkach rdzeniastego raka tarczycy. Wykazano, że XN indukuje apoptozę poprzez hamowanie aktywacji NFκB. W apoptozie indukowanej przez XN biorą również udział inne mechanizmy. Jednym z przykładów jest hamowanie aktywności topoizomerazy I i aromatazy, a także zmniejszanie ilości wytwarzanego tlenku azotu.

XN może być również silnym czynnikiem uczulającym w chemioterapii i radioterapii, prowadząc do apoptozy. XN uczula komórki MCF-7/ADR na radioterapię. Po zastosowaniu XN oporność wielolekowa 1 (MDR1), poziom receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) oraz poziom transduktora i aktywatora sygnału transkrypcji 3 (STAT3) zmniejsza się w komórkach MCF-7/ADR, podczas gdy poziom receptora śmierci (DR)-4 i ekspresja DR-5 zwiększa się. XN znacznie zwiększa aktywność przeciwnowotworową liganda czynnika martwicy nowotworu indukującego apoptozę (TRAIL) i uczula komórki nowotworowe oporne na działanie TRAIL poprzez aktywację zewnątrzpochodnego szlaku apoptozy, ze zwiększoną ekspresją receptora DR-5 w komórkach HeLa i komórkach raka gruczołu krokowego LNCaP. XN, wraz z IX, 6PN i 8PN, jest inhibitorem transportowego białka oporności raka piersi (BCRP/ABCG2), co wskazuje na znaczenie tego związku pod względem biodostępności i oporności wielolekowej. Według naszej najlepszej wiedzy nie istnieje jednak żadne doniesienie dotyczące inhibicji in vivo i opóźnienia rozwoju nowotworu.

Oprócz możliwości potencjalnego wykorzystania w leczeniu nowotworów litych XN wykazuje oczywiste działanie inhibicyjne wobec nowotworów hematologicznych, takich jak białaczka. XN zabija komórki przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej, powodując apoptozę. XN indukuje apoptozę komórek mieloidalnych linii nowotworowej białaczki przewlekłej κ562, wywołując wzrost liczebności wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*). XN hamuje ekspresję Bcr-Abl zarówno na poziomie mRNA, jak i na poziomie białka. Ponadto apoptoza powodowana przez XN w komórkach białaczkowych związana jest z inhibicją NFκB poprzez modyfikację przez XN reszt cysteiny kinazy IκBα i NFκB. Podawanie XN w dawce 50 mg/mysz (5 dni/tydzień) spowodowało znaczny wzrost długości życia zwierząt poprzez opóźnienie wystąpienia zaburzeń neurologicznych z powodu rozprzestrzenienia się komórek białaczkowych. W związku z powyższym XN stanowi obiecujący środek do możliwego wykorzystania w leczeniu białaczki, choć jego rzeczywiste wykorzystanie wymaga przeprowadzenia w najbliższej przyszłości badań klinicznych.

Autofagia jest niespecyficznym szlakiem degradacji składników wielkocząsteczkowych – białek, biorącym udział w patogenezie nowotworów i chorób neurodegeneracyjnych. Najnowsze badania wskazują, że XN upośledza dojrzewanie autofagosomów ludzkich komórek naskórzaka linii A431. Mechanizm tego procesu polega na wiązaniu XN bezpośrednio do domeny N białka zawierającego walozynę (VCP, ang. Valosin-Containing Protein), wskutek czego XN działa jako inhibitor VCP. VCP jest białkiem niezbędnym do dojrzewania autofagosomów. Modulacja autofagii przez XN prawdopodobnie przyczynia się do mechanizmów leżących u podstaw aktywności przeciwnowotworowej XN, choć udzielenie odpowiedzi na pytanie, czy ta autofagia hamuje czy promuje apoptozę powodowaną przez XN, wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

2.2.4. Aktywność przeciwinwazyjna

Przerzuty, charakterystyczne dla nowotworów wysoce złośliwych, cechujących się niskim wskaźnikiem powodzenia leczenia, są jedną z głównych przyczyn zwiększonej śmiertelności u chorych na nowotwory. Zahamowanie inwazji komórek rakowych jest zatem bardzo istotne z perspektywy skutecznych terapii przeciwnowotworowych.

XN posiada zdolność do hamowania inwazji komórek linii MCF-7/6 ludzkiego raka piersi, wykazaną w badaniu inwazji wykorzystującym model serca pisklęcia, a także do hamowania inwazji komórek linii T47-D w badaniu inwazji wykorzystującym test kolagenowy. Mechanizm przeciwinwazyjnego działania XN związany jest z regulacją w górę kompleksu E-kadheryna/katenina, wykazującego działanie supresorowe w stosunku do inwazji. Prostaglandyna E2 (PGE2) aktywuje kilka szlaków uczestniczących w przewlekłym zapaleniu związanym z nowotworem. XN posiada potencjał do tłumienia zdolności migracji linii komórkowych raka dróg żółciowych poprzez hamowanie wytwarzania PGE2. Metaloproteinazy macierzy (MMP, ang. Matrix Metalloproteinase) odgrywają dużą rolę na różnych etapach rozwoju nowotworu, w tym na etapie nabywania właściwości inwazyjnych i metastatycznych. XN wykazuje silne działanie inhibicyjne wobec fenotypu inwazyjnego w komórkach raka piersi z negatywną ekspresją receptora estrogenowego, receptora progesteronowego i receptora typu 2 ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu, a działanie to opiera się na regulacji w dół MMP-2 i/lub MMP-9. Receptor chemokiny CXC (cysteina-X-cysteina) typu 4 (CXCR4) ulega nadekspresji w wielu nowotworach i pośredniczy w zadomawianiu się komórek nowotworowych w miejscach odległych, poprzez ekspresję liganda pokrewnego receptora, CXCL12. XN hamuje ekspresję CXCR4 w komórkach nowotworowych na poziomie transkrypcji poprzez blokowanie endogennej aktywacji NFkB, regulującego ekspresję CXCR4 w komórkach nowotworowych. XN powoduje zatem ustanie inwazji komórkowej indukowanej przez CXCL12 zarówno w komórkach raka piersi, jak i w komórkach raka jelita grubego. Ponadto XN hamuje powstawanie wad okrągłych powodowanych przez chemorepelenty w monowarstwach komórek śródbłonka naczyń limfatycznych, hamując aktywność cytochromu P450, selektyny E i NFκB oraz ekspresję cząsteczki adhezji międzykomórkowej 1 (ICAM-1, ang. *intercellular adhesion molecule 1*). XN zmniejsza adhezję komórek nowotworowych do komórek śródbłonka poprzez inhibicję markerów przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT, ang. epithelial-to-mesenchymal transition) i mobilności komórek, takich jak paksylina, łańcuch lekki miozyny 2 i S100A4 w komórkach raka piersi. XN hamuje również inwazję komórek białaczki, wytwarzanie metaloproteinaz oraz adhezję do komórek śródbłonka, a zatem wykazuje również potencjał do zapobiegania in vivo zagrażającym życiu powikłaniom leukostazy i naciekaniu tkanek przez komórki białaczkowe. Potencjalna aktywność przeciwko zarówno migracji, jak i inwazji wskazuje na możliwą rolę, jaką XN może spełniać w przypadku jego wykorzystania także jako środka przeciwinwazyjnego in vivo.

2.3. Aktywność przeciwzapalna

Tlenek azotu (NO) odgrywa ważną rolę w wielu odpowiedziach zapalnych i bierze udział również w karcynogenezie. W mysich komórkach makrofagów RAW264.7 XN (w dawce 10 μg/mL) hamuje ponad 90% wytwarzanego NO poprzez hamowanie indukowalnej syntazy NO (iNOS, ang. inducible NO synthase), indukowanej przez połączenie lipopolisacharydu (LPS) i interferonu-Y (IFN-Y) [77].

Inne badania poświęcone aktywności przeciwzapalnej XN wykazały, że w makrofagach zaangażowane są różne szlaki sygnalizacji. Przykładowo po zastosowaniu LPS XN zmniejsza ekspresję elementów receptora LPS, takich jak receptor Toll-podobny 4 (TLR4, ang. Toll-like receptor 4) czy mieloidalne białko różnicowania 2 (MD2, ang. myeloid differentiation protein 2), i powoduje hamowanie aktywacji NFκB [89, 90], podczas gdy w komórkach RAW264.7 stymulowanych IFN-Y XN hamuje aktywność wiążącą STAT-1α i czynnika regulującego powstawanie interferonu 1.

Nadmierne poziomy IL-12 w odpowiedziach immunologicznych takich jak stan zapalny czy odpowiedź autoimmunologiczna stały się przyczyną znacznego zainteresowania środkami blokującymi IL-12. XN hamuje wytwarzanie IL-12 w stymulowanych makrofagach poprzez regulację w dół NFκB. Działanie przeciwzapalne XN in vivo poddano ocenie z wykorzystaniem modelu przewlekłego zapalenia skóry indukowanego oksazolonem w uchu mysim, a wyniki oceny wykazały, że XN łagodzi zapalenie skóry, co wskazuje na potencjalne zastosowanie XN w leczeniu stanu zapalnego skóry.

Cytokina IL-2 odgrywa ważną rolę w nabytych odpowiedziach immunologicznych mediowanych przez komórki T. W komórkach EL-4 T aktywowanych 12-mirystynianem 13-octanu forbolu (PMA, ang. phorbol 12-myristate 13-acetate) i jonomycyną leczenie związkiem XN indukuje znaczny wzrost wytwarzanych ilości IL-2 na poziomie transkrypcji. Wzmożona aktywność promotora genu IL-2 i regulacja w górę kilku czynników transkrypcji modulujących ekspresję IL-2, wśród nich czynnika jądrowego aktywowanych komórek T (NF-AT, ang. nuclear factor of activated T cells) i białka aktywującego AP-1, przyczynia się do zwiększonej produkcji IL-2 [92]. Inne badanie wykazało głębokie działanie immunosupresyjne XN, u podstaw którego leży modulowanie odpowiedzi mediowanej przez komórki T. Ta realizowana przez XN supresja odpowiedzi immunologicznych mediowanych przez komórki T obejmuje proliferację komórek T, rozwój komórek K aktywowanych przez IL-2, cytotoksycznych limfocytów T, a także produkcję cytokin Th1 (IL-2, IFN-Y i TNF-α). Działanie immunosupresyjne prawdopodobnie powodowane jest przez inhibicję NFκB poprzez supresję fosforylacji IκBα.

XN zmniejsza również uwalnianie kilku czynników zapalnych, takich jak białko chemotaktyczne monocytów typu 1 (odgrywające kluczową rolę w odpowiedzi zapalnej) czy czynnik martwicy nowotworu Y (TNF-Y, ang. tumor necrosis factor-Y) w stymulowanych przez LPS mysich makrofagach RAW 264.7 i ludzkich monocytach U937.

Oprócz XN istnieją inne polifenole pochodzenia roślinnego, np. mangostyna czy kemferol, które również posiadają zdolność do regulacji w dół TNF i innych biomarkerów prozapalnych.

Oprócz regulacji czynników zapalnych XN wykazuje również bezpośrednie działanie na komórki układu odpornościowego. Komórki dendrytyczne (DC, ang. *dendritic cells*) odgrywają kluczową rolę w regulacji odporności wrodzonej i adaptacyjnej. XN indukuje apoptozę komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego poprzez stymulację kwasu sfingomielinazy i aktywację kaspazy [97].

XN hamuje stymulowane przez LPS odpowiedzi zapalne w komórkach mikrogleju BV2 przez szlak Nrf2 i reguluje w górę poziom enzymów antyoksydacyjnych, NQO1 i HO-1. XN reguluje sygnalizację Nrf2 i wskazuje na jego potencjalne zastosowanie w profilaktyce chorób neurodegeneracyjnych związanych ze stanem zapalnym.

Wielorakie cele i mechanizmy XN mogą wyjaśniać szerokie spektrum działania przeciwzapalnego tego flawonoidu. Szerokie spektrum aktywności przeciwzapalnej in vitro wskazuje na potencjał związku w leczeniu szeregu chorób związanych ze stanem zapalnym. Ponieważ istnieje ścisły związek między stanem zapalnym a nowotworami, spekuluje się, że aktywność przeciwzapalna omawianego związku może być również jednym z możliwych mechanizmów jego aktywności przeciwnowotworowej. Większość dotychczasowych badań prowadzona jest jednak na poziomie in vitro, a potwierdzenie skuteczności przeciwzapalnej wymaga większej liczby badań in vivo.

2.4. Właściwości modulujące wobec ośrodkowego układu nerwowego

Enzym BACE1, tnący prekursorowe białko B-amyloidu (B-APP, ang. B-Site amyloid precursor protein), pośredniczy w cięciu B-APP, ułatwia uczenie się i zapamiętywanie oraz przyczynia się do plastyczności synaptycznej. Udowodniono, że BACE1 jest potencjalnym celem w chorobie Alzheimera. Aktywność BACE1 jest znacznie inhibitowana przez XN przy wartości IC50 równej 7,19 μM. W związku z powyższym XN może być potencjalnym silnym kandydatem jako środek leczniczy i zapobiegawczy w chorobie Alzheimera. XN ma działanie neuroochronne wobec uszkodzeń niedokrwiennych mózgu u szczurów. XN powoduje zmniejszenie obszaru zawału i poprawę zachowania neurologicznego u szczurów z niedokrwieniem mózgowym. Mechanizm tego zjawiska prawdopodobnie ma związek z działaniem inhibicyjnym omawianego związku wobec odpowiedzi zapalnych (tj. wzrost ekspresji czynnika indukowanego niedotlenieniem 1α (HIF-1α), ekspresji iNOS oraz wytwarzanie wolnych rodników), apoptozy (tj. TNF-α, aktywna kaspaza 3), i aktywacji płytek, co wskazuje na potencjał terapeutyczny związku w leczeniu zaburzeń lub zapobieganiu zaburzeniom związanym z uszkodzeniami niedokrwienno-reperfuzyjnymi. Inne badania wykazały, że pochodne XN mogą indukować wzrost neurytów komórek nerwowych u myszy. XN ma działanie uspokajające spowodowane wiązaniem do receptorów GABAA i zmniejszaniem mobilności bocznej w neuronach, co może tłumaczyć, dlaczego chmiel jest tradycyjnie stosowanym środkiem przydatnym w leczeniu bezsenności i nerwowości. Jednak inne związki zawarte w chmielu również mogą odgrywać tu pewną rolę. Ponadto wyniki badania przeprowadzonego na modelu szczurów rasy Sprague-Dawley w celu oceny działania anksjolitycznego XN wskazują, że modulacja receptora GABAA nie przyczynia się do działania przeciwlękowego XN. XN prawdopodobnie wpływa na inne lokalizacje neuroprzekaźników w ośrodkowym układzie nerwowym.
W mózgu samic myszy w przyspieszonym modelu starzenia się XN spowodował poprawę sygnałów proprzeżyciowych i redukcję sygnałów śmierci w zaburzeniach procesów neuronalnych związanych z wiekiem. Wykazano, że pobieranie XN wraz z dietą spowodowało poprawę elastyczności poznawczej u młodych myszy i obniżenie stężenia palmitynianu w osoczu u myszy młodych i starych. Wyższy poziom palmitoilacji białka zasadniczo kojarzony jest z gorszymi rezultatami uczenia się.

Połączenie tych wyników wskazuje, że XN ma korzystny wpływ na ośrodkowy układ nerwowy. Jednak liczba badań klinicznych potwierdzających zastosowanie XN jako modulatora ośrodkowego układu nerwowego jest stosunkowo niewielka, a zgłębienie działania XN na ośrodkowy układ nerwowy wymaga powtórnej, bardziej kompleksowej analizy.

2.5. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Nowe środki przeciwdrobnoustrojowe odkrywane są na bieżąco od wielu lat. Nowe leki nie nadążają jednak za zmianami wyznaczanymi przez rosnącą lekooporność mikroorganizmów. Jednym z głównych wyzwań jest ograniczona liczba bibliotek do badań przesiewowych. Naturalne produkty pochodzenia roślinnego, takie jak chalkony, mogą przyczynić się do poprawy w zakresie tych bibliotek chemicznych.

XN hamuje działanie cytopatyczne indukowane przez ludzki wirus niedoboru odporności (HIV-1), produkcję wirusowego antygenu p24 i odwrotną transkryptazę w limfocytach C8166. XN w umiarkowanym stopniu hamuje również replikację HIV-1 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej przy wartości EC50 równej 20,74 μg/mL, lecz nie hamuje aktywności rekombinowanej odwrotnej transkryptazy HIV-1 ani wejścia HIV-1 do komórek. Wyniki sugerują, że XN jest skuteczny w walce z HIV-1 i może być wykorzystany jako interesujący związek przewodni do rozwoju leków przeciwko HIV. Oprócz wirusa HIV XN hamuje również wirus wirusowej biegunki bydła (BVDV, ang. Bovine Viral Diarrhea Virus), wirusy opryszczki (HSV-1, HSV-2 i CMV) w stopniu niskim do umiarkowanego [106], a także hamuje replikację wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV, ang. Hepatitis C Virus) w systemach hodowli komórkowych, w sposób porównywalny z IFN-α.

Badania wykazały, że XN cechuje szerokie spektrum aktywności przeciwzakaźnej w stosunku do bakterii takich jak Staphylococcus aureus czy Streptococcus mutans. Ostatnio przeprowadzone badanie wykazało, że XN hamuje rozwój szczepów z gatunku Staphylococcus aureus w zakresie MIC 15,6–62,5 μg/mL oraz wykazuje silną aktywność przeciwadhezyjną i przeciwbiofilmową. XN wykazuje również aktywność przeciwgrzybiczą, czego dowodem jest inhibicja dwóch gatunków grzybów z rodzaju Trichophyton spp..

Mimo iż szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej wykazywanej przez wykazuje XN zostało udokumentowane i zweryfikowane, włącznie z inhibicją względem wirusów, bakterii i grzybów, wciąż badane są szczegółowe mechanizmy przeciwdrobnoustrojowej aktywności inhibicyjnej tego związku. Choć XN wykazuje szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej związek ten nie wpływa na skład bakteryjnej flory jelitowej u szczurów, co sugeruje, że profil flory bakteryjnej pozostaje niezmieniony po podaniu XN in vivo.

2.6. Aktywność przeciwpasożytnicza

Pojawiły się doniesienia o przeciwkokcydiowym działaniu XN, a wyniki odnośnych badań wykazały, że XN może zmniejszać inwazję przez sporozoity (SZ) Eimeria tenella w komórkach bydlęcej nerki Madin-Darby oraz zmniejszać inwazję przez SZ E. tenella i E. acervulina u gospodarza w modelu pisklęcia. Ta inhibicja ma związek z zaburzeniem struktury zakończeń wierzchołkowych SZ. XN powoduje znacznie niższe wyniki oceny zmian makroskopowych i przyrosty masy ciała u zdrowych gospodarzy w modelu pisklęcia w porównaniu do grupy nieleczonej sporozoitami, co wskazuje, że XN może być stosowany jako przeciwkokcydiowy dodatek do paszy. Co więcej, XN i jego chalkonowe pochodne hamują replikację in vitro Plasmodium falciparum, głównego pasożyta wywołującego malarię. Mechanizmy aktywności przeciwdziałającej pasożytom z rodzaju Plasmodium mogą mieć związek z zakłócaniem glutationozależnego procesu rozpadu heminy wywoływanego przez zarodziec sierpowaty Plasmodium falciparum.

2.7. Działanie w przypadku chorób kości

Proces przebudowy kości jest dynamicznym procesem, którego utrzymanie warunkuje równowaga pomiędzy procesem tworzenia i resorpcji kości. XN wykazuje silne działanie inhibicyjne wobec resorpcji kości, a według obecnych przypuszczeń związek ten jest prekursorem związków fitoestrogenowych, jako że dimetyloksantohumol jest proestrogenem i jest metabolizowany w warunkach in vivo do aktywnego związku estrogenowego prenylonaringeniny. XN w sposób dawkozależny stymuluje ekspresję genu markera osteogenezy (Runx2, ALPL i BGLAP), jak również aktywność ALPL w mysich liniach komórek mezenchymalnych i preosteoblastów, wpływając wzajemnie na szlak różnicowania osteogenny i adipogenny. XN nie wykazuje jednak aktywności androgennej lub progestogennej, a właściwości endokrynne chmielu i jego produktów związane są z aktywnością estrogenową 8PN. Wykazano, że ligand RANK receptora aktywującego NFκB (RANKL, ang. Receptor Activator of Nuclear Factor NF-κB Ligand) odgrywa krytyczną rolę w wytwarzaniu osteoklastów i resorpcji kości. Najnowsze badania wykazały, że XN znacząco hamuje aktywność winianoopornej kwaśnej fosfatazy indukowaną przez RANKL, wytwarzanie wielojądrowych osteoklastów oraz tworzenie luki resorpcyjnej, a także moduluje ekspresję genów charakterystycznych dla osteoklastów podczas osteoklastogenezy w komórkach RAW264.7. Powyższe wyniki wskazują, że XN hamuje osteoklastogenezę i może być użyteczny w zapobieganiu chorobom kości.

Wczesną reakcją w chondrocytach w przebiegu choroby zwyrodnieniowej stawów jest nadprodukcja hialuronianu, po której następuje utrata proteoglikanów i degradacja kolagenu. XN hamuje eksport hialuronianu oraz utratę proteoglikanów i kolagenu, a także zapobiega złuszczaniu metaloproteinaz do pożywki hodowlanej. Mechanizm polega na tym, że XN bezpośrednio wiąże się z białkiem eksportującym hialuronian, białkiem związanym z opornością wielolekową 5 (ang. *MRP5, multidrug resistance-associated protein 5*), a także hamuje wymienione białko, nie wpływając jednak na aktywność syntazy hialuronianu. XN jest zatem naturalnym związkiem, który może być wykorzystywany w zapobieganiu nadprodukcji hialuronianu i następującym po niej reakcjom w chorobie zwyrodnieniowej stawów.

2.8. Ochrona wątroby

2.8.1. Ochrona w przypadku chemicznego uszkodzenia wątroby

XN posiada potencjał jako funkcjonalny składnik odżywczy możliwy do wykorzystania w celu profilaktyki lub leczenia niealkoholowego stłuszczeniowego zapalenia wątroby. Hepatocyty i komórki gwiaździste wątroby (HSC, ang. *hepatic stellate cells*) są głównymi mediatorami w patogenezie włóknienia wątroby. XN hamuje aktywację pierwotnych komórek HSC u ludzi i indukuje apoptozę w aktywowanych HSC in vitro, nie pogarszając żywotności pierwotnych hepatocytów ludzkich. XN hamuje aktywację NFκB i ekspresję NFκB-zależnych genów prozapalnych. W warunkach in vivo podawanie XN zmniejsza stan zapalny wątroby i hamuje ekspresję genów profibrogenicznych w mysim modelu niealkoholowego stłuszczeniowego zapalenia wątroby. Ponadto w szczurzym modelu uszkodzenia wątroby indukowanego tetrachlorometanem (CCl4) oraz w modelu hepatocytów indukowanych wodoronadtlenkiem tert-butylu (TBH) XN wykazuje wyraźne działanie ochronne przeciw toksycznemu uszkodzeniu wątroby. Mechanizmy te związane są z inhibicją stanu zapalnego wątroby poprzez zmniejszenie aktywności NFκB, inhibicją peroksydacji lipidów i ochrony przed degradacją enzymów antyoksydacyjnych. XN indukuje enzym detoksykujący, oksydoreduktazę NAD(P)H-chinonową (NQO1), in vitro oraz w wątrobie, modyfikując Keap1, który indukuje przemieszczenie Nrf2 i aktywację elementu odpowiedzi antyoksydacyjnej. Opisane mechanizmy są podobne do tych mających miejsce w przypadku działania chemoprewencyjnego i przeciwzapalnego w leczeniu nowotworów, ponieważ wynikają z alkilowania Keap1, a ponadto biorą w nich udział również aktywowane enzymy antyoksydacyjne. XN działa jako środek chroniący przed uszkodzeniem oksydacyjnym indukowanym w szczurzej wątrobie i w innych tkankach po ostrym zatruciu spowodowanym podaniem etanolu. W prawidłowych hepatocytach aktywność chemoprewencyjna XN może mieć związek z aktywacją Nrf2, enzymami fazy II i indukcją p53. Opisane badania wskazują na potencjalne zastosowanie związku w leczeniu zwłóknienia wątroby w odpowiedzi na uszkodzenie tego organu.

2.8.2. Ochrona w przypadku uszkodzenia wskutek niedokrwienia/reperfuzji wątroby

Niedokrwienie/reperfuzja (N/R) wątroby prowadzi do wytworzenia ROS, powodującego uszkodzenie wątroby i inicjację odpowiedzi zapalnej, która jest krytycznym problemem po zabiegach chirurgicznych i przeszczepienia wątroby. W mysim modelu uszkodzenia wątroby wskutek niedokrwienia ciepłego/reperfuzji stres oksydacyjny wywołany przez N/R został znacznie zahamowany przez XN. Mechanizm ten związany jest z inhibicją AKT, NFκB i genów prozapalnych. Jednak w modelu niedokrwienia zimnego/reperfuzji XN nie chroni szczurzej wątroby przed uszkodzeniem powodowanym przez N/R. Możliwym powodem sprzecznych obserwacji jest zastosowanie różnych modeli, warunków doświadczalnych i stężenia XN w przeprowadzonych eksperymentach.

2.8.3. Korzyści ze stosowania w chorobach wątroby związanych z zakażeniem wirusowym

Zakażenie HCV jest jedną z głównych przyczyn zakaźnych chorób wątroby. Badania in vitro przeprowadzone z wykorzystaniem BVDV na podstawie modelu HCV wykazały, że XN hamuje replikację wirusa BVDV i zwiększa aktywność przeciwwirusową IFN-α. U tupai zakażonych HCV w warunkach in vivo XN zmniejsza stan zapalny, stłuszczenie i zwłóknienie wątroby. Mechanizmy te mają związek z hamowaniem reakcji utleniania, regulacją apoptozy, modulacją aktywności mikrosomalnego białka przenoszącego triglicerydy oraz hamowaniem krwiotwórczych komórek macierzystych.

2.9. Działanie w przypadku chorób skóry

Badanie nad XN i melanogenezą przeprowadzone z wykorzystaniem komórek czerniaka linii B16 wykazało, że XN może działać jako środek hipopigmentacyjny poprzez regulację w dół czynnika transkrypcyjnego związanego z mikroftalmią (MITF, ang. *microphthalmia-associated transcription factor*) w cAMP-zależnym szlaku melanogennym. XN hamuje aktywność kolagenazy (MMP-1 i MMP-8) i łagodzi oksydacyjne uszkodzenia skóry, które pełnią istotną rolę w patogenezie trądziku pospolitego [108]. XN poprawia strukturę i jędrność skóry, głównie poprzez inhibicję aktywności elastazy i MMP oraz stymulację biosyntezy kolagenów włókienkowych, elastyny i fibrylin. W związku z powyższym XN posiada potencjał jako środek przeciwdziałający starzeniu się skóry. Inne przykłady fizjologicznego wpływu XN i innych związków zawartych w piwie na zdrowie skóry poddano ostatnio weryfikacji. Potencjalne zastosowanie tych substancji w dermatologii może obejmować leczenie atopowego zapalenia skóry, kontaktowego zapalenia skóry, zaburzeń pigmentacji, zakażeń skóry, starzenia się skóry i nowotworów skóry, a także ochronę przeciwsłoneczną.

2.10. Choroby tarczycy

Symporter sodowo-jodowy (NIS, ang. sodium iodide symporter), integralna glikoproteina błony komórkowej, pośredniczy w sodozależnym, aktywnym wychwycie jodku przez tarczycę, który jest podstawowym etapem w syntezie hormonów tarczycy. Wyniki ostatnich badań wykazały, że stężenia nanomolarne XN stymulują wychwyt jodku w szczurzych tyreocytach. Wobec tego XN może być interesującym kandydatem jako środek do skuteczniejszej terapii radiojodowej tarczycy. Dodatkowo XN wpływa na pewne transportery leków oraz moduluje transport kilku leków. XN wpływa również na dystrybucję i metabolizm hormonów tarczycy poprzez modulację wątrobowej ekspresji sulfotransferazy, glukuronozylotransferazy difosforanu urydyny i konstytutywnego receptora androstanu.

2.11. Korzyści ze stosowania w chorobie zakrzepowo-zatorowej

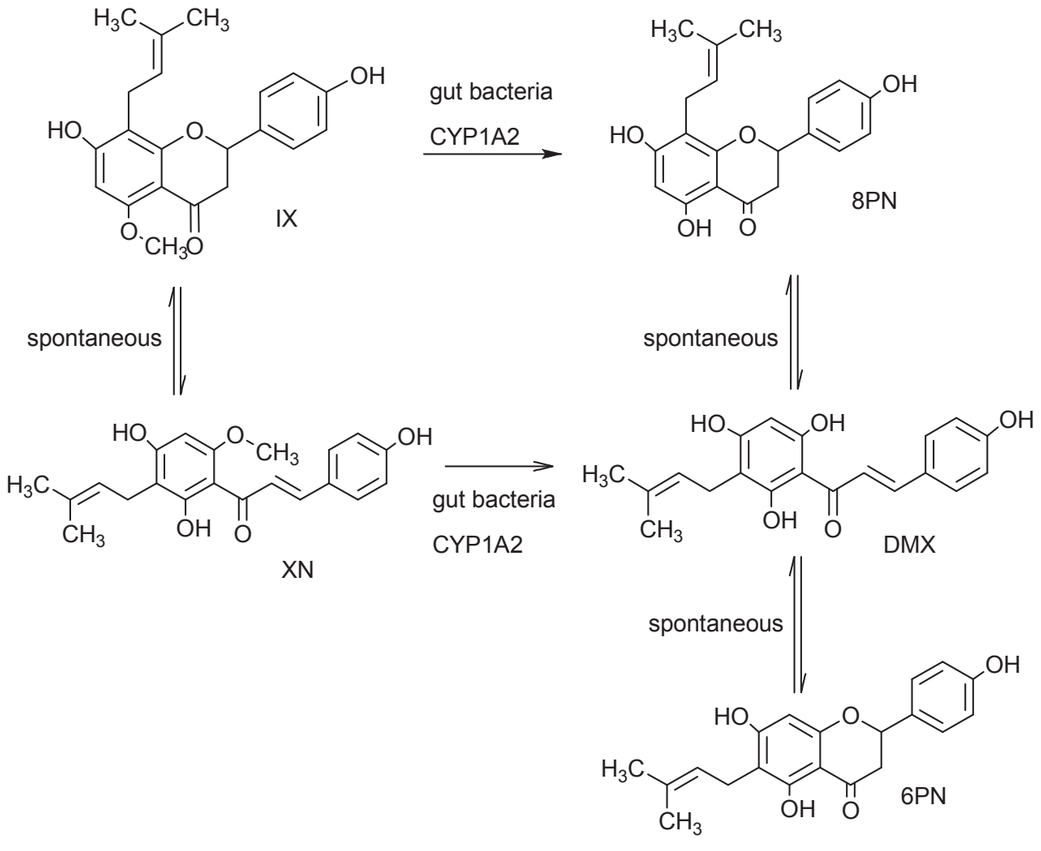
Aktywacja i agregacja płytek krwi przyczynia się do występowania zdarzeń miażdżycowych. Badania wykazały, że XN posiada silne działanie przeciwpłytkowe realizowane poprzez inhibicję kinazy PI3/Akt, p38 MAPK i szlaków PLCY-2-PKC, a także inhibicję wytwarzania tromboksanu A2 i [Ca2+]. XN wykazuje działanie inhibicyjne wobec samobójczej śmierci erytrocytów indukowanej przez stres oksydacyjny i wyczerpanie zasobów energetycznych in vitro. Z uwagi na fakt, że komórki eryptotyczne są usuwane z krwi krążącej i utrudniają mikrokrążenie, wyżej opisane nowe działanie XN może być wykorzystane w profilaktyce lub leczeniu anemii oraz zaburzeń mikrokrążenia i krzepnięcia krwi. XN posiada zatem potencjał do wykorzystania w leczeniu zaburzeń zakrzepowo-zatorowych.

2.12. Farmakokinetyka i biotransformacja XN

W szczurzych i ludzkich mikrosomach wątrobowych XN może ulegać biotransformacji do glukuronidów, metabolitów hydroksylowych i cyklicznych dehydrometabolitów. Badania przeprowadzone na ludzkich mikrosomach wątrobowych wykazały, że hydroksylowanie grupy prenylometylowej jest główną drogą metabolizmu oksydacyjnego, prowadzącą do wytworzenia hydroksylowanych metabolitów XN i IX. IX może ulegać O-demetylacji przez ludzkie cytochromy wątrobowe P450 lub enzymy bakteryjne jelita, w wyniku czego powstaje 8PN (schemat 1). Co istotne, XN może ulec w żołądku przekształceniu w IX, który z kolei może zostać przekształcony w 8PN. Niektóre z wyżej opisanych działań XN mogą być zatem powodowane przez 8PN. XN może również ulegać bezpośredniej konwersji metabolicznej do desmetyloksantohumolu (DMX), który następnie jest przekształcany w 6-prenylonaringeninę (6PN) lub w 8PN. Zarówno 6PN, jak i 8PN są silnymi fitoestrogenami. Badania z udziałem kobiet w okresie menopauzy przeprowadzone w celu oceny bezpieczeństwa i farmakokinetyki ekstraktu z chmielu również potwierdziły demetylację IX powodującą wytworzenie 8PN i cyklizację XN do IX. W przypadku podawania XN szczurom w dawce 1000 mg/kg–1 masy ciała główną drogą wydalania jest kał. W kale wyodrębnia się 22 metabolity, z których większość ogranicza się do zmodyfikowanych struktur chalkonów i pochodnych flawanonów. Wyniki badania wskazują jednak, że większość pozostałości XN pozostaje niezmieniona w przewodzie pokarmowym, jako że około 89% stanowi XN, a jedynie 11% stanowią metabolity. U szczurów wykryto również metabolity XN fazy II, wykazujące występowanie reakcji utleniania, demetylacji, uwadniania i siarkowania. Ze względu na liczne biotransformacje XN należy pamiętać, że niektóre metabolity XN mogą przyczyniać się do aktywności biologicznej XN, takiej jak aktywność estrogenowa 8PN i 6PN, a produkty biotransformacji XN, wraz z innymi prenylowanymi flawonoidami chmielu, mogą stać się inspiracją do tworzenia nowych leków.

Farmakokinetyka XN została zbadana zarówno u szczurów, jak i u ludzi, a wyniki badań dostarczyły parametrów farmakokinetycznych XN. Biodostępność XN jest zależna od dawki i wynosi w przybliżeniu 0,33, 0,13 i 0,11 u szczurów w przypadku podania doustnego pojedynczej dawki równej 1,86, 5,64 i 16,9 mg/kg masy ciała. Wyniki badań nad farmakokinetyką u ludzi wykazały, że po podaniu doustnym XN wykazuje odpowiedź liniową wprost proporcjonalną do zwiększanej dawki doustnej, oraz że XN posiada charakterystyczny, dwufazowy wzorzec absorpcji. Koniugaty XN i IX są głównymi metabolitami krążącymi. Powolna absorpcja po podaniu doustnym u ludzi i krążenie jelitowo-wątrobowe przyczynia się do długiego czasu półtrwania XN. Dane zgromadzone na podstawie modeli szczurzych i ludzkich wskazują na podobny metabolizm XN u zwierząt i ludzi, co pozwala przełożyć wyniki badania na zwierzętach na potrzeby przyszłych badań klinicznych.

Ze względu na niską biodostępność omawianego związku w organizmie człowieka poświęcono wiele wysiłków w celu zbadania rzeczywistych stężeń i farmakokinetyki w komórkach wątroby i jelit. XN może szybko gromadzić się w komórkach jelit, a większość cząsteczek XN ulega wiązaniu do białek komórkowych. Około 70% XN w wierzchołkowej części komórek Caco-2 gromadzi się wewnątrz komórek, podczas gdy 93% wewnątrzkomórkowego XN zlokalizowane jest w cytozolu, a podczas wychwytywania XN nie występuje transport ułatwiony. To specyficzne wiązanie XN do białek cytozolowych w komórkach nabłonkowych jelit może przyczyniać się do niewielkiej biodostępności po podaniu doustnym in vivo. Przeprowadzono również badania w celu zgłębienia interakcji pomiędzy XN a błonami w modelu fosfatydylocholiny przy pomocy dyfrakcji rentgenowskiej, spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera, różnicowej kalorymetrii skaningowej i spektroskopii fluorescencyjnej. Wyniki badania wykazały, że XN zostaje umieszczony w dwuwarstwach lipidowych i wpływa na organizację cząsteczkową oraz właściwości biofizyczne dwuwarstwy, a ta interakcja może przyczyniać się do szybkiego transportu przez błonę komórkową(…)



Schemat 1. Droga metabolizmu XN i produkcji jego metabolitów: IX, 6PN, 8PN i DMX. Odtworzono na podstawie źródła.

3. Wnioski

Rosnące zainteresowanie XN, a zwłaszcza jego aktywnością biologiczną, jest obserwowane wśród badaczy dopiero od niedawna. Działania przeciwzapalne, antyoksydacyjne, hipoglikemiczne, przeciwnowotworowe i inne, oceniane w badaniach zarówno in vitro, jak i in vivo, wyraźnie wskazują na potencjał tego związku z perspektywy profilaktyki i leczenia wielu chorób. Aktywność antyoksydacyjna może wnieść wkład w leczenie kilku chorób związanych z ROS, dzięki bezpośredniemu działaniu jako związek redukujący lub pośredniemu działaniu poprzez indukowanie komórkowych mechanizmów obronnych w celu przeciwdziałania skutkom stresu oksydacyjnego. Zidentyfikowano szereg celów molekularnych, przeciwko którym może być skierowana aktywność biologiczna tych związków, a także zbadano interakcję pomiędzy XN a jego określonym celem, w tym alkilowanie reszt cysteiny Keap1, kinazy IκBα i NFκB przez addycję Michaela oraz bezpośrednie wiązanie do VCP i MRP5. Należy zauważyć, że Keap 1 jest istotnym celem, przeciwko któremu może być skierowana aktywność biologiczna XN, na przykład aktywność chemoprewencyjna w leczeniu nowotworów, aktywność ochronna w stosunku do wątroby czy aktywność przeciwzapalna, ponieważ alkilowanie Keap1 aktywuje enzymy antyoksydacyjne, takie jak reduktaza chinonowa, NQO1, HO-1, poprzez regulację Nrf2. Badania in vivo oraz in vitro, przeprowadzone w celu oceny aktywności biologicznej, dystrybucji, skuteczności i bezpieczeństwa tych związków w modelach zwierzęcych i ludzkich, przyniosły obiecujące wyniki z perspektywy stosowania u ludzi (...) opracowanie formy związku, która stanie się godnym zaufania lekiem spełniającym konkretne zastosowania terapeutyczne w warunkach klinicznych, wymaga jeszcze wiele pracy w odniesieniu do stosowania XN jako leku.

Działanie przeciwzapalne

Ksantohumol hamuje wytwarzanie IL-12 i zmniejsza przewlekłe kontaktowe alergiczne zapalenie skóry

Young-Chang Cho , Sung-Kyun You ,Hyun Jung Kim , Cheong-Weon Cho , Ik-Soo Lee , Bok Yun Kang

1. Wprowadzenie

IL-12 jest cytokiną o cząsteczce heterodimerycznej złożonej z dwóch podjednostek połączonych ze sobą mostkami dwusiarczkowymi, o masach 35 (p35) i 40 (p40) kDa, kodowanych przez dwa odrębne geny. Podczas gdy ekspresja mRNA dla podjednostki p35 jest powszechna w wielu rodzajach komórek, stosunkowo ograniczona ekspresja podjednostek p40 ogranicza potencjalne komórki wytwarzające IL-12 do komórek fagocytujących i prezentujących antygeny. Wiązanie IL-12 do IL-12RB1/IL-12RB2 powoduje fosforylację kinaz tyrozynowych związanych z receptorem, Jak2 i Tyk2, a następnie aktywację cząsteczek będących przetwornikami sygnału i aktywatorami transkrypcji (STAT) w celu promowania różnicowania w komórki limfocyty T pomocnicze (Th) 1 układu odpornościowego. Różnicowanie się komórek CD4+ Th naiwnych w komórki efektorowe Th1 lub Th2 jest procesem o kluczowym znaczeniu dla regulacji odpowiedzi odpornościowych. Zachwianie równowagi pomiędzy Th1 i Th2 jest bezpośrednio skorelowane z występowaniem wielu chorób. Nadmierna stymulacja odpowiedzi Th1 występuje przeważnie w przypadku chorób autoimmunologicznych dotykających konkretne narządy, ostrego odrzucenia przeszczepu allogenicznego, poronienia nawykowego i chorób zapalnych.

Ksantohumol (XN) jest głównym prenylowanym chalkonem występującym w chmielu (Humulus lupulus, konopiowate) wykorzystywanym do nadawania piwu goryczy i smaku podczas warzenia. XN cechuje wyjątkowo szerokie spektrum aktywności inhibicyjnej w fazie inicjacji, promocji i progresji karcynogenezy. Na etapie inicjacji karcynogenezy XN hamuje aktywność cytochromu P450, który bierze udział w aktywacji metabolicznej czynników onkogennych i indukuje aktywność oksydoreduktazy NAD(P)H-chinonowej, która reguluje detoksykację. W ramach mechanizmu represji rozwoju nowotworu XN wywiera działanie przeciwzapalne poprzez hamowanie aktywności cyklooksygenazy (COX)-1 i COX-2 i wytwarzania tlenku azotu. W fazie progresji karcynogenezy XN zapobiega proliferacji komórek nowotworowych poprzez hamowanie syntezy DNA i indukowanie zatrzymania cyklu komórkowego w fazie S, a następnie końcowe różnicowanie się komórek lub apoptozę. XN hamuje także angiogenezę, która jest niezbędna do wzrostu i rozprzestrzeniania się guzów litych. Ponadto XN hamuje HIV, acylotransferazę diacyloglicerolu i resorpcję kości. Według niedawnych doniesień autorów niniejszej pracy XN reguluje wytwarzanie IL-1 i czynnika martwicy nowotworu α (TNF-α). Jednak działanie immunoregulacyjne XN w warunkach in vivo nie jest znane.

Zbadano wpływ XN na wytwarzanie IL-12 w makrofagach stymulowanych przez LPS/IFN Y lub LPS oraz mechanizm regulacyjny leżący u podstaw tego działania. Ponadto porównano działanie regulacyjne XN i związków pokrewnych wobec IL-12. Biorąc pod uwagę kluczową rolę, jaką IL-12 pełni w odpowiedziach odpornościowych z dominującym udziałem Th1, zbadano zastosowanie XN w chorobach zapalnych skóry mediowanych przez komórki Th1.

2. Materiały i metody

2.1. Przygotowanie komórek przylegających śledziony

Samice myszy szczepu C57BL/6 pozyskano(…) i wykorzystano do badania w 6-10. tygodniu życia. Myszy przetrzymywano w warunkach ograniczonej liczby patogenów. Pojedyncze komórki ze śledziony hodowano w ilości 106 komórek/mL przez około 3 godziny w temperaturze 37°C, w nawilżanej atmosferze powietrza z 5% zawartością CO2. Komórki nieprzylegające usunięto poprzez przemywanie ciepłym DMEM do momentu, aż limfocyty przestały być widoczne w kontroli wzrokowej. Komórki przylegające usunięto z płytek inkubując je przez 15 minut w zimnym roztworze chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS), zawierającym kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), i wielokrotnie przemywając. Populację komórek stanowiły głównie makrofagi (>95%), co potwierdzono metodą mikroskopii immunofluorescencyjnej. Komórki utrwalano wstępnie podgrzanym 4% paraformaldehydem przez 10 minut i permeabilizowano 0,01% roztworem Triton X-100 przez 10 minut. Po przemyciu komórki unieruchomiono 1% roztworem bydlęcej albuminy surowiczej i inkubowano sekwencyjnie z przeciwciałem przeciw CD68 lub przeciw F4/80 przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po dodatkowym przemyciu komórki inkubowano z przeciwciałami sprzężonymi z FITC przez 1 godzinę, w ciemności, i zamocowano na stanowisku. Dodano roztwór DAPI w celu przeprowadzenia barwienia jądrowego. Fluorescencję obserwowano pod mikroskopem konfokalnym.

2.2. Test immunoenzymosorbcyjny (ELISA)

Ilość podjednostki IL-12p40 oznaczano w supernatantach hodowli metodą sandwich ELISA, wykorzystując przeciwciała monoklonalne specyficzne dla IL-12p40. Płytki ELISA pokryto szczurzą, przeciwmysią IL-12p40 (C15.6), przemyto i inkubowano w buforze blokującym (0,5% BSA w PBS) przez noc w temperaturze 4°C. Supernatanty hodowli albo mysią rekombinowaną IL-12p40 inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po przemyciu dodano biotynylowaną przeciwmysią IL-12p40 (C17.8). Płytki przemyto i dodano streptawidynę sprzężoną z peroksydazą. Po dodatkowym przemywaniu dodano o-fenylenodiaminę i pozostawiono na 10 minut. OD oznaczono przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika mikropłytek Kinetic Microplate Reader. IL-12p70 oznaczono metodą ELISA z wykorzystaniem zestawu OptEIA, zgodnie z instrukcją producenta.

2.3. Odwrotna transkrypcja z łańcuchową reakcją polimerazy (RT-PCR)

Przygotowano całkowite RNA z komórek i przepisano je na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji. Następnie wykonano amplifikację cDNA przy pomocy PCR. Sekwencje starte-

rów PCR zastosowanych w opisywanym badaniu są następujące: mysia IL-12p40 (sens, 5'CAG AAG CTA ACC ATC TCC TGG TTT G3'; antysens, 5'TCC GGA GTA ATT TGG TGC TTC ACA C3') i mysia B-aktyna (sens, 5'TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C3'; antysens, 5'TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G3'). Korzystając z termocyklera MJ, przeprowadzono 25-30 cykli reakcji PCR w temperaturze 94°C (30 sekund), 58°C (45 sekund) i 72°C (30 sekund). Po zakończonym procesie amplifikacji 10 µl produktów reakcji RT-PCR rozdzielono elektroforetycznie w 1,5% (w/o) żelach agarozowych i wybarwiono bromkiem etydyny.

2.4. Przygotowanie ekstraktów jądrowych i test zmiany ruchliwości elektroforetycznej (EMSA)

Komórki RAW264.7 zdrapano z powierzchni hodowlanej, przeniesiono do mikroprobówek i pozostawiono do spęcznienia po dodaniu 300 µl buforu hipotonicznego zawierającego 10 mM HEPES (pH 7,9), 0,5 mM KCl, 1,5 mM MgCl2, 0,5 mM ditiotreitolu (DTT) i 0,2 mM fluorku fenylometylosulfonylu (PMSF). Lizaty poddano działaniu detergentu Nonidet P-40 (0,5%), inkubowano na lodzie przez 30 minut, a następnie wirowano przy 1550×g przez 15 minut w temperaturze 4°C.

Granulat zawierający jądra surowe początkowo ponownie zawieszono w buforze o niskiej zawartości soli (50 µl) zawierającym 20 mM HEPES (pH 7,9), 25% glicerol, 1,5 mM MgCl2, 20 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT i 0,2 mM PMSF, a następnie w buforze o wysokiej zawartości soli (50 µl) zawierającym 20 mM HEPES (pH 7,9), 25% glicerol, 1,5 mM MgCl2, 800 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT i 0,2 mM PMSF. Granulat inkubowano w temperaturze 4°C przez 30 minut. Próbki wirowano przy 20.670×g przez 30 minut w celu uzyskania supernatantów zawierających frakcje jądrowe.

Jako sondę wykorzystano oligonukleotyd zawierający miejsce wiązania NF-κB w łańcuchu immunoglobuliny Y (5' CCG GTT AAC AGA GGG GGC TTT CCG AG 3'). Specyficzność wiązania potwierdzono w doświadczeniach kompetycyjnych przy pomocy 50-krotnego nadmiaru identycznych nieoznaczonych oligonukleotydów lub oligonukleotydów zawierających element odpowiedzi cAMP. Ekstrakty jądrowe (5 µg) inkubowano z 1 µg poli(dI-dC) i sondą DNA wyznakowaną w [α-32P]dCTP w buforze wiążącym (100 mM NaCl, 30 mM HEPES, 1,5 mM MgCl2, 0,3 mM EDTA, 10% glicerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotyniny i 1 µg/ml leupeptyny) przez 20 minut na lodzie. Kompleks białkowy/DNA oddzielono od wolnej sondy używając 4,8% żelu poliakrylamidowego w buforze 0,5×TBE (44,5 mM Tris, 44,5 mM kwasu borowego i 1 mM EDTA). Po zakończonej elektroforezie żel osuszono i poddano autoradiografii.

2.5. Model kontaktowego alergicznego zapalenia skóry (ACD)

Przewlekłe ACD (ang. allergic contact dermatitis) wywołano wielokrotnie nanoszonym oksazolonem zgodnie z metodą opisaną przez Fujii i wsp.. Samice myszy szczepu BALB/c pozyskano i wykorzystano do badania w 8-10. tygodniu życia. Myszy szczepu BALB/c uwrażliwiono poprzez naniesienie 40 µl 1% oksazolonu na skórę brzucha, a następnie naniesiono łączną ilość oksazolonu równą 20 µl 0,3% na obie strony ucha. Oksazolon nakładano codziennie począwszy od 7 dnia po zakończeniu procesu uwrażliwiania. Grubość ucha mierzono grubościomierzem cyfrowym przez 7 dni po nałożeniu oksazolonu. XN (0,1, 0,5, 1 i 5%) nałożono w łącznej ilości 20 µl na obie strony ucha na 30 minut przed i 3 godziny po naniesieniu oksazolonu.

2.6. Analiza statystyczna

Wszystkie eksperymenty powtórzono co najmniej trzykrotnie. Test t-Studenta wykorzystano do oceny istotności statystycznej różnic. Wartości P <0,05 uznawano za istotne.

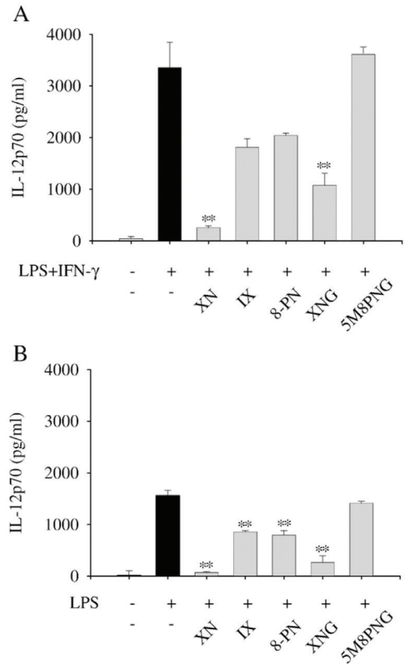
3. Wyniki

3.1. XN hamował wytwarzanie IL-12 w stymulowanych makrofagach.

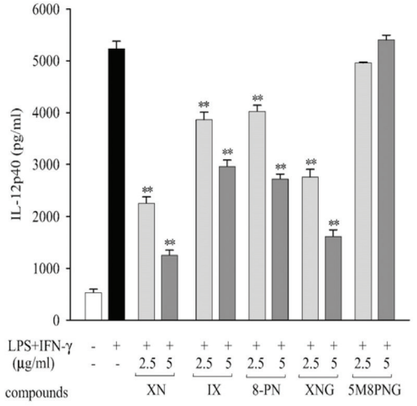
Działanie XN i jego związków pokrewnych na wydzielanie białka IL-12p70 badano w komórkach przylegających śledziony. Komórki przylegające śledziony stymulowano za pomocą LPS (5 µg/ml)/IFN Y (20 ng/ml) i jednocześnie poddawano działaniu XN lub jego związków pokrewnych przez 48 godzin. Ryc. 2A przedstawia wzrost niewykrywalnej ilości IL-12p70 w pożywkach, będący efektem stymulacji za pomocą LPS/IFN Y. Gdy komórki przylegające śledziony poddawano działaniu związków (5 µg/ml), wytwarzanie IL-12p70 indukowane przez LPS/IFN Y było hamowane według porządku XN, XNG, IX, 8-PN i 5M8PNG.

Ponadto zbadano wpływ związków na wytwarzanie IL-12p70 w komórkach przylegających śledziony stymulowanych jedynie za pomocą LPS (ryc. 2B). Ilość IL-12p70 indukowana przez LPS była mniejsza niż ilość indukowana przez LPS/IFN Y i wykazywała podobne wzorce hamowania niezależnie od obecności IFN Y. Związki w stężeniu 5 µg/ml nie były cytotoksyczne, co wykazano w teście zawartości MTT (dane nieukazane). Ponadto wszystkie związki wykorzystane przez badaczy w eksperymentach były niezanieczyszczone endotoksyną, co potwierdzono w chromogenicznym teście LAL (dane nieukazane).

Ponieważ wytwarzanie heterodimerycznej IL-12p70 było zależne od ekspresji IL-12p40, zbadano, czy zmniejszone wytwarzanie IL-12p70 miało związek z wytwarzaniem IL-12p40. Gdy komórki przylegające śledziony stymulowano za pomocą LPS/IFN Y, obserwowano indukcję IL-12p40. Poddanie myszy działaniu badanych związków spowodowało zmniejszenie wytwarzania IL-12p40 według takiego samego porządku skuteczności, jak w przypadku hamowania wytwarzania IL-12p70 powodowanego przez te związki

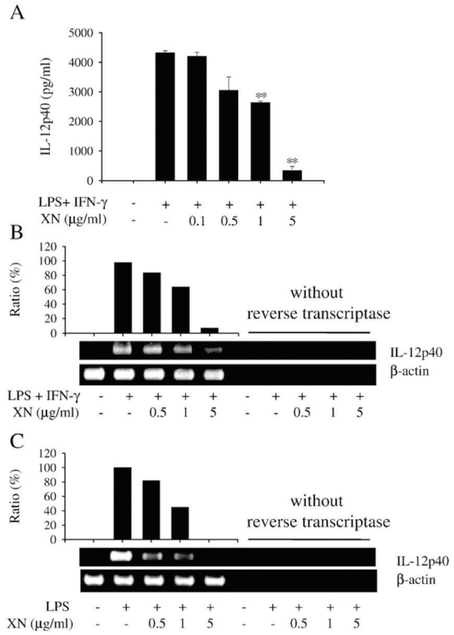


Ryc. 2. Hamowanie wydzielania IL-12p70 przez XN. (A) Komórki przylegające śledziony stymulowano za pomocą LPS (5 µg/ml) i IFN Y (20 ng/ml) przez 48 godzin w warunkach obecności lub nieobecności XN i jego związków pokrewnych (5 µg/ml). Poziomy IL-12p70 w supernatantach hodowli oznaczono metodą ELISA. Dane oznaczają średnią ± SD. (n=3). **P<0,01, w stosunku do stymulacji LPS/IFN Y. (B) Komórki przylegające śledziony stymulowano za pomocą LPS (5 µg/ml) przez 48 godzin w warunkach obecności lub nieobecności XN i jego związków pokrewnych (5 µg/ml). Poziomy IL-12p70 w supernatantach hodowli oznaczono metodą ELISA. Dane oznaczają średnią ±SD. (n=3). **P<0,01, w stosunku do stymulacji LPS.



Ryc. 3. Hamowanie wydzielania IL-12p40 przez XN. Komórki przylegające śledziony stymulowano za pomocą LPS (5 μg/ml) i IFN Y (20 ng/ml) przez 48 godzin w warunkach obecności lub nieobecności XN i jego związków pokrewnych w stężeniu 2,5 μg/ml lub 5 μg/ml. Poziomy IL-12p40 w supernatantach hodowli oznaczono metodą ELISA. Dane oznaczają średnią ±SD. (n=3). **P<0,01, w stosunku do stymulacji LPS/IFN Y.

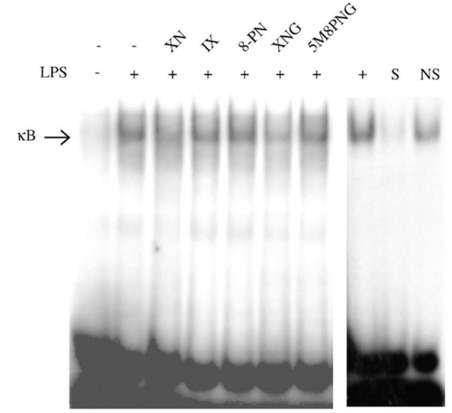
(ryc. 3). Ponadto szczegółowo zbadano wpływ najskuteczniejszego związku hamującego IL-12. XN hamował wydzielanie IL-12p40 w sposób dawkozależny w komórkach RAW264.7 stymulowanych za pomocą LPS/IFN Y (ryc. 4A). W celu stwierdzenia, czy zahamowanie produkcji IL-12p40 było wynikiem zmniejszonego wytwarzania mRNA, przeanalizowano wpływ XN na ekspresję mRNA dla IL-12p40. Ryc. 4B i C przedstawiają istotne hamowanie przez XN poziomów mRNA dla IL-12p40 w komórkach RAW264.7 stymulowanych za pomocą LPS/IFN Y lub LPS, które to hamowanie następowało w sposób dawkozależny. Wyniki te wskazywały, że hamowane przez XN wytwarzanie IL-12 miało miejsce na poziomie mRNA.



Ryc. 4. Hamowanie ekspresji IL-12p40 przez XN. (A) Komórki RAW264.7 stymulowano za pomocą LPS (0,5 μg/ml) i IFN Y (20 ng/ml) w warunkach obecności lub nieobecności XN (0,1, 0,5, 1 i 5 μg/ml) przez 48 godzin. Poziomy IL-12p40 w supernatantach hodowli oznaczono metodą ELISA. Dane oznaczają średnią ±SD. (n=3). **P<0,01, w stosunku do stymulacji LPS/IFN Y. (B) Komórki RAW264.7 stymulowano za pomocą LPS (0,05 μg/ml) i IFN Y (2 ng/ml) w warunkach obecności lub nieobecności XN (0,5, 1 i 5 μg/ml) przez 6 godzin i przygotowano całkowite RNA z komórek. Produkty RT-PCR badano przy pomocy żeli agarozowych 1,5%. (C) Komórki RAW264.7 stymulowano za pomocą LPS (0,05 μg/ml) w warunkach obecności lub nieobecności XN (0,5, 1 i 5 μg/ml) przez 6 godzin i przygotowano całkowite RNA z komórek. Produkty RT-PCR badano przy pomocy żeli agarozowych 1,5%.

3.2. XN hamował wiązanie NF-κB do miejsca κB.

W celu uzyskania szerszych informacji na temat możliwych mechanizmów leżących u podstaw regulacji IL-12p40 przeanalizowano aktywność wiążącą κB w ekstraktach jądrowych komórek RAW264.7 niestymulowanych lub stymulowanych za pomocą LPS/IFN Y, w warunkach obecności lub nieobecności badanych związków. Przeprowadzono eksperymenty metodą EMSA, w których wykorzystano oznaczony oligonukleotyd zawierający konsensusowe miejsce κB w immunoglobulinie. Uzyskane wyniki pozwoliły badaczom stwierdzić, zgodnie z przewidywaniami, że ekstrakty jądrowe z komórek RAW264.7 stymulowanych LPS/IFN Y wykazywały silną aktywność wiążącą κB. Wiązanie było specyficzne, ponieważ było nieobecne w ekstraktach jądrowych z komórek niestymulowanych i możliwe było jego zablokowanie przez identyczny nieoznaczony oligonukleotyd zawierający κB. XN najskuteczniej zmniejszało aktywność wiążącą κB w ekstraktach jądrowych z komórek RAW264.7 stymulowanych za pomocą LPS/IFN Y, tak jak w przypadku hamowania IL-12 (ryc. 5).



Ryc. 5. Wpływ XN na wiązanie NF-κB do miejsc κB. Ekstrakty jądrowe przygotowane z komórek RAW264.7 stymulowanych za pomocą LPS/IFN Y w warunkach obecności lub nieobecności XN i jego związków pokrewnych (5 μg/ml) zbadano pod kątem aktywności wiążącej κB metodą EMSA. Do tych badań wykorzystano oznaczony oligonukleotyd zawierający konsensusowe miejsce κB w immunoglobulinie. Specyficzność wiązania NF-κB do miejsc κB potwierdzono w ekstraktach jądrowych w warunkach obecności, odpowiednio, identycznego nieoznaczonego oligonukleotydu (S) i oligonukleotydu niespecyficznego (NS).

3.3. XN łagodzi ACD indukowane oksazolonem.

Następnie zbadano potencjalne działanie przeciwzapalne XN w przypadku zapalenia skóry w modelu przewlekłego zapalenia skóry indukowanego w mysim uchu przy pomocy oksazolonu.

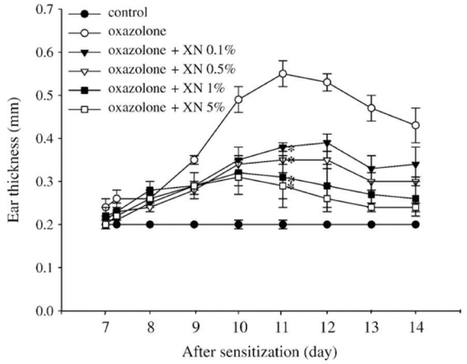
Długotrwałe nanoszenie oksazolonu spowodowało zwiększenie grubości ucha traktowanej jako wskaźnik zapalenia skóry, przy czym najwyższą wartość tego wskaźnika osiągnięto w 11. dniu po uwrażliwieniu. Ryc. 6 przedstawia dawkozależne zmniejszenie grubości ucha (od 0,5 do 2-krotnego) powodowane przez XN po wywołaniu reakcji oksazolonem (ryc. 6). Wszystkie dane dotyczące grubości ucha były zgodne z obserwacjami fotograficznymi (dane nieukazane).

4. Omówienie

Alergiczne zapalenie skóry jest przewlekłą chorobą zapalną skóry. Przewlekłe ACD może wystąpił na skutek uwrażliwienia przez te same alergeny po ekspozycji na środki chemiczne i niektóre leki, kosmetyki i metale, w tym nikiel i chrom. Przewlekłe ACD jest doświadczalnym modelem łuszczycy, jednej z najpowszechniejszych chorób zapalnych mediowanych przez komórki T u ludzi. Patogeneza łuszczycy wynika z nacieku komórkowego indukowanego głównie przez komórki Th1 i dużych ilości IFN Y w skórze zmienionej przez

łuszczycę. W związku z powyższym czynniki koordynujące odpowiedzi odpornościowe Th1 są potencjalnymi kandydatami mogącymi łagodzić zapalne choroby skóry mediowane przez komórki. Kierowanie przeciwciał anty-IL-12 do walki z IL-12 lub hamowanie szlaku sygnalizacyjnego IL-12 jest obiecującą strategią leczenia łuszczycy, analizowaną obecnie w badaniach klinicznych.

W obecnym badaniu analizowano wpływ XN na wytwarzanie IL-12 i potencjalne zastosowanie XN w leczeniu zapalenia skóry z dominacją Th1. Wykazano, że miejscowe zastosowanie XN w oleju z oliwek z acetonem miało działanie przeciwzapalne wobec przewlekłej postaci ACD (ryc. 6).



Ryc. 6. Działanie przeciwzapalne XN w mysim modelu ACD. Myszy szczepu BALB/c uwrażliwiono poprzez jednorazowe naniesienie 1% oksazolonu na skórę brzucha, a następnie poprzez nanoszenie 0,3% oksazolonu na obie strony ucha co 4 dni po 7-dniowym okresie uwrażliwiania. Kontrolą ujemną stanowiły myszy, u których oksazolonu nie nanoszono po początkowym uwrażliwieniu. XN nanoszono na skórę ucha 30 minut przed każdym naniesieniem oksazolonu. Grubość ucha mierzono do 14. dnia badania i mierzono grubościomierzem 3 godziny po każdym naniesieniu oksazolonu. Wartości stanowią średnią ± SD dla ośmiu myszy. **P<0,05, w stosunku do naniesienia oksazolonu w 11. dniu badania.

Następnie badacze sporządzili postać recepturową XN – maść, wykorzystując do tego celu seskwioleinian sorbitanu, polisorbat 80, ciekłą parafinę i wazelinę. XN w postaci recepturowej – maść powodował podobne hamowanie wzrostu grubości ucha w wyniku reakcji na oksazolon (dane nieukazane). Obecnie opracowywane są sposoby poprawy właściwości XN w zakresie przenikania i wchłaniania w celu uzyskania zwiększonego działania przeciwzapalnego.

Nadmierne poziomy IL-12 w odpowiedziach immunologicznych takich jak stan zapalny czy odpowiedź autoimmunologiczna stały się przyczyną znacznego zainteresowania środkami blokującymi IL-12 i ich mechanizmów inhibicyjnych. Wydaje się, że mechanizm, za pośrednictwem którego XN hamuje wytwarzanie IL-12 w stymulowanych makrofagach, opiera się na regulacji w dół aktywacji mediowanej przez NF-κB. Podjednostka IL-12p40 jest wysoce indukowalnym i ściśle regulowanym komponentem IL-12p70. XN spowodował istotne zmniejszenie wiązania do miejsca κB w stymulowanych komórkach RAW264.7, co wykazano w teście EMSA (ryc. 5). Wyjaśnienie mechanizmu/mechanizmów, za pośrednictwem których XN hamuje NF-κB w jądrach stymulowanych makrofagów, wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

Jednym z mechanizmów regulujących aktywację NF-κB jest jego wiązanie do białek IκB w cytoplazmie. W przypadku większości komórek IκBα jest główną cząsteczką hamującą aktywności transkrypcyjnej NF-κB. Uwalnianie NF-κB z IκBα prowadzi do przemieszczenia aktywnego NF-κB do jądra. XN może hamować aktywność IκBα poprzez zmniejszanie degradacji lub fosforylacji IκBα. Innym możliwym mechanizmem może być modulacja bezpośrednia interakcji pomiędzy NF-κB a DNA poprzez tworzenie kompleksu pomiędzy XN a NF κB niezdolnego do wiązania miejsc κB.
XN jest głównym składnikiem chmielu, który zawiera również IX i 8-PN. Autorzy przeprowadzili badanie porównawcze działania XN, IX i 8-PN na wytwarzanie IL-12. Jak przedstawiono na ryc. 2 i 3, XN hamował wytwarzanie IL-12 skuteczniej niż IX i 8-PN. Ponadto zbadano wpływ mikrobiologicznych metabolitów bakteryjnych XN na wytwarzanie IL-12. Badania metabolizmu lub biotransformacji są przydatne w przewidywaniu przeznaczenia metabolicznego XN oraz w uzyskiwaniu selektywnych konwersji związków do pochodnych, które trudno jest wyprodukować w drodze syntezy. Według doniesień z wcześniejszych badań grzyby z rodzaju *Penicillium chrysogenum* i *Cunninghamella elegans var. elegans* wytwarzają glukozylowane metabolity XN z grupami chalkonowymi (XNG) lub flawanonowymi (5M8PNG). XNG hamował wytwarzanie IL-12 ze skutecznością najwyższą po XN, podczas gdy 5M8PNG nie wpływał na wytwarzanie IL-12.

Podsumowując, wykazano, że XN osłabia wytwarzanie IL-12 w makrofagach stymulowanych poprzez modulowanie sygnalizacji NF-κB. Hamowanie wytwarzania IL-12 mediowane przez XN w makrofagach może wyjaśniać niektóre aspekty działania biologicznego XN, w tym działania przeciwzapalnego tego związku. Ponadto XN zmniejsza wytwarzanie mediatorów zapalnych, np. TNF-α i IL-1B. Szerokie spektrum działania przeciwzapalnego XN może mieć korzystny wpływ na choroby zapalne skóry przy podawaniu miejscowym.

Ksantohumol i Kompleks ksantohumolu

Najsilniejsze działanie antyoksydacyjne

MECHANIZM OCHRONY ANTYOKSYDACYJNEJ

Ksantohumol, prenylowany flawonoid chmielu (*Humulus lupulus L.*), chroni szczurze tkanki przed uszkodzeniem oksydacyjnym po ostrym podaniu etanolu

Carmen Pinto, Juan J. Cestero, Beatriz Rodríguez-Galdón, Pedro Macías

1. Wprowadzenie

Przedłużone spożywanie lub jednorazowe spożycie dużej ilości alkoholu w krótkim czasie powoduje alkoholową chorobę wątroby (ALD, ang. *alcoholic liver disease*), w której rozwoju znaczącą rolę pełni stres oksydacyjny i istotny wzrost wytwarzania reaktywnych postaci tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*). Za metabolizm etanolu odpowiadają szlaki oksydacyjne i nieoksydacyjne, a dehydrogenaza alkoholowa w wątrobie bierze udział w szlaku oksydacyjnym. Enzym ten przekształca etanol w aldehyd octowy, który z kolei jest utleniany do octanu przez enzym dehydrogenazę aldehydową. Oksydaza ksantynowa, główne źródło anionu ponadtlenkowego, jest aktywowana w tym procesie. Etanol może być również utleniany do aldehydu octowego przez indukowany etanolem system cytochromu P450 (CYP2E1) w wątrobie, powodując wytwarzanie ROS. Co więcej, utlenianie aldehydu octowego przez oksydazę ksantynową i oksydazę aldehydową powoduje wytwarzanie rodników acetylowych, które reagują z białkami, kwasami nukleinowymi i lipidami. Ze względu na łatwe przenikanie przez błony biologiczne produkty peroksydacji lipidów są odpowiedzialne za większość patologii związanych ze stresem oksydacyjnym. Mimo iż miejscem niekorzystnego oddziaływania etanolu jest wątroba, niekorzystne działanie tego związku dotyka również innych tkanek, choć w mniejszym i zmiennym stopniu.

System enzymów antyoksydacyjnych, w tym dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, ang. *superoxide dismutase*), katalazy (CAT, ang. *catalase*) i S-transferazy glutationowej (GST, ang. *glutathione S-transferase*), w połączeniu z nieenzymatycznym systemem antyoksydacyjnym tworzonym przez zredukowany glutation, witaminę E i szeroką gamę środków antyoksydacyjnych, takich jak flawonoidy i fenole, chroni komórki przed stresem oksydacyjnym. Wiadome jest, że poddanie organizmu działaniu alkoholu powoduje wyczerpanie enzymów antyoksydacyjnych i zmniejsza stężenie zredukowanego glutationu. Temu działaniu towarzyszy wzrost stężenia malondialdehydu i nadtlenku wodoru.

Przedmiotem ostatnio przeprowadzonych analiz stała się szeroka gama związków czynnych pochodzenia roślinnego, które ze względu na właściwości antyoksydacyjne zbadano jako potencjalne środki przeciwko chorobom powstającym w wyniku działania alkoholu. Według doniesień badaczy korzystne działanie w przypadku zatrucia etanolem ma wynikać z regulacji szlaków uczestniczących w utlenianiu, zapaleniu i metabolizmie lipidów, choć mechanizmy działania tych związków pozostają niewyjaśnione. Wśród tych związków zaobserwowano ksantohumol (XN), prenylowany flawonoid pochodzący z chmielu. Roślina chmielu (*Humulus lupulus L.*) jest rośliną rozdzielnopłciową z rodziny konopiowatych uprawianą ze względu na jej kwiatostany żeńskie. Chmiel jest wykorzystywany w przemyśle piwowarskim do nadawania piwu smaku, zapachu, goryczy i stabilności. Badania in vitro wykazały, że XN charakteryzuje szereg właściwości biologicznych, na przykład aktywność antyoksydacyjna, przeciwzapalna i przeciwnowotworowa, co wskazuje na potencjalne działanie chemoprewencyjne tego związku. Badania metabolizacji wykazały, że cząsteczka XN pozostaje niezmieniona, a wydajność antyoksydacyjna mierzona w warunkach in vitro jest o 8,9 razy wyższa niż wydajność antyoksydacyjna troloksu. Związek ten nie został jednak jeszcze dostatecznie zbadany w warunkach in vivo.

W swoich poprzednich badaniach autorzy niniejszego artykułu donosili, że XN zapobiega ostremu uszkodzeniu wątroby u szczurów po podaniu tetrachlorometanu. Ten modelowy test zawartości in vivo często wykorzystywany jest do oceny skuteczności antyoksydacyjnej związków naturalnych, ze względu na dobrze znany fakt, że w procesie toksycznym pośredniczy wolny rodnik trichlorometylowy (•CCl3) oraz rodnik peroksytrichlorometylowy (Cl3COO•). Choć model ten dostarcza wartościowych informacji na temat skuteczności antyoksydacyjnej in vivo związków naturalnych, hepatotoksyczność indukowana przez CCl4 nie jest ogólnym modelem uszkodzenia wątroby, a zatem bardziej skuteczna ocena właściwości antyoksydacyjnych wymaga zastosowania modeli alternatywnych. ALD wykorzystano zatem jako model hepatotoksyczności i niewydolności wielonarządowej, mogący dostarczyć cennych informacji o znaczeniu uzupełniającym w stosunku do tych uzyskanych z modelu uszkodzenia indukowanego przez CCl4.

W opisywanym w niniejszej pracy badaniu wykorzystano model ostrej toksyczności etanolu w celu określenia skuteczności ochronnej XN względem antyoksydacyjnych systemów obronnych w wątrobie, nerce, płucu, sercu i mózgu w przypadku stanu patologicznego zbliżonego do stanu u ludzi po zatruciu alkoholem etylowym.

2. Materiały i metody

2.1. Substancje chemiczne

Ksantohumol (96%) i wszystkie pozostałe związki chemiczne niezbędne do testów biochemicznych (…) były o czystości analitycznej.

2.2. Zwierzęta i projekt doświadczenia

Szczury, samce rasy Wistar (200-250 g, w wieku 4 miesięcy), bytowały w standardowych warunkach środowiska: w temperaturze 22°C, z 12-godzinnym rytmem świetlnym, w kontrolowanych warunkach wilgotności i obiegu powietrza i z nieograniczonym dostępem do pożywienia i wody. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono pomiędzy godziną 9:00 a 17:00, a próbki pobrano we wszystkich przypadkach o godzinie 10:00. Podczas przeprowadzania wszystkich doświadczeń na zwierzętach przestrzegano odpowiednich wytycznych miejscowej komisji etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach.

Szczury podzielono losowo na 8 grup po 6 zwierząt w każdej grupie. We wszystkich przypadkach nośnik lub XN podawano szczurom doustnie przez zgłębnik żołądkowy. Grupa I stanowiła prawidłową kontrolę i otrzymywała sam nośnik (1,2-propanodiol, w dawce 2 ml/kg masy dziennie przez 7 dni). Z grupą II postępowano tak samo jak z grupą I, z tym wyjątkiem że zwierzętom w grupie II w 7 dniu badania podawano EtOH w dawce 4,0 g/kg masy ciała (w rozcieńczeniu 30%) poprzez wstrzyknięcie dootrzewnowe. Grupom III, IV i V podawano ksantohumol rozpuszczony w 1,2-propanodiolu w dawce, odpowiednio, 0,1, 0,2 i 0,4 mg/kg masy ciała, codziennie przez 7 dni, oraz w dawce pojedynczej wy-

noszącej 4,0 g/kg masy ciała. EtOH (w roztworze 30%) podawano dootrzewnowo w 7 dniu badania. Zakres dawek stosowanych w niniejszej pracy ustalono w ramach poprzedniego badania, w którym wpływ XN analizowano z wykorzystaniem szerszego zakresu stężeń (dane nieukazane). Grupy IIIc, IVc i Vc stanowiły kontrole w stosunku do grup III, IV i V. W tych grupach kontrolnych szczury poddano wstępnie działaniu tych samych stężeń XN, lecz nie wykonywano wstrzyknięć EtOH. W celu sprawdzenia, czy wstrzyknięcie powoduje zmiany w wynikach pomiarów na skutek stresu wywołanego u zwierzęcia, w grupach kontrolnych IIIc, IVc i Vc również wykonano wstrzyknięcia, podając zwierzętom roztwór soli fizjologicznej, lecz nie stwierdzono istotnych różnic w porównaniu ze szczurami, u których wstrzyknięć nie wykonano. Po 12 godzinach każdy szczur został znieczulony chloroformem podanym wziewnie w celu pobrania krwi i usunięcia tkanek. Próbki krwi pobrano przez nakłucie serca i pozostawiono na 45 minut w temperaturze pokojowej do skrzepnięcia. Osocze oddzielono przez wirowanie przy 600×g przez 15 minut i zbadano pod kątem aminotransferazy asparaginianowej (GOT, ang. *glutamate oxaloacetate transaminase*), transaminazy glutaminianowo-pirogronianowej (GPT, ang. *glutamate pyruvate transaminase*) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH, ang. *lactate dehydrogenase*). Pobrano wycinki z wątroby, nerki, płuca, serca i mózgu, które następnie homogenizowano i poddano testom zawartości pod kątem zredukowanego glutationu (GSH), substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS, ang. *thiobarbituric acid reactive substances*) i stężenia H2O2, jak również pod kątem aktywności enzymów katalazy (CAT), dysmutazy nadtlenkowej (SOD) i S-transferazy glutationowej (GST), zgodnie z procedurami opisanymi poniżej.

2.3. Przygotowanie homogenatu tkankowego

Po usunięciu wątrobę, nerkę, płuco, serce i mózg homogenizowano w roztworze 10 mM KCl, 1 mM EDTA i 100 mM buforze fosforanowym przy pH wynoszącym 7,4. Homogenat wirowano przy 12.000×g przez 60 minut. Supernatant wykorzystano jako źródło do oznaczenia zawartości markerów enzymatycznych stresu oksydacyjnego, w tym aktywności SOD, CAT i GST. Oznaczono również zawartość GSH, TBARS, H2O2 i białka całkowitego.

2.4. Oznaczenie aktywności transaminaz GOT i GPT w surowicy

Aktywność GOT i GPT w surowicy oznaczano stosując procedurę opisaną wcześniej w pracy Bergmeyer i Holder. Mieszanina reakcyjna do pomiaru aktywności GOT zawierała 290 mM L-asparaginianu (600 mM L-alaniny do pomiaru aktywności GPT), 15 mM a-ketoglutaranu, 0,26 mM NADH, 368 U/L dehydrogenazy jabłczanowej (1080 U/L dehydrogenazy mleczanowej do pomiaru aktywności GPT) i 100 mM Tris–HCl przy pH 7,8 w objętości końcowej 1 mL. Aktywność enzymatyczną obliczono na podstawie zmiany absorbancji przy długości fali 340 nm i wyrażono w µmol/min/mg białka.

2.5. Oznaczenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w surowicy

Aktywność LDH zmierzono w surowicy stosując procedurę opisaną przez Kornberga. Całkowitą ilość surowicy równą 100 µL inkubowano w obecności 100 µL 20 mM NADH i 100 µL 10 mM pirogronianu sodu w 100 mM buforu fosforanowo-sodowego o pH 7,4 i doprowadzono do objętości końcowej 3 mL. Zmianę absorbancji przy długości fali 340 nm monitorowano w sposób ciągły, a aktywność enzymu obliczono stosując molarny współczynnik ekstynkcji 6220 M−1 cm−1 i wyrażono w nmol NAD+/min/mg białka.

2.6. Oznaczenie poziomu peroksydacji lipidów

Dialdehyd malonowy (MDA, ang. malondialdehyde) jest końcowym produktem peroksydacji lipidów, który reaguje z kwasem tiobarbiturowym, prowadząc do powstania substancji reagującej z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), powodującej zmianę zabarwienia chromogenu na barwę różową. Poziom tego związku zmierzono stosując procedurę opisaną wcześniej w pracy Ohkawa i wsp.. TBARS przygotowano poprzez zmieszanie równych objętości 15% kwasu trichlorooctowego i 15% roztworu kwasu 2-tiobarbiturowego w 0,25 M HCl. Dwie objętości tego roztworu reaktywnego dodano do objętości próbki, a otrzymaną mieszaninę wirowano energicznie. Otrzymany roztwór ogrzewano przez 20 minut do temperatury 100°C. Następnie roztwór schłodzono i wirowano przy 10.000×g przez 15 minut. Supernatant oddzielono i wykonano pomiar metodą spektrofotometryczną przy długości fali 532 nm. Wartość absorbancji jest wprost proporcjonalna do ilości powstałego MDA i została skalibrowana zgodnie ze znanymi stężeniami MDA w zakresie od 0 do 3,3 µM. Wyniki wyrażono w nmol MDA/mg białka.

2.7. Oznaczenie nadtlenku wodoru

Wytwarzanie nadtlenku wodoru analizowano zgodnie z procedurą Picka i Keisari. Mieszanina reakcyjna zawierała próbkę, a ponadto 180 jednostek peroksydazy chrzanowej, 3,5 µM czerwieni fenolowej, 0,370 mM dekstrozy i 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,6 w objętości końcowej 1,2 mL. Mieszaninę inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C. Następnie mieszaninę zalkalizowano 0,3 M NaOH i wirowano przy 14.000×g przez 3 minuty. Absorbancję supernatantu zmierzono przy długości fali 610 nm w celu określenia zawartości nadtlenku wodoru, którą wyrażono w mmol/mg białka.

2.8. Oznaczenie zredukowanego glutationu (GSH)

Zawartość zredukowanego glutationu zmierzono stosując procedurę opisaną przez Ellmana. Objętość homogenatu wątrobowego zmieszano z objętością 10% kwasu trichlorooctowego i wirowano w celu oddzielenia białek. Całkowitą ilość supernatantu równą 10 µL dodano do 1 mL 100 mM buforu fosforanowego o pH 8,4, 0,025 mL 5 mM kwasu 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowego i 0,165 mL wody destylowanej. Mieszaninę wirowano i inkubowano przez 15 minut, a następnie zmierzono absorbancję przy długości fali 412 nm. Stężenie zredukowanego glutationu wyrażono w nmol GSH/mg białka.

2.9. Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

Aktywność SOD zmierzono metodą opisaną przez autorów Marklund i Marklund. Mieszanina reakcyjna składała się z próbki, 0,2 M pirogalolu, 1 mM EDTA i 50 mM Tris–HCl o pH 8,2 w objętości końcowej 1 mL. Aktywność enzymatyczną zmierzono poprzez monitorowanie absorbancji przy długości fali 420 nm i wyrażono w U/mg. Jednostkę aktywności (U) zdefiniowano jako ilość enzymu, który wywołał 50-procentową inhibicję samoutleniania pirogalolu.

2.10. Oznaczenie aktywności katalazy (CAT)

Aktywność CAT zmierzono metodą opisaną przez Aebi. Mieszanina reakcyjna zawierała próbkę, 10 mM H2O2 i 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,0 w objętości końcowej 1 mL. Szybkość rozkładu H2O2 zmierzono przy długości fali 240 nm, a aktywność katalazy wyrażono w nmol rozłożonego H2O2/min/mg białka, do obliczeń stosując molarny współczynnik ekstynkcji 32,54 M−1 cm−1 dla nadtlenku wodoru.

2.11. Oznaczenie aktywności S-transferazy glutationowej (GST)

Aktywność GST zmierzono zgodnie z Habig i wsp. Mieszanina reakcyjna zawierała próbkę, 0,1 mL 1 mM GSH, 20 µL 50 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) i 0,1 M buforu fosforanowego o pH 6,5 w objętości końcowej 3,0 mL. Aktywność enzymu zmierzono na podstawie zmiany absorbancji przy długości fali 340 nm, stosując molarny współczynnik ekstynkcji 9,6 µM−1 cm−1, i wyrażono w nmol powstałego CDNB sprzężonego z GSH/min/mg białka.

2.12. Oznaczenie zawartości białka

Stężenie białka zmierzono stosując metodę opisaną przez Lowry i wsp., jako normę przyjmując albuminę surowicy bydlęcej.

2.13. Analiza statystyczna

Dane wyrażono jako średnią ± odchylenie standardowe (SD), a wartości p uznano za istotne dla $p < 0,05$. Różnice w grupach doświadczalnych ustalono stosując jednokierunkową lub dwukierunkową analizę wariancji (ANOVA), a następnie test post-hoc F (Fishera), w stosownych przypadkach. Wszystkie testy wykonano korzystając z oprogramowania statystycznego SPSS (wersja 19).

3. Wyniki i omówienie

Celem badania opisanego w niniejszej pracy była ocena skuteczności XN jako środka chroniącego przed uszkodzeniem oksydacyjnym indukowanym w szczurzych tkankach po ostrym zatruciu spowodowanym podaniem etanolu. Projekt doświadczenia wykorzystany przez autorów niniejszej pracy opracowano na podstawie poprzednich badań, w których ostre uszkodzenie oksydacyjne wywołane etanolem stanowiło właściwą procedurę umożliwiającą określenie działania ochronnego związków o znaczeniu terapeutycznym.

Mechanizmy zatrucia w przypadku ostrego i przewlekłego spożycia alkoholu są różne, co jest dobrze znanym faktem. Przykładowo, Yang i wsp. donoszą, że choć CYP2E1 odgrywa dużą rolę w przewlekłym stresie oksydacyjnym indukowanym przez etanol, początkowy proces oksydacyjny po ostrym podaniu alkoholu jest niezależny od CYP2E1. Ponadto według doniesień wpływ etanolu na układ sercowo-naczyniowy zależy od wzorca picia etanolu, który to wzorzec może być ostry lub przewlekły. Podczas gdy przewlekłe spożycie etanolu wywołuje nadciśnienie, skutkiem ostrego podania alkoholu jest niedociśnienie, co sugeruje różne mechanizmy działania.

Warunki doświadczalne wykorzystane w opisanym w niniejszej pracy badaniu były zbieżne z modelem jednorazowego spożycia nadmiernej ilości alkoholu. Model ten, oparty na podaniu etanolu poprzez wstrzyknięcie dootrzewnowe, opracowano w celu uzyskania stężeń etanolu we krwi, konsekwencji behawioralnych i zmian fizjologicznych porównywalnych do tych obserwowanych u ludzi jednorazowo spożywających nadmierną ilość alkoholu. Model wykorzystano do oceny wpływu etanolu na różne tkanki, takie jak tkanki wątroby, mózgu, płuc, nerek i naczyń. Wykazano, że ostre spożycie etanolu wywołuje stres oksydacyjny we wszystkich przypadkach.

Podawanie szczurom etanolu w jednorazowych, nadmiernych ilościach cieszy się dużym zainteresowaniem ze względu na fakt, że takie podejście symuluje nadmierne, jednorazowe spożywanie alkoholu przez ludzi. Niemniej jednak istnieją tylko nieliczne badania, które wykorzystują ten model testowy do oceny skuteczności ochrony antyoksydacyjnej oferowanej przez związki naturalne.

Dawkę etanolu zastosowaną w opisywanym tutaj badaniu wybrano w oparciu o wcześniejsze badania i eksperymenty początkowe autorów (dane nieukazane).

W celu oceny skuteczności ochrony, jaką XN zapewnia w warunkach in vivo, zbadano wpływ wstępnego poddania szczurów działaniu XN na odpowiedź antyoksydacyjnego układu obronnego i poziom stresu oksydacyjnego w różnych szczurzych tkankach po ostrym spożyciu etanolu. Po podaniu dawki EtOH wynoszącej 4,0 g/kg masy ciała szczytowe stężenie we krwi było równe 0,4%, co nie miało wpływu na przeżycie szczurów. Tabela 1 ilustruje wpływ tego ostrego podania etanolu na GOT, GPT i LDH.

Poziom GOT, GPT i LDH w surowicy szczurów poddanych działaniu jednorazowej, nadmiernej ilości etanolu był istotnie podwyższony w porównaniu z kontrolą ($p < 0,05$); oszacowano wzrost GOT o 212%, wzrost GPT o 180% i wzrost LDH o 148%. Dane te wskazują, że poddanie szczurów działaniu jednorazowej, nadmiernej ilości etanolu spowodowało uszkodzenie komórkowe w wątrobie, choć przepuszczalność błony komórkowej w innych tkankach również mogła ulec zmianie wskutek obecności ROS powstałych podczas metabolizowania etanolu. Działanie ochronne XN po podaniu wstępnym było istotne dla zależnej od dawki normalizacji aktywności GOT, GPT i LDH w surowicy w porównaniu z grupą, której podano sam etanol. Warto zauważyć, że sam XN nie wykazywał istotnego działania w porównaniu z kontrolą (grupy IIIc, IVc i Vc, dane nieukazane); jednak poddanie szczurów wstępnemu działaniu XN w dawce 0,4 mg XN/kg masy ciała chroniło aktywność GOT, GPT i LDH o odpowiednio 97,8%, 93,2% i 87,9% w porównaniu do szczurów kontrolnych. Tabela 1 przedstawia wyraźne, zależne od dawki

Tabela 1. **WPŁYW KSANTOHUMOLU NA AKTYWNOŚĆ GOT, GPT I LDH W SUROWICY**.

	GOT µmol/min/mg	GPT µmol/min/mg	LDH µmol/min/mg
Kontrola (grupa I)	5,91 ± 0,23	2,95 ± 0,11	1,37 ± 2,03
EtOH (grupa II)	12,53 ± 0,61*	5,32 ± 0,22*	2,03 ± 0,11*
XN 0,1 + EtOH (grupa III)	9,51 ± 0,35*,#	4,63 ± 0,19*,#	2,02 ± 0,09*
XN 0,2 + EtOH (grupa IV)	6,89 ± 0,21*,#	3,52 ± 0,17*,#	1,75 ± 0,08*,#
XN 0,4 + EtOH (grupa V)	6,05 ± 0,19#	3,11 ± 0,15#	1,45 ± 0,08*,#

Każda wartość stanowi średnią ± SD (n = 6).

* Istotnie różny w porównaniu z kontrolą ($p < 0,05$).

Istotnie różny w porównaniu ze szczurami poddanymi działaniu EtOH ($p < 0,05$).

Tabela 2. **WPŁYW PODANIA ETANOLU I KSANTOHUMOLU NA STĘŻENIE TBARS (NMOL MDA/MG BIAŁKA) W RÓŻNYCH SZCZURZYCH TKANKACH.**

	Kontrola (grupa I)	EtOH (grupa II)	0,1 XN + EtOH (grupa III)	0,2 XN + EtOH (grupa IV)	0,4 XN + EtOH (grupa V)
Wątroba	0,115 ± 0,006a	0,771 ± 0,038*,a	0,513 ± 0,021*,#,a	0,365 ± 0,018*,#,a	0,211 ± 0,011*,#,a
Nerka	0,334 ± 0,015b	0,972 ± 0,04*,b	0,662 ± 0,029*,#,b	0,483 ± 0,022*,#,b	0,398 ± 0,019*,#,b
Płuco	0,243 ± 0,011c	0,377 ± 0,018*,c	0,361 ± 0,016*,#,c	0,322 ± 0,015*,#,a	0,323 ± 0,016*,#,c
Serce	0,251 ± 0,012c	0,285 ± 0,014*,d	0,271 ± 0,013*,#,d	0,265 ± 0,013*,#,c	0,253 ± 0,014#,d
Mózg	0,654 ± 0,031d	0,702 ± 0,031*,a	0,660 ± 0,032*,#,b	0,658 ± 0,008*,#,d	0,655 ± 0,032#,e

Każda wartość stanowi średnią ± SD (n = 6).

Różne litery w tej samej kolumnie oznaczają różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

* Istotnie różny w porównaniu z kontrolą ($p < 0,05$).

Istotnie różny w porównaniu ze szczurami poddanymi działaniu EtOH ($p < 0,05$).

działanie ochronne XN wobec uszkodzeń komórkowych powodowanych przez ROS.

Powyższe dane są spójne z obserwowanym wpływem wstępnego podania etanolu i XN na peroksydację lipidów. Tabela 2 przedstawia 6,7-krotny wzrost poziomu peroksydacji lipidów w tkankach wątroby, w których wywołano stres poprzez podanie etanolu. To działanie nie jest ilościowo zbieżne z pozostałymi tkankami testowanymi pod kątem zawartości. Peroksydacja lipidów w wątrobie wzrosła około trzykrotnie w stosunku do wartości kontroli, podczas gdy wzrost tej samej wartości w płucu, sercu i mózgu wyniósł odpowiednio jedynie 50%, 13% i 7%. Ten istotny wzrost peroksydacji lipidów w wątrobie w porównaniu z innymi tkankami był zgłaszany w przeszłości, a na jego poparcie przywołać można fakt, że niemal 60-80% spożytego alkoholu ulega metabolizacji w wątrobie, co czyni ten organ bardziej wrażliwym niż inne na stres oksydacyjny wywołany przez alkohol. Ponadto obecność wysokiego stężenia kwasów tłuszczowych zdolnych do wchodzenia w reakcje z tlenem i wysokiego stężenia żelaza w wątrobie w istotnym stopniu przyczynia się do wytwarzania ROS. Stres oksydacyjny ma również podobny istotny wpływ na nerki, ponieważ biorą one udział w wydalaniu produktów przemiany materii. Wstępne poddanie zwierząt działaniu XN w dawce niskiej (0,1 mg/kg masy ciała) lub wysokiej (0,4 mg/kg masy ciała) prowadziło do istotnego obniżenia poziomu peroksydacji lipidów. Niska dawka XN prowadziła do obniżenia poziomu peroksydacji lipidów o 33,5% w wątrobie, o 31,9% w nerce, o 4,2% w płucu, o 4,9% w sercu i o 7,4% w mózgu w porównaniu z kontrolami, których nie poddano wstępnemu działaniu XN. Wstępne poddanie szczurów działaniu wysokiej dawki XN prowadziło do obniżenia poziomu peroksydacji, o 72,6% w wątrobie i o 50,05% w nerce, podczas gdy poziom ten spadł o jedynie 14,4% w płucu, o 0,7% w sercu i o 7,2% w mózgu. Wyniki te sugerują, że wstępne poddanie szczurów działaniu XN powoduje znaczne zmniejszenie peroksydacji lipidów w tkankach bardziej narażonych na ROS, ponieważ działanie to nie było istotne w tkankach, w których zmiany oksydacyjne były niewielkie (płuca, serce i mózg). W celu potwierdzenia tego założenia zbadano wpływ jednorazowego podania nadmiernej ilości etanolu na wytwarzanie nadtlenku wodoru.

Zwiększone wytwarzanie ROS wskutek ostrego i przewlekłego narażenia na działanie alkoholu jest dobrze udokumentowane z uwagi na fakt, że nadtlenek wodoru jest jednym z głównych związków odpowiedzialnych za wywoływanie stresu oksydacyjnego w wielu tkankach. Nadtlenek wodoru może być wytworzony jako produkt uboczny utleniania EtOH przez cytochrom P450 i dehydrogenazę alkoholową, gdyż nadtlenek ten bierze specyficzny i bezpośredni udział w cytotoksyczności EtOH.

Wyniki opisywanego w niniejszej pracy badania (tabela 3) wyraźnie wykazują, że jednorazowe podanie nadmiernej ilości etanolu spowodowało wzrost stężenia nadtlenku wodoru o współczynnik równy 2,75 w wątrobie, 1,69 w nerce i 2,17 w płucu; wytwarzanie nadtlenku wodoru w sercu i mózgu było nieznaczne. Wyniki te znajdują odzwierciedlenie w zaobserwowanym wpływie jednorazowego podania nadmiernej ilości EtOH na peroksydację lipidów, sugerując, że stres oksydacyjny jest bardziej istotny jedynie w tych tkankach, w których metabolizowanie EtOH przebiega bardziej intensywnie. Skuteczność wstępnego poddania organizmu działaniu XN przejawia się istotnym spadkiem zależnego od dawki stężenia nadtlenku wodoru w wątrobie, nerkach i płucach, przy jednoczesnych nieznacznych zmianach w mózgu i sercu.

Oprócz zwiększonego stężenia ROS powstających w wyniku działania EtOH kolejnym znanym skutkiem chorób związanych z alkoholem jest zubożenie GSH. Tiol ten odgrywa kluczową rolę w mechanizmach obronnych przeciwko ROS, reagując bezpośrednio z rodnikami tlenu i metabolitami elektrofilowymi, a w rezultacie chroniąc krytyczne grupy tiolowe przed utlenianiem. Te krytyczne grupy tiolowe pełnią funkcję substratu dla enzymów powiązanych z GSH i uczestniczących w antyoksydacyjne procesy obronne. Tabela 4 wskazuje, że ostre podanie EtOH powoduje spadek stężenia GSH w wątrobie (o blisko 68%), nerce (o 44%), płucu (o 31%), sercu (o 33%) i mózgu (o 12%). Wstępne poddanie szczurów działaniu XN chroni, w sposób dawkozależny, przed zubożeniem GSH po ostrym podaniu EtOH. W wątrobach szczurów wstępnie poddanych działaniu dawki wynoszącej 0,4 mg/kg masy ciała poziom stężenia GSH sięga 91,2% poziomu kon-

Tabela 3. **WPŁYW PODANIA ETANOLU I KSANTOHUMOLU NA STĘŻENIE H2O2 (MMOL/MG BIAŁKA) W RÓŻNYCH SZCZURZYCH TKANKACH.**

	Kontrola (grupa I)	EtOH (grupa II)	0,1 XN + EtOH (grupa III)	0,2 XN + EtOH (grupa IV)	0,4 XN + EtOH (grupa V)
Wątroba	0,48 ± 0,02a	1,32 ± 0,06*,a	1,18 ± 0,05*,#,a	0,75 ± 0,03*,#,a	0,61 ± 0,03*,#,a
Nerka	0,98 ± 0,04b	1,66 ± 0,07*,b	1,41 ± 0,07*,#,b	1,09 ± 0,05*,#,b	1,05 ± 1,05*,#,b
Płuco	1,38 ± 0,05c	3,00 ± 0,12*,c	2,21 ± 0,11*,#,c	2,19 ± 0,11*,#,c	2,05 ± 0,11*,#,c
Serce	1,75 ± 0,08d	1,79 ± 0,07*,b	1,78 ± 0,06*,d	1,77 ± 0,07*,#,d	1,75 ± 0,06#,d
Mózg	1,27 ± 0,05c	1,32 ± 0,05*,a	1,28 ± 0,05*,#,a	1,28 ± 0,06*,#,e	1,27 ± 0,06#,e

Każda wartość stanowi średnią ± SD (n = 6).
Różne litery w tej samej kolumnie oznaczają różnice istotne statystycznie (p <0,05).
* Istotnie różny w porównaniu z kontrolą (p < 0,05).
# Istotnie różny w porównaniu ze szczurami poddanymi działaniu EtOH (p < 0,05).

Tabela 4. **WPŁYW PODANIA ETANOLU I KSANTOHUMOLU NA STĘŻENIE GSH (NMOL/MG BIAŁKA) W RÓŻNYCH SZCZURZYCH TKANKACH.**

	Kontrola (grupa I)	EtOH (grupa II)	0,1 XN + EtOH (grupa III)	0,2 XN + EtOH (grupa IV)	0,4 XN + EtOH (grupa V)
Wątroba	18,831 ± 1,38a	6,053 ± 0,220*,a	6,410 ± 0,315*,#,a	10,185 ± 0,478*,#,a	17,184 ± 0,851*,#,a
Nerka	9,445 ± 0,482b	5,271 ± 0,262*,b	5,662 ± 0,251*,#,b	6,541 ± 0,315*,#,b	7,809 ± 0,350*,#,b
Płuco	1,088 ± 0,104c	0,746 ± 0,029*,c	0,748 ± 0,035*,c	0,776 ± 0,033*,#,c	0,976 ± 0,035*,#,c
Serce	1,127 ± 0,078c	0,751 ± 0,030*,c	0,750 ± 0,037*,c	1,011 ± 0,047*,#,d	1,026 ± 0,051#,c
Mózg	3,761 ± 0,225d	3,293 ± 0,161*,d	3,296 ± 0,164*,d	3,504 ± 0,157*,#,e	3,358 ± 0,155*,#,d

Każda wartość stanowi średnią ± SD (n = 6).
Różne litery w tej samej kolumnie oznaczają różnice istotne statystycznie (p <0,05).
* Istotnie różny w porównaniu z kontrolą (p < 0,05).
# Istotnie różny w porównaniu ze szczurami poddanymi działaniu EtOH (p < 0,05).

Tabela 5. **WPŁYW PODANIA ETANOLU I KSANTOHUMOLU NA STĘŻENIE DYSMUTAZY NADTLENKOWEJ W RÓŻNYCH SZCZURZYCH TKANKACH.**

	Kontrola (grupa I)	EtOH (grupa II)	0,1 XN + EtOH (grupa III)	0,2 XN + EtOH (grupa IV)	0,4 XN + EtOH (grupa V)
Wątroba	25,06 ± 1,21a	6,66 ± 0,29*,a	12,52 ± 0,58*,#,a	16,65 ± 0,81*,#,a	20,14 ± 0,98*,#,a
Nerka	11,12 ± 0,51b	4,48 ± 0,21*,b	5,41 ± 0,21*,#,b	5,74 ± 0,21*,#,b	8,33 ± 0,25*,#,b
Płuco	4,52 ± 0,22c	2,39 ± 0,11*,c	2,54 ± 0,12*,#,c	3,32 ± 0,15*,#,c	4,16 ± 0,16*,#,c
Serce	3,70 ± 0,18d	1,61 ± 0,08*,d	1,92 ± 0,11*,#,d	2,56 ± 0,11*,#,d	2,94 ± 0,11*,#,d
Mózg	3,57 ± 0,17d	2,45 ± 0,11*,c	2,77 ± 0,14*,#,c	2,89 ± 0,13*,#,d	3,19 ± 0,12*,#,d

Każda wartość stanowi średnią ± SD (n = 6).
Różne litery w tej samej kolumnie oznaczają różnice istotne statystycznie (p <0,05).
* Istotnie różny w porównaniu z kontrolą (p < 0,05).
# Istotnie różny w porównaniu ze szczurami poddanymi działaniu EtOH (p < 0,05).

Tabela 6. **WPŁYW PODANIA ETANOLU I KSANTOHUMOLU NA AKTYWNOŚĆ KATALAZY (NMOL ROZŁOŻONEGO H2O2/MIN/MG BIAŁKA) W RÓŻNYCH SZCZURZYCH TKANKACH.**

	Kontrola (grupa I)	EtOH (grupa II)	0,1 XN + EtOH (grupa III)	0,2 XN + EtOH (grupa IV)	0,4 XN + EtOH (grupa V)
Wątroba	469,2 ± 19,2a	225,5 ± 10,27*,a	272,3 ± 13,32*,#,a	303,2 ± 13,12*,#,a	379,5 ± 17,23*,#,a
Nerka	215,5 ± 9,32b	128,7 ± 5,43*,b	145,5 ± 6,98*,#,b	180,2 ± 8,98*,#,b	194,5 ± 8,25*,#,b
Płuco	27,8 ± 1,11c	19,4 ± 0,77*,c	20,1 ± 0,85*,#,c	27,5 ± 1,31#,c	28,0 ± 1,22#, c
Serce	25,5 ± 1,21c	13,2 ± 0,66*,d	17,6 ± 0,81*,#,d	21,2 ± 0,88*,#,d	24,3 ± 1,02#, d
Mózg	6,5 ± 0,29d	7,1 ± 0,32*,e	7,0 ± 0,25*,,d	6,8 ± 0,29*,#,e	6,5 ± 0,23#, e

Każda wartość stanowi średnią ± SD (n = 6).
Różne litery w tej samej kolumnie oznaczają różnice istotne statystycznie (p <0,05).
* Istotnie różny w porównaniu z kontrolą (p < 0,05).
# Istotnie różny w porównaniu ze szczurami poddanymi działaniu EtOH (p < 0,05).

trolnego przy nieobecności EtOH. Poziom ochrony sięgnął wartości bliskiej 90% w nerce i płucu, jednak zubożenie GSH było w tych przypadkach bardzo niewielkie, a działanie ochronne XN jest mniej istotne niż w wątrobie. Wyraźny spadek poziomu GSH w wątrobie szczurów poddanych działaniu EtOH oraz istotne różnice w poziomach GSH w różnych tkankach są zbieżne z wynikami wcześniej opublikowanych badań na szczurach, którym etanol podawano przewlekle. Zubożenie GSH w wątrobie jest intensywniejsze niż w innych tkankach, co można wyjaśnić szybkim tempem metabolizowania EtOH w wątrobie, powodującym zubożenie GSH wskutek uszkodzenia wewnętrznej błony mitochondrialnej. Wynik opisywanego badania wskazuje, że XN częściowo zapobiega zubożeniu GSH powodowanemu przez etanol w sposób dawkozależny.

SOD katalizuje rozkład nadtlenku do nadtlenku wodoru i wody, co czyni go jednym z właściwszych regulatorów stężenia ROS. Znanym faktem jest, że przedłużone podawanie etanolu powoduje inaktywację SOD, i choć zjawisko to badano w kontekście kilku różnych narządów, inaktywacja enzymu wątroby jest silniejsza. Donoszono również, że ostre spożycie etanolu powoduje istotny spadek aktywności SOD w mózgu, wątrobie, płucach i nerkach. Dane uzyskane w opisywanym w niniejszej pracy badaniu (tabela 5) wykazują, że jednorazowe spożycie nadmiernej ilości etanolu spowodowało istotny spadek aktywności SOD w wątrobie o 73,5%, w nerkach o 59,7%, w płucach o 47,8%, w sercu o 56,5% i w mózgu o 31,4% w porównaniu z prawidłową kontrolą. Poziom inaktywacji SOD w wątrobie jest wyższy niż w innych narządach. Ta obserwacja jest zbieżna z wynikami uzyskanymi przez innych autorów w badaniach wykorzystujących model przewlekłego spożycia etanolu. Mimo iż aktywność SOD ulega zwiększeniu w warunkach niskiego stężenia ROS, nadprodukcja wolnych rodników podczas zatrucia EtOH skutkuje inaktywacją enzymu. Wstępne poddanie organizmu działaniu XN zapobiegało tej inaktywacji w sposób dawkozależny: podanie dawki 0,4 mg XN/kg masy ciała spowodowało istotne zwiększenie aktywności SOD do wartości 80,36% w wątrobie, 74,6% w nerkach, 92,03% w płucach, 79,45% w sercu i 89,35% w mózgu w porównaniu z kontrolami, którym nie podawano EtOH. To działanie może być mediowane przez bezpośrednią interakcję EtOH lub przez proces pośredni mediowany przez aldehyd octowy z metabolizacji EtOH.

W warunkach fizjologicznych SOD i CAT działają synergistycznie, regulując poziomy ROS. Wyniki uzyskane w opisywanym badaniu i przedstawione w tabeli 6 wykazują, że działanie EtOH hamujące aktywność CAT i działanie ochronne XN wobec tego hamowania są podobne do tych obserwowanych w przypadku SOD. Ponadto poziomy aktywności dla każdej badanej tkanki są zbieżne dla obu enzymów i obserwuje się wyraźnie wysokie poziomy aktywności w wątrobie i nerkach. Aktywność CAT zmierzona u szczurów poddanych wstępnie działaniu XN w dawce 0,4 mg/kg masy ciała sięgnęła 80,8% w wątrobie, 90,2% w nerkach, 99,2% w płucach, 95,3% w sercu i 89,3% w mózgu w porównaniu z kontrolami, dowodząc wysokiej skuteczności, z jaką XN chronił komórki przed ostrym zatruciem EtOH.

Na koniec zmierzono aktywność S-transferazy glutationowej (GST) w tkankach. Enzym bierze udział w eliminacji ROS wraz z SOD i CAT. Według doniesień wyciągi roślinne o właściwościach antyoksydacyjnych regulują w górę poziom GST u szczurów. GST bierze również udział w procesie detoksykacji etanolu; wykazano, że aktywność GST była istotnie niższa w pierwotnych hepatocytach mysich po ekspozycji na etanol. Wyniki uzyskane w opisywanym badaniu (tabela 7) jasno wykazują działanie ochronne XN we wszystkich badanych tkankach, zwłaszcza w przypadku podawania w dawce 0,4 mg/kg masy ciała. Istotne różnice pomiędzy aktywnością GST w tkankach są zbieżne z wynikami wcześniejszych badań i wynikają z różnych ról metabolicznych pełnionych przez tę aktywność.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki pozwoliły autorom wyciągnąć wniosek, iż podawanie XN szczurom chroni przed ostrym uszkodzeniem oksydacyjnym wywoływanym przez alkohol. Dodatkowo fakt, iż w warunkach nieobecności etanolu wszystkie parametry mierzone u szczurów podda-

Tabela 7. **WPŁYW PODANIA ETANOLU I KSANTOHUMOLU NA AKTYWNOŚĆ S-TRANSFERAZY GLUTATIONOWEJ (NMOL POWSTAŁEGO CDNB SPRZĘŻONEGO Z GSH/MIN/MG BIAŁKA) W RÓŻNYCH SZCZURZYCH TKANKACH.**

	Kontrola (grupa I)	EtOH (grupa II)	0,1 XN + EtOH (grupa III)	0,2 XN + EtOH (grupa IV)	0,4 XN + EtOH (grupa V)
Wątroba	0,416 ± 0,019a	0,197 ± 0,009*,a	0,215 ± 0,011*,#,a	0,241 ± 0,011*,#,a	0,282 ± 0,014*,#,a
Nerka	0,068 ± 0,003b	0,028 ± 0,001*,b	0,035 ± 0,001*,#,b	0,055 ± 0,003*,#,b	0,067 ± 0,003#,b
Płuco	0,041 ± 0,002c	0,017 ± 0,001*,c	0,021 ± 0,001*,#,c	0,029 ± 0,001*,#,c	0,031 ± 0,001*,#,c
Serce	0,082 ± 0,004d	0,006 ± 0,0003*,d	0,008 ± 0,0003*,#,d	0,010 ± 0,0003*,#,d	0,015 ± 0,0002*,#,d
Mózg	0,022 ± 0,001e	0,018 ± 0,001*,c	0,019 ± 0,001*,c	0,021 ± 0,001#,e	0,021 ± 0,007#,e

Każda wartość stanowi średnią ± SD (n = 6).
Różne litery w tej samej kolumnie oznaczają różnice istotne statystycznie (p <0,05).
* Istotnie różny w porównaniu z kontrolą (p < 0,05).
# Istotnie różny w porównaniu ze szczurami poddanymi działaniu EtOH (p < 0,05).

nych działaniu samego XN były zbieżne z kontrolą (grupa I), zdecydowanie sugeruje brak toksyczności XN przy oznaczonym stężeniu. Hamowanie peroksydacji lipidów, ochrona przed degradacją tkanki i utrzymanie prawidłowych wartości chemicznych i biochemicznych markerów stresu oksydacyjnego są dowodami potwierdzającymi, że toksyczności EtOH można zapobiec poprzez poddanie organizmu wstępnemu działaniu XN. Badania histopatologiczne opisane w poprzedniej pracy autorów wykazały, że XN chroni przed ciężką martwicą wątroby powodowaną przez czterochlorek węgla, zmianą podobną do opisanej zmiany w wątrobie u szczurów, u których wywołano zatrucie EtOH. Sugeruje to, że XN może wykazywać podobne działanie ochronne przeciwko zmianom histopatologicznym po ostrym podaniu EtOH. Jednak pomimo wszystkich zgromadzonych informacji dokładny mechanizm, za pośrednictwem którego XN wywiera swoje działanie antyoksydacyjne, pozostaje niejasny. W związku z powyższym wdrożenie zastosowania terapeutycznego XN, które pozwoli chronić tkanki przed uszkodzeniem oksydacyjnym wywołanym przez etanol, wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

Kompleks ksantohumolu silniejszy niż wit. C

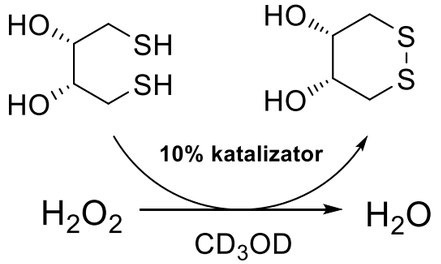
Porównanie właściwości antyoksydacyjnych KOMPLEKSU KSANTOHUMOLU z witaminą C.

1. Cel badania

Wykazanie właściwości antyoksydacyjnych ksantohumolu i **KOMPLEKSU KSANTOHUMOLU** w porównaniu z witaminą C

2. Metodologia

Aktywność przeciwutleniającą badano na podstawie czasu konwersji ditiolu (DTTred) do disulfidu (DTTutl), w obecności analizowanego 10% katalizatora organicznego i 30% roztworu nadtlenku wodoru. Szybkość zaniku substratu oszacowano poprzez rejestrację zmian w widmie 1H NMR.1



Zgodnie z powyższym schematem nadtlenek wodoru utlenia zastosowany katalizator organiczny do jego formy utlenionej ulegając jednocześnie redukcji do cząsteczki wody. Utleniona forma katalizatora utlenia ditiol (DTTred) do disulfidu (DTTutl) powracając do swojej pierwotnej formy. Na zarejestrowanych widmach 1H NMR obserwujemy zanik sygnału charakterystycznego dla ditiolu (DTTred) i przyrost sygnału charakterystycznego dla disulfidu (DTTutl). Pomiary wykonuje się w określonych odstępach czasowych, odpowiednio po 3, 5, 15, 30 i 60 minutach licząc od momentu dodania 30% roztworu nadtlenku wodoru.
Zastosowana metoda badania właściwości antyoksydacyjnych jest metodą pośrednią stosowaną do badania cząsteczek aktywnych farmakologicznie i biologicznie. Metoda ta jest analogiczna do naturalnego cyklu katalitycznego usuwania nadtlenku wodoru przez peroksydazę glutationową (GPx) – enzymu biorącego udział w ochronie komórek przed utlenieniem przez nadtlenki powstające w trakcie procesów biochemicznych.

3. Wnioski

Wyniki wskazują, że ksantohumol wykazuje podobne działanie antyoksydacyjne do witaminy C (XN/Wit.C 2,3/2 %/h) w czasie trwania testu (1 godzina), natomiast **KOMPLEKS KSANTOHUMOLU wykazuje w tej metodzie średnio trzydziestokrotnie lepsze właściwości antyoksydacyjne (65,3 %/h).**

KOMPLEKS KSANTOHUMOLU

Produkty z linii proXN, zawierające Kompleks Ksantohumolu

Efektywność działania

Działanie łagodzące

Potwierdzenie natychmiastowego efektu łagodzącego KOMPLEKSU KSANTOHUMOLU za pomocą stripping testu.

1. Cel badania

Potwierdzenie/wykluczenie deklarowanych przez producenta działania łagodzącego KOMPLEKSU KSANTOHUMOLU.

Metodologia

Badanie polegało na mechanicznym podrażnieniu skóry w celu uzyskania widocznego rumienia. Oceny właściwości łagodzących produktu dokonano na podstawie pomiaru poziomu zaczerwienienia podrażnionej skóry przed nałożeniem produktu oraz bezpośrednio po jego zastosowaniu. Pomiar wykonywany jest za pomocą specjalistycznego urządzenia pomiarowego.

Działanie produktu potwierdzono w przypadku pozytywnych rezultatów uzyskanych u powyżej 50% uczestników badania.

Liczba ochotników: 10
Czas trwania badania: jednorazowe

2. Wnioski

KOMPLEKS KSANTOHUMOLU o stężeniu 0,07 wykazuje natychmiastowy efekt łagodzący (zmniejszenie zaczerwienienia skóry) po 15 minutach od aplikacji (średnio o 20%).

Efektywność Xanthohumol Recovery Treatment

Badanie efektywności setu zabiegowego XANTHOHUMOL RECOVERY TREATMENT, prowadzone pod nadzorem w warunkach kontrolowanych.

1. Cel badania

Potwierdzenie/wykluczenie deklarowanych przez producenta właściwości i działań produktu kosmetycznego:

- łagodzenie podrażnień,
- działanie nawilżające,
- uspokojenie i ukojenie podrażnionej skóry,
- regeneracja,
- wyrównanie koloryt skóry,
- poprawa jędrności skóry,
- uczucie wzmocnienia skóry,
- zapewnienie komfortowej pielęgnacji podrażnionej skóry.

2. Metodologia

Badanie aplikacyjne przeprowadzono w warunkach kontrolowanych, w gabinecie kosmetycznym pod nadzorem kosmetologa oraz w warunkach domowych. Każdemu ochotnikowi zostały nałożone badane produkty. Zakres badań obejmował potwierdzenie lub wykluczenie efektu deklarowanego dla kosmetyku. Produkt był aplikowany przez ochotników i kosmetyczkę zgodnie ze sposobem użycia.

Deklaracje właściwości produktów zostały potwierdzone wyłącznie w przypadku, gdy stosunek uzyskanych pozytywnych odpowiedzi do całkowitej liczby probantów biorących udział w badaniu wyniósł powyżej 50%.
Liczba ochotników: 10
Czas trwania badania: jednorazowe

3. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonego badania, po jednorazowej aplikacji potwierdzone następujące właściwości produktu XANTHOHUMOL RECOVERY TREATMENT:

- Produkty mają działanie łagodzące podrażnienia.
- Produkty mają działanie nawilżające.
- Produkty pomagają uspokoić i ukoić podrażnioną skórę.
- Produkty pomagają regenerować skórę.
- Produkty mają działanie wyrównujące koloryt skóry.
- Produkty poprawiają jędrność skóry.
- Produkt daje uczucie wzmocnienia skóry.
- Produkty zapewniają komfortową pielęgnację podrażnionej skóry.

Efektywność autorskiego zabiegu proXN

Raport z badań dla zabiegu PRO XN
(PHA SOLUTION + XANTHOHUMOL RECOVERY TREATMENT)
przeprowadzony przez centrum dermatologiczne Symbiosis

1. Cel badania

Potwierdzenie deklarowanej skuteczności i bezpieczeństwa zabiegu przeprowadzonego według procedury zabiegowej.

2. Metodologia

Liczna ochotników: 10

Dobór probantów
Dobór probantów-ochotników został przeprowadzony przez specialistę dermatologa. Przed przystąpieniem do aplikacji produktów wykonano fotografię kliniczną aparatem VISIA z określeniem wybranych parametrów skóry twarzy tj. przebarwienia i rozmieszczenie pigmentacji, zaczerwienienie i obecność teleangiektazji, obecność zmarszczek i ich rodzaj, wielkość porów skóry oraz ilość porfiryn. Badanie przeprowadzono na grupie kobiet z wywiadem trądziku różowatego, atopowego zapalenia skóry oraz osłabiona bariera hydrolipidową skóry twarzy.

Czas trwania badania
2 miesiące

3. Wnioski

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań aparaturą VISIA Copmplexion oraz oceny subiektywnej probantów potwierdzono pozytywne działanie pielęgnacyjne wykazujące zdecydowana poprawę stanu cery wrażliwej z trądzikiem różowatym. Stwierdzono działanie łagodzące podrażnienia, zmniejszenie zaczerwienienia oraz nawilżające.

Efektywność autorskiego zabiegu proXN

Raport z badań dla zabiegu PRO XN
(PHA SOLUTION + NOVEL PEEL + XANTHOHUMOL RECOVERY TREATMENT)
przeprowadzony przez centrum dermatologiczne Symbiosis

1. Cel badania

Potwierdzenie deklarowanej skuteczności i bezpieczeństwa zabiegu przeprowadzonego według procedury zabiegowej.

2. Metodologia

Liczna ochotników: 10

Dobór probantów
Dobór probantów-ochotników został przeprowadzony przez specjalistę dermatologa. Przed przystąpieniem do aplikacji produktów wykonano fotografię kliniczną aparatem VISIA z określeniem wybranych parametrów skóry twarzy tj. przebarwienia i rozmieszczenie pigmentacji, zaczerwienienie i obecność teleangiektazji, obecność zmarszczek i ich rodzaj, wielkość porów skóry oraz ilość porfiryn.

Badanie przeprowadzono na grupie kobiet z wywiadem cery wrażliwej, atopowego zapalenia skóry oraz w okresie remisji trądziku różowatego.

Czas trwania badania
2 miesiące

3. Wnioski

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań aparaturą VISIA Copmplexion oraz oceny subiektywnej probantów potwierdzono pozytywne działanie pielęgnacyjne wykazujące zdecydowaną poprawę sprężystości, uelastycznienia, nawilżenia oraz wygładzenia naskórka.
Jednocześnie stwierdzono działanie łagodzące podrażnienia, zmniejszające zaczerwienienie oraz wyrównujące przebarwienia na tle naczyniowym.

Dokumentacja zdjęciowa wyników badań VISIA Complexion. Zdjęcie po zrobione tydzień po ostatnim zabiegu.

ZMARSZCZKI: Zmniejszenie zmarszczek w okolicy czoła i oczu o 65%
NIERÓWNOŚCI SKÓRY: Zmniejszenie nierówności o 99%
PORY: Zmniejszenie porów o 96%
CZERWONY OBSZAR/ZACZERWIENIENIE: Zmniejszenie zaczerwienienia o 82%
BRĄZOWE PLAMKI: Zmniejszenie przebarwień o 75%

SKUTECZNOŚĆ DZIAŁANIA ANTIOXIDANT THERAPY

Badanie efektywności ANTIOXIDANT THERAPY prowadzone pod kontrolą dermatologiczną.

1. Cel badania

Potwierdzenie/wykluczenie deklarowanych przez producenta właściwości i działań produktu kosmetycznego:

- działanie silnie rewitalizujące,
- intensywne nawilżenie (odpowiednie nawilżenie skóry),
- ochrona dla skóry,
- produkt pozostawia na skórze film ochronny,
- wygładzenie,
- redukcja zmarszczek,
- poprawa elastyczności skóry,
- wyrównanie kolorytu skóry,
- produkt jest odpowiedni do pielęgnacji skóry cienkiej, podrażnionej, uszkodzonej,
- zapobieganie powstawaniu przebarwień po zabiegach,
- zmniejszenie rumienia pozabiegowego.

2. Metodologia:

Badanie aplikacyjne wykonano w warunkach domowych pod kontrolą lekarza dermatologa. Zakres badań obejmował:

- ocenę wpływu kosmetyku na tolerancję w miejscu stosowania w wyniku regularnej, powtarzalnej aplikacji badanego produktu, zgodnie z przeznaczeniem i sposobem użycia w określonym czasie (test powtarzalny),
- badania prowadzące do potwierdzenia lub wykluczenia deklarowanego działania kosmetyku.

Produkt był aplikowany przez ochotników zgodnie ze sposobem użycia.

Liczba ochotników: 25
Czas trwania badania: 28 dni (+/- 2 dni)

Deklaracje właściwości produktów zostały potwierdzone wyłącznie w przypadku, gdy stosunek uzyskanych pozytywnych odpowiedzi do całkowitej liczby probantów biorących udział w badaniu wyniósł powyżej 50%.

3. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań, po 28 dniach regularnej aplikacji stwierdza się, że produkt **ANTIOXIDANT THERAPY**, był bardzo dobrze tolerowany oraz wykazywał właściwości:

- Produkt ma działanie silnie rewitalizujące.
- Produkt zapewnia intensywne nawilżenie (odpowiednie nawilżenie skóry).
- Produkt zapewnia ochronę dla skóry.
- Produkt pozostawia na skórze film ochronny.
- Produkt wykazuje właściwości wygładzające.
- Produkt redukuje zmarszczki.
- Produkt poprawia elastyczność skóry.
- Produkt wyrównuje koloryt skóry.
- Produkt jest odpowiedni do pielęgnacji skóry cienkiej, podrażnionej, uszkodzonej.
- Produkt zapobiega powstawaniu przebarwień po zabiegach.
- Produkt zmniejsza rumień pozabiegowy.