

Polifenole z owocu granatu w leczeniu raka stercza

Nowe perspektywy oraz kliniczne i przedkliniczne dane na temat działania polifenoli owocu granatu

dr n. med. Ludwig Manfred Jacob

Klinika Urologii na Uniwersytecie w Mainz

prof. dr med. Karl Friedrich Klippel

Klinika Urologii na Uniwersytecie w Mainz

Artykuł jest tłumaczeniem tekstu, który ukazał się w „Deutsche Zeitschrift für Onkologie” (2008; 40: 1-10). Zawiera po raz pierwszy publikowane wyniki rozprawy naukowej Ludwiga Manfreda Jacoba „Chemoprewencja oraz adjuwantowa terapia żywieniowa w raku stercza w oparciu o polifenole granatu”.

Artykuł ukazał się w „Przeglądzie Urologicznym” 2009/10/5 (57) i jest dostępny na stronach internetowych „Przeglądu Urologicznego”: <http://www.przegląd-urologiczny.pl/artukul.php?1648>

Polifenole owocu granatu wykazały w badaniach in vitro, in vivo oraz klinicznych przekonujące działanie hamujące kancerogenezę (inicjacja, promocja, progresja), wzrost i naciekanie poprzez oddziaływanie antyangiogenetyczne, antyproliferacyjne, proapoptotyczne oraz powodujące ponowne różnicowanie się komórek.

Efekt ten wynika z naturalnego współdziałania polifenoli przeciwzapalnych, antyoksydacyjnych i fitohormonalnych, które modulują system immunologiczny, epigenom oraz drogi przekazywania sygnału komórkowego. Mimo iż wykonano wiele badań przedklinicznych, jak dotąd przeprowadzono tylko jedno kontrolowane badanie kliniczne z udziałem chorych z rakiem stercza, które wykazało przeciętnie czterokrotne wydłużenie czasu podwojenia poziomu PSA. Szczególnie interesujące są nowe wyniki badań przedklinicznych, które wskazują na możliwe synergistyczne efekty ablacji hormonalnej oraz chemio- i radioterapii w przypadku terapii raka stercza opornego na leczenie hormonalne. Należy zwrócić uwagę na różnice w odniesieniu do jakości i zawartości polifenoli w produktach z granatu, przy czym sfermentowane polifenole granatu cechują się wyższą bioaktywnością oraz przypuszczalnie również biodostępnością. Przedstawione są zwłaszcza nowe mechanizmy działania w odniesieniu do hamowania enzymów CYP, możliwego wzrostu stężenia 3 β -diolu oraz aktywacji antyproliferacyjnego receptora estrogenowego β , jak też antagonizowania proliferacyjnego receptora estrogenowego α przez polifenole granatu.

Rak stercza jest jednym z najczęściej występującym nowotworem u mężczyzn i typowym, przeważnie powoli rosnącym rakiem związanym z wiekiem. Nie tylko mężczyźni z rakiem stercza „niskiego ryzyka” (low risk), którzy zdecydowali się na aktywną obserwację (active surveillance), lecz także pacjenci z nawrotami wzrostu poziomu PSA po leczeniu podstawowym często pragną aktywnie poprawić swój stan zdrowia przez zmianę sposobu życia i nawyków żywieniowych. Polifenole granatu mają przy tym wszechstronne mechanizmy działania antykancerogenne:

Zakres działań antykancerogennych

- Zahamowanie wzrostu komórek guza i ich naciekania
- Przyspieszenie apoptozy
- Przyspieszenie ponownego różnicowania się komórek
- Zahamowanie pro kancerogennych dróg przekazywania sygnału
- Regulacja cyklu komórkowego
- Blokada enzymów prokancerogennych
- Zahamowanie neoangiogenezy
- Działanie przeciwzapalne (NF-kappa B, COX-2, TNF)
- Antyoksydacyjna ochrona komórek (m.in. NO, GSH)
- Wiązanie metali prokancerogennych
- Działanie antyestrogenowe na receptory ER
- Potencjalne efekty antyproliferacyjne przez receptory ER
- Regulacja „w dół” genów odpowiadających za syntezę androgenów oraz ekspresji AR
- Prawdopodobne efekty synergistyczne z chemio- i radioterapią

Czterokrotne wydłużenie czasu podwojenia poziomu PSA w badaniu klinicznym

W badaniu drugiej fazy zastosowanie soku z granatu doprowadziło do niemal czterokrotnego wydłużenia czasu podwojenia poziomu PSA. Badanie jest obecnie kontynuowane przy współudziale National Cancer Institute w różnych ośrodkach leczenia raka w Stanach Zjednoczonych jako kontrolowane placebo badanie trzeciej praktykafazy z udziałem 250 pacjentów. Wyniki oczekiwane są w 2010 roku. U wszystkich badanych pacjentów, pomimo uprzedniej prostatektomii lub napromieniania, doszło do ponownego wzrostu poziomu

PSA. Czas podwojenia poziomu PSA jest coraz częściej postrzegany jako ważny surogatowy biomarker śmiertelności w raku stercza po operacji albo napromienieniu. U 94% uczestników badania nie stwierdzono się przerzutów. Mieli oni średnio 5-7 punktów w skali Gleasona.

Podczas gdy przed badaniem średni czas podwojenia poziomu PSA u pacjentów wynosił 15 miesięcy, codzienne spożywanie 240 ml soku z granatu (570 mg polifenoli) w badaniu wydłużyło ten czas do 54 miesięcy.

Do trwającego 33 miesiące badania włączono jeszcze 46 mężczyzn. U 83% badanych spożywanie soku z granatu spowodowało całkowity spadek wartości PSA lub znaczące spowolnienie czasu podwojenia poziomu PSA. Pomiędzy badanymi grupami wystąpiły duże różnice w działaniu: podczas gdy czas podwojenia poziomu PSA przed rozpoczęciem badania wynosił 15,6 miesiąca (? 10,8 miesiąca, mediana 11,5 miesiąca), podczas badania wydłużył się on do 54,7 miesiąca ? 102 miesiące (mediana 28,7 miesiąca, $p < 0,001$). Ogółem 16 pacjentów (35%) osiągnęło spadek wartości PSA o średnio 27%, z czego 4 miało spadek poziomu PSA o ponad 50%. U żadnego z uczestników badania nie doszło do powstania przerzutów w czasie trwania badania wynoszącego 33 miesiące. Całkowite zafałszowanie wartości PSA jest bardzo mało prawdopodobne. Zatem w przypadku zdrowych mężczyzn bez raka stercza sok z granatu i kwas elagowy pozostawały bez wpływu na wartość PSA. Kierownik badania Allan Pantuck uznał przede wszystkim antyoksydacyjne i przeciwzapalne efekty polifenoli z granatu odpowiedzialnymi za korzystne oddziaływanie na uczestników badania.

W porównaniu z wartościami wyjściowymi, na początku badania surowica chorych na raka stercza wywołała *ex vivo* 12-procentową redukcję wzrostu w kulturach komórkowych raka stercza LNCaP (84% badanych). W kulturach komórkowych surowica spowodowała średnie zwiększenie apoptozy o 17,5% (75% badanych).

Znaczne różnice w odpowiedzi ze względu na biodostępność

Całkiem znaczne międzyosobnicze różnice w działaniu (*in vivo* i *ex vivo*) zapewne nie są do wyjaśnienia jedynie zróżnicowaną biologią guza, lecz także indywidualnie bardzo różnorodną biodostępnością polifenoli granatu. Również w badaniach biodostępności zostały stwierdzone znaczne różnice osobnicze, które sprowadzały się do składu flory jelitowej [11]. Biologiczne działanie soku jest w większej mierze przypisane metabolitom aglikanowym flory jelitowej, a nie bezpośredniemu działaniu polifenoli pochodzących z soku. Elagotanniny są ilościowo najważniejszymi polifenolami soku z granatu. Dlatego też szczególne metabolity elagotannin, tak zwane urolityny, mają prawdopodobnie duże znaczenie.

Działanie antyestrogenowe

Urolityny mają wysokie powinowactwo do skutecznego proliferacyjnie receptora estrogenowego α (ER α) i już w bardzo niskich stężeniach mogą być skuteczne w działaniu antyestrogenowym i antyproliferacyjnym [36]. Zresztą również działanie podobne do SERM (Selective Estrogen Response Modifier – selektywny modulator receptora estrogenowego) kwasu elagowego (substancja wyjściowa dla urolityn) jest znane jako działanie antyestrogenowe [50]. Urolityny zaaplikowane myszom doustnie gromadzą się przede wszystkim w gruczole krokowym, a następnie w jelicie grubym i tkance jelitowej. Ich przeszczepy ksenogeniczne raków stercza zostają odrzucone. Kwas elagowy oraz – wyraźnie skuteczniej – urolityny hamują wzrost raka stercza *in vitro* [56].

W soku z granatu obecne są także różne fitoestrogeny, jak na przykład kemferol, kwercetyna, naringenina, luteolina [32]. Ilościowo urolityny są szczególnie ważnymi substancjami o działaniu jednostkowym. Jednakże ostatecznie synergia wszystkich substancji roślinnych (w tym kwasu elagowego, tanin, antocyjanów) mogłaby być odpowiedzialna za szczególne wynikowe działanie granatu.

Biorąc pod uwagę hamowanie proliferacji i naciekania hormonozależnych i opornych na działanie hormonalne komórek raka stercza, sfermentowany sok z granatu względem niesfermentowanego okazał się go przewyższać [5, 34, 35]. W porównaniu ze świeżym sokiem polifenole granatu w sfermentowanym soku hamowały wzrost komórek raka piersi dwukrotnie silniej, powstrzymywały kluczowe enzymy, tj. aromatazę oraz 17 β HSD, a przez to biosyntezę estrogenu w tkance tłuszczowej [30], co miało znaczenie zarówno w przypadku raka piersi, jak również raka stercza. W formie sfermentowanej polifenole granatu mogły efektywnie zmniejszać neoangiogenezę [63], jak też powodować ponowne różnicowanie się komórek białaczkowych oraz indukować apoptozę [26].

Osoby chore na cukrzycę zyskują podwójną korzyść ze sfermentowanych produktów z granatu, gdyż poprzez fermentację przy udziale specjalnie wyselekcjonowanych szczepów mikroorganizmów probiotycznych drastycznej redukcji ulega poziom cukru owocowego.

Przez fermentację przy udziale specjalnie wyselekcjonowanych szczepów mikroorganizmów probiotycznych da się zwiększyć bioprzyswajalność oraz bioaktywność soku z granatu. Wydajność przemiany materii mikroorganizmów fermentacyjnych zastępuje po części niedostateczny ludzki metabolizm, podczas gdy wielkocząsteczkowe polifenole granatu zostają przekształcone w małowcząsteczkowe, lipofilne, lepiej przyswajalne metabolity. Hamujące rozwój raka działanie sfermentowanych polifenoli soku z granatu było w badaniach wyraźniejsze niż w przypadku niesfermentowanych preparatów.

Działanie na hormonoopornego raka stercza

Wzrastająca niezależność raka stercza od androgenów przy blokadzie hormonalnej przedstawia duży problem leczniczy i prowadzi do powstania szczególnie agresywnych raków. Niezależność od androgenów jest często skutkiem zmutowanego, nadwrażliwego lub ulegającego nadmiernej ekspresji receptora androgenowego oraz wzmożonej produkcji enzymów, które w komórkach rakowych syntetyzują androgeny z cholesterolu.

Zgodnie z obecnymi wynikami badań polifenole granatu mogą wywierać wpływ na przebieg raka hormonoopornego:

- Polifenole granatu osłabiają ekspresję receptora androgenowego, często ulegającego nadmiernej ekspresji w tym stadium [38, 22].
- Polifenole granatu zmniejszają produkcję enzymów biorących udział w syntezie androgenów w opornych na działanie hormonów komórkach rakowych [22].
- Polifenole granatu obniżają wewnątrzkomórkowy poziom cholesterolu [18] i tym samym ilość substancji wyjściowej dla zwiększonej biosyntezy androgenów.
- Sfermentowane polifenole granatu hamują wzrost nowotworu w przypadku opornych na działanie hormonów raków stercza PC-3 in vivo oraz mają działanie antyproliferacyjne i przeciwdziałające inwazji komórek raka stercza PC-3 i DU-145 in vitro [5].
- Działanie przeciwzapalne polifenoli granatu (hamowanie NF-kappa B, COX-2, TNF-alfa i metaloproteaz) jest w tym stadium szczególnie ważne.

Hamowanie ekspresji receptora androgenowego oraz syntezy androgenów

W badaniu Uniwersytetu Wisconsin [38] liofilizowany ekstrakt z soku z granatu efektywnie hamował wzrost wysoce agresywnych, opornych na działanie hormonów komórek PC-3 raka stercza i prowadził do apoptozy.

W przypadku androgenozależnych komórek nowotworowych została osłabiona o 90% zarówno ekspresja receptora androgenowego, jak również produkcja PSA. U myszy osiągnięto efekty antykancerogenne już przy ilości zwykle spożywanej przez ludzi: PSA obniżyło się wyraźnie, raki stercza rosły znacznie wolniej niż w grupie kontrolnej, a średni czas przeżycia wydłużył się o 50%.

Hong i współpracownicy opublikowali w maju tego roku następujące nowe wyniki: W komórkach raka stercza z nadekspresją receptora androgenowego (LNCaP-AR) polifenole granatu hamowały ekspresję receptora androgenowego. W tych komórkach nowotworowych oraz w szczególnie agresywnych, opornych na działanie hormonów komórkach raka stercza DU-145 polifenole granatu skutecznie hamowały ekspresję kluczowych enzymów biosyntezy androgenów. Przez to mogły być one skuteczne również w przypadku ciężko leczących się niezależnych od androgenów raków stercza z ulegającym nadmiernej ekspresji receptorem androgenowym i regulowanymi w górę enzymami syntezy androgenów oraz ewentualnie przedstawiać synergistyczną kombinację z blokadą hormonalną.

Jest to szczególnie interesujące, w raku stercza u chemicznie lub chirurgicznie wykastrowanych mężczyzn wszystkie enzymy, które są niezbędne do syntezy testosteronu i dihydrotestosteronu (DHT) z cholesterolu, ulegają wzmożonej ekspresji. Z tego powodu nowotwór może przeżyć pomimo bardzo niskiego poziomu androgenów we krwi [45].

Polifenole soku z granatu wykazywały w badaniu klinicznym działanie obniżające poziom cholesterolu oraz obniżały w makrofagach wewnątrzkomórkowy poziom cholesterolu [14] przez zmniejszone wchłanianie, zwiększoną eliminację oraz zredukowaną biosyntezę [18]. Dochodziło przy tym w komórkach nowotworowych do częściowej utraty ważnego dla syntezy androgenów cholesterolu. Z pewnością skuteczniejsze w obniżaniu poziomu cholesterolu, ale również obciążone większą ilością działań ubocznych są statyny, które prowadzą do zmniejszenia ryzyka powstania miejscowo zaawansowanych przerzutów raka stercza [52].

Działanie na drogi przekazywania sygnału, ekspresję genów oraz regulację genową

Obecnie uważa się, iż regularne spożywanie owoców i warzyw może chronić przed rakiem oraz zachorowaniem na choroby serca i układu krążenia przez modulację dróg transdukcji sygnału oraz epigenomu [43, 44]. Również szczególne działanie polifenoli granatu da się sprowadzić zapewne do kompleksowych efektów synergistycznych. Mówiąc w przenośni – naturalna mieszanina substancji komunikuje się z komórkami i drogami przekazywania sygnału. Wystarczająco do tego stosunkowo niewielkie ilości, podczas gdy do bezpośrednich chemicznych oddziaływań muszą zostać osiągnięte wysokie stężenia substancji czynnych w tkance.

Uważa się, że działanie polifenoli to:

- Hamowanie proliferacyjnych, prokancerogennych dróg transdukcji sygnału poprzez:
 - hamowanie fosforylacji kinaz MAP, c-meł, kinazy Akt, fosfatydyloinozytolo-3-kinaz (PI3K);
 - hamowanie aktywacji kinazy mTOR;
 - hamowanie wytwarzania markerów proliferacji komórkowej (np. Ki-67 oraz PCNA).
- Hamowanie wytwarzania markerów angiogenezy (np. CD31 oraz VEGF).
- Przyspieszenie apoptozy poprzez zwiększanie aktywności kaspaz oraz genów supresorowych guza (np. p53).
- Regulacja cyklu komórkowego poprzez:
 - zależne od dawki blokowanie cyklu komórkowego w fazie G0-G1;
 - indukcję genów WAF1/p21 oraz KIP1/p27, a skutkiem tego hamowanie cyklinozależnych kinaz oraz przyspieszanie regulacji komórkowej i apoptozy;
 - redukcja ekspresji białek cykliny D1, D2 i E, jak też cyklinozależnych kinaz (cdk2, cdk4, cdk6).
- Wstępne hamowanie kaskady stanu zapalnego przez hamowanie aktywacji NF-kappa B.

Grupa badaczy z Wisconsin wykazała w sześciu badaniach, jak liofilizowany ekstrakt z soku hamował raka in vitro i in vivo, podczas gdy wpływał on na regulację genową, ekspresję genów, jak również różnorodne drogi transdukcji sygnału [1, 2, 62, 28, 29, 38]. Ekstrakt z owocu granatu powodował redukcję masy guza odpowiednio o 62% i 66% po 140 i 240 dniach u myszy z gruczolakami i gruczolakorakami płuc w porównaniu z grupą kontrolną.

Wymienione powyżej wyniki pochodzą przeważnie z dwóch badań z roku 2007, w których były wywoływane gruczolaki płuc i gruczolakoraki płuc u myszy: liofilizowany ekstrakt z soku z granatu redukował masę guza o 62% (po 140 dniach) i o 66% (po 240 dniach) w porównaniu z grupą kontrolną. Podobne efekty zostały stwierdzone w ludzkich komórkach raka płuca A549, przy czym nie wywierało to negatywnego wpływu na zdrowe komórki.

Jak opisano wcześniej, polifenole granatu hamują aktywność wielu działających proliferacyjnie kinaz białkowych poprzez hamowanie fosforylacji. Fosforylacja białek jest bardzo ważnym mechanizmem kontrolnym w transdukcji sygnału w komórce. W przypadku opornego na działanie hormonów raka stercza aktywowana jest droga przekazywania sygnału PI3K/Akt i często prowadzi to do fosforylacji receptora androgenowego. Akt jest kinazą serynowo-treoninową, która reguluje przeżycie, proliferację i cykl obumierania komórki. W aktualnym badaniu [41] okazało się, iż jedynie fosforylowany receptor androgenowy u pacjentów z opornym na działanie hormonów rakiem stercza wiązał się ze skróconym czasem przeżycia. Również inne badanie wykazało, że Akt umożliwia przeżycie komórce rakowej w szczególności przy blokadzie hormonalnej w sposób niezależny od receptora androgenowego. Przy terapii deprywacją androgenów komórka nowotworowa pobudza fosforylację Akt i aktywację Akt, aby zabezpieczyć swoje przeżycie na tej niezależnej od androgenów drodze przekazywania sygnału [42]. Polifenole granatu hamują zarówno fosforylację Akt, jak i fosforylację MAPK, a przez to ich aktywację. To mogłoby być także przyczyną regulacji „w dół” receptora androgenowego.

Z uwagi na właściwości polifenoli granatu regulowanie „w dół” ekspresji receptora androgenowego i enzymów syntetyzujących androgeny, przyspieszanie hamowania fosforylacji białek przez kinazy białkowe oraz apoptozy w komórkach nowotworowych, zwłaszcza poprzez hamowanie aktywacji NF-kappa B, oraz kombinacja z ablacją hormonalną mogłyby wywołać interesujące efekty synergistyczne oraz spowolnić wykształcanie się oporności. Skuteczność winna być jeszcze potwierdzona.

Rozprzestrzenienie raka

Okolo 90% wszystkich chorych na choroby nowotworowe umiera z powodu pojawienia się przerzutów. Głównym, pierwszym etapem jest proteoliza macierzy zewnątrzkomórkowej przez metaloproteazy [4]. Sok z granatu hamuje te metaloproteazy. W badaniach [5, 34] sfermentowane i niesfermentowane polifenole granatu, jak również olej z nasion wykazały znaczne hamowanie inwazji komórek guza. To działanie następuje w przypadku wrażliwych hormonalnie (LNCaP) i opornych na działanie hormonów (DU-145, PC-3) komórek raka stercza. Również in vivo sfermentowane polifenole granatu hamowały znacząco wzrost opornych na działanie hormonów komórek raka stercza PC-3.

Neoangiogeneza

Sfermentowane polifenole soku z granatu in vivo efektywnie zapobiegają nowotworzeniu naczyń w guzie, podczas gdy ekstrakt z łupiny okazał się wyraźnie mniej skuteczny [63]. W aktualnym innym badaniu również bogaty w elagotaniny ekstrakt z granatu hamował angiogenezę w rakach stercza in vitro (w przypadku komórek LNCaP) oraz in vivo.

Możliwa synergia pomiędzy chemio- i radioterapią a polifenolami granatu poprzez hamowanie aktywacji NF-kappa B

Działanie przeciwzapalne soku z granatu następuje między innymi przez hamowanie COX-2, ekspresji TNF-alfa, hamowanie metaloproteaz oraz hamowanie aktywacji NF-kappa B [59, 28, 29, 62, 23, 4, 1, 2, 55]. NF-kappa B jest głównym czynnikiem transkrypcyjnym, który reguluje ekspresję niemal 400 różnych prozapalnych i po części prokancerogennych genów. Inhibitory NF-kappa B znajdują się w coraz większym stopniu w centrum zainteresowania dociekliwych naukowców, zwłaszcza w przypadku opornego na działanie hormonów raka stercza. NF-kappa B ma główne znaczenie w każdym stadium kancerogenezy w raku stercza i jest tym ważniejszy, im mniej pozostało opcji terapii [47].

NF-kappa B działa jako główna, początkowa droga transdukcji sygnału kaskady zapalnej, przeciwnie do nekrotycznej i apoptotycznej śmierci komórki, w sposób bezpośredni i pośredni oraz stanowi decydujący czynnik w zapewnieniu nieśmiertelności złośliwym komórkom macierzystym. W badaniach był obserwowany związek pomiędzy aktywacją NF-kappa B a opornością na terapię przy chemio- i radioterapii. W ostrej białaczce szpikowej (AML) zostało udowodnione, iż tylko mała podgrupa komórek AML o immunofenotypie komórek macierzystych jest w stanie wywołać przeniesienie białaczki na myszy NOD/SCID. Powyższe komórki są szczególnie chemio- i radiooporne. Te komórki macierzyste białaczki wykazują jako jedyną różnicę ciągłą aktywację NF-kappa B.

Według badania Lansky'ego i Kawai (2004) sfermentowane polifenole soku z granatu doprowadziły w przypadku komórek białaczkowych HL-60 do ponownego różnicowania lub apoptozy. Czysty świeży sok wykazał tylko niewielkie działanie powodujące ponowne różnicowanie. Ponowne różnicowanie potwierdza powyżej opisane zależności, iż normalne leukocyty dzielą się tylko przez aktywację NF-kappa B komórek białaczkowych.

Radioterapia powoduje indukowaną promieniowaniem aktywację NF-kappa B, która może prowadzić do oporności komórek nowotworowych na apoptozę. W przypadku raków stercza w stadium oporności na leczenie hormonalne paliatywna chemioterapia z użyciem leku Docetaxel odgrywa ważną rolę. Podwyższona aktywność zapalna jest tutaj silnym prognostykiem wyraźnych działań ubocznych, niższego wskaźnika przeżywalności oraz obniżonej odpowiedzi na Docetaxel [12]. Hamowanie stanu zapalnego mogłoby poprawić rezultaty terapii oraz zmniejszyć działania niepożądane [8]. Pozytywne efekty synergistyczne inhibitorów stanu zapalnego i taksanów zostały dowiedzione w badaniach przedklinicznych [48].

Połączenie leku Docetaxel oraz hamujących zapalenie polifenoli granatu w wyższych stężeniach jest godne polecenia jedynie pod kontrolą lekarza. Inaktywacja leku Docetaxel następuje pod wpływem enzymu CYP3A4 z rodziny cytochromów P450, którego ekspresja może ulec obniżeniu przez polifenole granatu. Stąd możliwe jest, że polifenole granatu podwyższą skuteczność leku Docetaxel u wybranych pacjentów.

Wzrost stężenia tlenu azotu (NO) oraz zredukowanego L-glutationu (GSH)

Polifenole granatu mogą, jako wysoce skuteczne antyoksydanty przeciwdziałać kancerogenezie in vivo. Zredukowany L-glutation (GSH) stanowi istotny wewnątrzkomórkowy antyoksydant i jest absolutnie ważny dla życia komórki. Obniżone wewnątrzkomórkowe stężenie GSH towarzyszy licznym schorzeniom zapalnym i nowotworowym. W badaniach klinicznych na ludziach zostało wykazane, iż sok z granatu wyraźnie podnosi wewnątrzkomórkowe stężenie GSH, a więc na przykład w makrofagach (wzrost stężenia GSH o 71% w przypadku chorych na cukrzycę oraz w szczyjnych blaszkach miażdżycowych wzrost stężenia GSH o 250%) [6].

Laureat Nagrody Nobla Luis Ignarro, który wyjaśnił znaczenie tlenu azotu (NO) dla ludzkiego organizmu, wykazał w roku 2006, iż sok z granatu podnosi skuteczność biologiczną i czas działania NO oraz jednocześnie poprzez mechanizmy antyoksydacyjne stabilizuje cząsteczki rodnika [24]. U mężczyzn chorych na raka stercza, którzy spożywali sok z granatu, poziom NO w surowicy wzrósł przeciętnie o 23% [49].

Regularne picie jednej szklanki soku z granatu przez ponad rok powoduje wzrost statusu antyoksydacyjnego (TAS) we krwi o 130% [6]. Efekty te sprowadzają się zapewne bardziej do epigenetycznej skuteczności soku z granatu niż do bezpośredniego działania antyoksydacyjnego.

Wiązanie potencjalnie prokancerogennych metali

Metale, takie jak żelazo, miedź, chrom, wanad, kadm, arsen i nikiel, mogą w odpowiednich stężeniach przyspieszyć kancerogenezę, gdy wytwarzają wolne rodniki i prowadzą do mutacji [64]. Wartości stężenia miedzi w surowicy wydają się być podwyższone w wielu rodzajach raka i korelują z ryzykiem zachorowania [65], jak również z wielkością guza i rokowaniem. Wartości stężenia miedzi w przypadku chorych na raka jelita i raka stercza są wyraźnie wyższe w porównaniu z osobami zdrowymi. Miedź działa cytotoksycznie, powoduje stres oksydacyjny i przewlekłe reakcje zapalne, m.in. poprzez NF-kappa B oraz TNF-alfa [27, 51] i stymuluje tworzenie naczyń guza nowotworowego [37]. Chelatory terapeutycznie zapobiegają hamowaniu wchłaniania miedzi i redukują wyraźnie wzrost raka stercza oraz neoangiogenezę [9].

Katechina i kwasy fenolowe, które są również zawarte w granacie, tworzą z miedzią kompleks miedziowo-poli-fenolowy. Ten zdaje się prowadzić jako prooksydant do apoptozy komórek i w ten sposób przejawiać działanie antykancerogenne [7, 39]. Ponieważ miedź wykazuje podwyższone stężenia przede wszystkim w tkance guza, mogłoby to być podstawą dla selektywnego cytotoksycznego działania kompleksu miedziowo-polifenolowego na komórki raka [20]. Zwłaszcza komórki raka stercza cechują się wysokimi stężeniami miedzi i dają się wybiórczo zniszczyć na przykład przez kompleks miedzi i antyoksydantu ditiokarbaminianu pirolidyny (PDTC) [13].

Punikalagina, pod względem ilościowym najważniejszy polifenol granatu, chelatuje między innymi miedź i żelazo bez przyłączania do DNS [33]. Również monomer punikalaginy, kwas elagowy, wykazuje podobne działanie jako chelator miedzi [58] i niklu [3].

Podczas gdy pod względem terapeutycznym możliwe jest, iż wysokie stężenie miedzi w nowotworach może być pożyteczne, w ramach prewencji korzystne jest, aby na niskim poziomie utrzymywać przyswajanie miedzi jako potencjalnego prokancerogenu z pożywienia (np. sieć wodociągowa z miedzi, wypełnienia amalgamato-we z wysokim udziałem miedzi, suplementy żywnościowe).

Hamowanie enzymów cytochromu P450 jako mechanizm chemoprewencyjny

Podwyższona aktywność i ekspresja enzymów cytochromu P450 (CYP) podwyższają wskaźnik zatrucia prokancerogenami, przez co podnoszą ryzyko zachorowania i pogarszają rokowanie. Substancje roślinne, które wykazują działanie hamujące na enzymy fazy I CYP-450, względnie aktywujące działanie na odtruwające enzymy fazy II, mają znaczenie w chemoprewencji [10, 25]. W doświadczeniu na zwierzętach z udziałem myszy po czterotygodniowym podawaniu soku z granatu zawartość CYP-450 w wątrobie zwierząt doświadczalnych zmniejszyła się o 43%. Ponadto zostało zaobserwowane hamowanie ekspresji CYP1A2 oraz CYP3A4 na poziomie mRNA [15].

Hamowanie cytochromu i potencjalne interakcje z lekami

Hamowanie cytochromu może stać się również problematyczne w przypadku stosowania określonych leków i genetycznych predyspozycji. Ponieważ liczne enzymy cytochromowe (przede wszystkim CYP3A4) są ściśle włączone w biotransformację leków, ich hamowanie mogłoby oznaczać wzmocnienie działania lub wydłużenie czasu działania leków.

W jakim stopniu polifenole granatu wywołują klinicznie istotne interakcje z zażywaniem lekami, nie zostało jeszcze dostatecznie zbadane. Jednakże ich znaczenie wydaje się być niewielkie w porównaniu z innymi pre-

paratami owocowymi, jak na przykład sok z grejpfruta. W badaniu z udziałem ludzkich mikrosomów wątroby na podstawie aktywności 1-hydroksylazy midazolamu w ludzkich mikrosomach wątrobowych zostało ocenione działanie hamujące soku z granatu na kluczowy enzym CYP3A4. Sok z granatu wykazał w porównaniu z innymi sokami owocowymi jedynie bardzo niewielkie działanie hamujące. Hamowanie zostało przedstawione w kolejności zgodnej ze zmniejszającym się nasileniem, a mianowicie: grejpfrut > czarna morwa > dzikie winogrona > granat [31]. W już wspomnianym doświadczeniu na zwierzętach wpływ na czas snu indukowanego pentobarbitem nie był znaczący [15]. W badaniu na komórkach stwierdzono hamowanie CYP3A, a u szczurów zmianę farmakokinetyki karbamazepiny [21].

Natomiast w badaniu z udziałem ludzi, w przeciwieństwie do soku z grejpfruta, nie zostało wykazane hamowanie CYP3A: farmakokinetyka midazolamu pozostała niezmienniona [16]. W literaturze donosi się o pojedynczym przypadku możliwej interakcji z lekami obniżającymi poziom cholesterolu. Pacjent, który przyjmował ezetymib i rosuwastatynę, cierpiał na miopatię, możliwe że już przy konsumpcji 200 ml soku z granatu (CK - 659 U/L). Statyna i zapewne również ezetymib mogą powodować miopatię i rabdomiolizę.

Na podstawie tego opisu pojedynczego przypadku nie jest oczywiste, czy obydwa te leki obniżające poziom cholesterolu same w sobie, ich interakcja międzylekowa czy dodatkowa interakcja z sokiem z granatu były odpowiedzialne za rabdomiolizę u pacjenta [60].

W Stanach Zjednoczonych sok z granatu już od ponad pięciu lat jest najpopularniejszym napojem zdrowotnym. Jest obficie spożywany również przez osoby ze schorzeniami układu sercowo-naczyniowego oraz farmakologicznie leczoną hipercholesterolemią. Dlatego też ogólnie interakcja soku z granatu z lekami, jeśli w ogóle istnieje, wydaje się być niewielka. Niemniej jednak nie da się zupełnie wykluczyć interakcji soku z zażywaniem lekami, na przykład z lekami antyarytmicznymi, statynami, blokerami kanałów wapniowych, lekami immunosupresyjnymi, taksanami albo inhibitorami proteaz w odniesieniu do wzmocnienia działania leków w przypadku szczególnej predyspozycji genetycznej, kombinacji lekowych oraz przebiegu choroby.

Możliwy wzrost poziomu antyproliferacyjnego agonisty receptora estrogenowego β -diolu poprzez hamowanie CYP-7B1

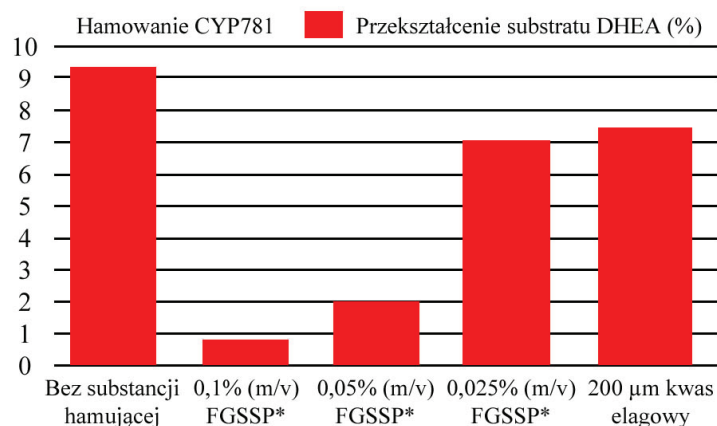
Regulacja nabłonka gruczołu krokowego opiera się na delikatnej równowadze proliferacji i ponownego różnicowania, w których pośredniczą przede wszystkim androgeny i estrogeny poprzez receptor androgenowy (AR) oraz receptory estrogenowe α i β . AR jest odpowiedzialny głównie za proliferację komórek podstawnych oraz wydzielniczą aktywność nabłonka stercza, zaś jego najważniejszym agonistą jest dihydrotestosteron (DHT). Obydwa podtypy receptora estrogenowego ER α oraz ER β pełnią w gruczole krokowym różne zadania: ER α działa w zrębie proliferacyjnie na nabłonek stercza poprzez uwolnienie czynników wzrostu; jest on też w komórkach podstawnych najważniejszym receptorem estrogenowym o funkcji proliferacyjnej. ER β jest odpowiedzialny za hamowanie proliferacji i przyspieszanie ponownego różnicowania się komórek wydzielniczych nabłonka stercza, ER β obniża ekspresję AR i ER α .

3β -diol jest produktem metabolizmu DHT, a w sterczu stanowi zapewne najważniejszy endogeny ligand dla ER β . Według słynnego odkrywcy ER β Jana-Ake Gustaffsona 3β -diol równoważy w sterczu za pośrednictwem ER β i dzięki swojemu działaniu antyproliferacyjnemu, wywołującemu ponowne różnicowanie, efekt proliferacyjny estrogenów (na ER α) oraz DHT (na AR). Stężenia 3β -diolu w sterczu są regulowane przez ekspresję obydwu enzymów HSD17B3 (synteza) oraz CYP7B1 (degradacja).

Aby wyjaśnić dotąd nieznanne oddziaływanie polifenoli granatu na aktywność CYP7B1, autor zlecił badanie Marii Norlin (Uniwersytet w Uppsali, Wydział Nauk Biofarmaceutycznych). Inhibicja CYP7B1 była monitorowana na podstawie 7α -hydroksylacji DHEA (dehydroepiandrosteron). DHEA oraz 3β -diol są substratami dla

CYP7B1 i są inaktywowane na drodze tego samego mechanizmu. Spadek hydroksylacji DHEA powoduje zatem również potencjalne hamowanie inaktywacji 3 β -diolu przez substancję testową. Jako porównanie zostały przeprowadzone dodatkowe inkubacje z kwasem elagowym. Wykazano niezależne od stężenia hamowanie 7 α -hydroksylacji DHEA) przez liofilizowany, sfermentowany sok z granatu w proszku (ryc. 1). Ku zaskoczeniu kwas elagowy w wysokich stężeniach wykazywał także godne wzmiarki hamowanie CYP7B1, podczas gdy sfermentowany sok z granatu w proszku był skuteczny aż do stężenia 0,025% (masa/objętość).

Ryc. 1 Hamowanie hydroksylacji DHEA przez sfermentowany sok z granatu w proszku



Kolejność badania 2

Przekształcenie substratu DHEA (%)

Bez substancji hamującej	9,3
0,1% (m/v) FGSSP*	0,7
0,05% (m/v) FGSSP*	1,8
0,025% (m/v) FGSSP*	6,9
200 μm kwas elagowy	7,5

W badaniach klinicznych prowadzonych przez Allana Pantucka w odniesieniu do testosteronu, estradiolu i DHEA nie zostały stwierdzone żadne zmiany pomiędzy stanem sprzed i po leczeniu. Jednakże nie wyklucza to możliwości, iż w sterczu dochodzi do nasycenia substancjami czynnymi granatu, które miejscowo prowadzą do odpowiedniego hamowania CYP7B1 oraz wzrostu stężenia 3 β -diolu, podczas gdy nie wywołują one wyraźnych zmian poziomu 3 β -diolu i DHEA w surowicy.

Gdyby również *in vivo* dochodziło do udowodnionego tutaj *in vitro* hamowania CYP7B1, doprowadziłoby to do wzrostu stężenia 3 β -diolu poprzez zmniejszoną jego degradację i przez to wywarłoby ochronne, antyproliferycyjne działanie na nabłonek stercza - dotąd nieznanym, ale ważnym nowym sposobem działania polifenoli granatu.

Konsekwencje dla praktyki lekarskiej

Obecnie nie jest możliwa ostateczna ocena badań polifenoli granatu, nawet jeśli wyniki rokują duże nadzieje. Uzasadnione jest jednak zalecanie polifenoli soku z granatu w prewencji i adjuwantowej terapii żywieniowej w raku stercza. Szczególnie mężczyźni, którzy nie życzą sobie jakiegokolwiek postępowania leczniczego, lecz chętniej oczekują postępowania obserwacyjnego, przez stosowanie zdrowych środków spożywczych i zdrowego trybu życia mogą wziąć odpowiedzialność za przebieg schorzenia. W zależności od indywidualnej biologii guza i biodostępności można oczekiwać spowolnienia progresji nowotworu i korzystnego działania na serce i naczynia, co w przypadku nowotworów związanych z wiekiem może oznaczać dodatkową korzyść decydującą o latach przeżycia.

Korzystne działania dodatkowe soku z granatu na serce i naczynia:

- Znacząca poprawa ukrwienia miokardium u pacjentów z chorobą wieńcową serca (podwójnie ślepe, kontrolowane placebo, randomizowane badanie drugiej fazy) [61].
- Redukcja odkładania się blaszek miażdżycowych w naczyniach i redukcja nadciśnienia tętniczego (kontrolowane placebo, randomizowane badanie drugiej fazy z udziałem pacjentów ze stenozą tętnic szyjnych).
- Przeciwmiażdżycowe i obniżające poziom cholesterolu działanie u chorych na cukrzycę (bez wpływu na poziom HbA1c i poziom glukozy we krwi) w badaniach klinicznych [53, 14].

Polifenole granatu ani nie powodują pewnego wyleczenia, ani nie zastępują niezbędnego postępowania terapeutycznego. Mogą jednak skutecznie uzupełniać standardowe terapie i prawdopodobnie poprawić ich profil działania oraz profil skutków ubocznych.

Produkty z granatu wykazują duże różnice w jakości i zawartości skutecznych polifenoli. To odnosi się nie tylko do soków (897 do 4265 mg/l polifenoli, mediana 2288 mg/l oznaczone metodą Folina-Ciocalteu) [17], lecz także ekstraktów z granatu, gdzie polifenole, z powodu suszenia w wysokiej temperaturze, często znajdują się w wysokopolimeryzowanej, utlenionej formie o wątpliwej biodostępności. Preferowane powinny być delikatne procedury suszenia, takie jak liofilizacja.

Spożywana ilość

W celu zachowania zdrowia mogłoby wystarczyć pół do jednej szklanki soku z granatu dziennie (ok. 280-560 mg/l polifenoli jako ekwiwalent kwasu galusowanego). Przy istniejącym raku stercza, jak podano w badaniach, powinna być wypijana przynajmniej jedna szklanka dziennie (560 mg/l polifenoli), przy czym sfermentowane polifenole wykazują wyższą bioaktywność. Nie jest jasne, czy większe ilości również silniej oddziałują. W prewencji jest to do zanegowania, w przypadku raka poprzez silniejsze efekty całkowicie dopuszczalne. Bardzo wysokie, nietypowe dla zwykłego odżywiania się dawki polifenoli powinny być przyjmowane pod kontrolą lekarza z uwagi na konieczność oceny wskaźników wątrobowych i nerkowych.

Biodostępność polifenoli jest najwyższa, jeśli są one spożywane pomiędzy głównymi posiłkami [40]. W mleku zawarte są związki białkowe, które wiążą taniny. To może potencjalnie negatywnie oddziaływać na biodostępność polifenoli.

W badaniu Pantucka u 83% jego uczestników stwierdzono znaczące spowolnienie wzrostu poziomu PSA. Ponadto 15% uczestników po 24 miesiącach wykazało całkowity spadek poziomu PSA. Ponieważ biologia guza zmienia się z biegiem czasu, także szczególnie pod wpływem blokady hormonalnej, substancje czynne mogą tracić swoje działanie. Toteż jeśli po kilku latach wartość PSA nagle wyraźnie szybciej wzrastałaby, powinny zostać wzięte pod uwagę inne środki zaradcze. Jeżeli picie soku z granatu nie spowoduje żadnego działania, drugą opcję stanowią sfermentowane polifenole granatu o większej aktywności biologicznej (jednak w przypadku neuroendokrynych raków stercza nie można polegać na PSA).

Podsumowanie

Wśród różnorodnych zaleceń żywieniowych dotyczących raka stercza granat jest owocem mającym najlepszy wykaz badań klinicznych i bardzo korzystne „działania dodatkowe” na serce i układ krążenia. Kliniczne i przedkliniczne dane uzasadniają spożywanie polifenoli soku z owoców granatu w adjuwantowej terapii żywieniowej i chemoprewencji raka stercza. Najnowsze wyniki badań naukowych wykazują interesujące perspektywy w odniesieniu do opornego na działanie hormonów raka stercza. Możliwe, że sok z granatu stanowi znaczące, synergistyczne uzupełnienie standardowych terapii.

Piśmiennictwo:

1. Afaq F, Malik A, Syed D, Maes D, Matsui MS, Mukhtar H. (2005a) Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappaB in normal human epidermal keratinocytes paragraph sign. *Photochemistry and Photobiology*. 81: 38-45.
2. Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD, Mukhtar H. (2005b) Anthocyanin-and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *International Journal of Cancer*. 113: 423-433.
3. Ahmed S, Rahman A, Saleem M, Athar M, Sultana S. (1999) Ellagic acid ameliorates nickel induced biochemical alterations: diminution of oxidative stress. *Hum Exp Toxicol*. 18:691-8.
4. Ahmed S, Wang N, Hafeez BB, Cheruvu VK, Haqqi TM (2005) *Punica granatum L.* extract inhibits IL-1beta-induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappaB in human chondrocytes in vitro. *Journal of Nutrition*. 135: 2096-2102.
5. Albrecht M et al. (2004) Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *Journal of Medicinal Food* 7: 274-283.
6. Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, Volkova N, Presser D, Attias J, Liker H, Hayek T. (2004) Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition*. 23: 423-433.
7. Azmi AS, Bhat SH, Hanif S, Hadi SM. (2006) Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties. *FEBS Lett*. 23 580(2): 533-538.
8. Beer TM, Lalani AS, Lee S, Mori M, Eilers KM, Curd JG, Henner WD, Ryan CW, Venner P, Ruether JD, Chi KN; and the ASCENT Investigators. Jun (2008) C-reactive protein as a prognostic marker for men with androgen-independent prostate cancer: results from the ASCENT trial. *Cancer*.1;112(11):2377-83.
9. Brewer GJ et al. (2000) Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an anticopper, antiangiogenic agent: Phase I Study. *Clin. Cancer Res*. 6: 1-10.
10. Cavalieri E, Frenkel K, Liehr JG, Rogan E, Roy D. (2000) Estrogens as endogenous genotoxic agents-DNA-adducts and mutations. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 27: 75-93.
11. Cerdá B, Espín JC, Parra S, Martínez P, Tomás-Barberán FA. Aug (2004) The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *Eur J Nutr* 43(4):205-20.
12. Charles KA, Rivory LP, Stockler MR, Beale P, Beith J, Boyer M, Clarke SJ. (2006) Predicting the toxicity of weekly docetaxel in advanced cancer. *Clin Pharmacokinet*. 45(6):611-22.
13. Chen D, Peng F, Cui QC, Daniel KG, Orlu S, Liu J, Dou QP. Sep (2005) Inhibition of prostate cancer cellular proteasome activity by a pyrrolidine dithiocarbamate-copper complex is associated with suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Front Biosci*. 1;10:2932-9.

14. Esmailzadeh A, Tahbaz F, Gaieni I, Alavi-Majd H, Azadbakht L (2006) Cholesterol-lowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patients with hyperlipidemia. *Int J Vitam Nutr Res.* 76 (3): 147-151.
15. Faria A, Monteiro R, Azevedo I, Calhau C. (2007). Pomegranate juice effects on cytochrome P450s expression: in vivo studies. *J Med Food.* 10 (4): 643-649.
16. Farkas D, Oleson LE, Zhao Y, Harmatz JS, Zinny MA, Court MH, Greenblatt DJ. Mar (2007) Pomegranate juice does not impair clearance of oral or intravenous midazolam, a probe for cytochrome P450-3A activity: comparison with grapefruit juice. *J Clin Pharmacol.* 2007 47(3):286-94.
17. Fischer-Zorn M, Ara V. (2007) Granatapfelsaft - Chemische Zusammensetzung und mögliche Verfälschungen. *Flüssiges Obst* 08:386-393.
18. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. (2005) Pomegranate juice inhibits oxidized LDL uptake and cholesterol biosynthesis in macrophages. *J Nutr Biochem.* 16(9) :570-576.
19. Griffin JD. Oct (2001) Leukemia stem cells and constitutive activation of NF κ B. *Blood,* 15. 98(8):2291-2291.
20. Hadi SM, Bhat SH, Azmi AS, Hanif S, Shamim U, Ullah MF. Oct (2007) Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: A putative mechanism for anticancer properties. *Semin Cancer Biol.* 17(5):370-6.
21. Hidaka M, Okumura M, Fujita K, Ogikubo T, Yamasaki K, Iwakiri T, Setoguchi N, Arimori K. (2005) Effects of pomegranate juice on human cytochrome p450 3A (CYP3A) and carbamazepine pharmacokinetics in rats. *Drug Metab Dispos.* 33(5):644-8.
22. Hong MY, Seeram NP, Heber D. May (2008). Pomegranate polyphenols down-regulate expression of androgen-synthesizing genes in human prostate cancer cells overexpressing the androgen receptor. *J Nutr Biochem.* Epub ahead of print
23. Huang TH et al. (2005) Pomegranate flower extract diminishes cardiac fibrosis in Zucker diabetic fatty rats: modulation of cardiac endothelin-1 and nuclear factor-kappaB pathways. *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* 46: 856-862.
24. Ignarro LJ, Byrns RE, Sumi D, de Nigris F, Napoli C. Sep (2006) Pomegranate juice protects nitric oxide against oxidative destruction and enhances the biological actions of nitric oxide. *Nitric Oxide.* 15(2):93-102.
25. Jefcoate CR, Liehr JG, Santen RJ, Sutter TR, Yager JD, Yue W, Santner SJ, Tekmal R, Demers L, Pauley R, Naftolin F, Mor G, Berstein L. (2000) Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 27:95-112
26. Kawaii S, Lansky EP. (2004) Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Journal of Medicinal Food.* 7: 13-18.